

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

Tratamiento avanzado de cloro ozono para
agua de suministro con presencia de
Vibrio cholerae

TESIS
para obtener el título de Lic. en:
BIÓLOGO
presenta
V́ctor Díaz Pérez

1996

ASESOR: ORTA LEDEZMA, MA. TERESA
APARICIO OZARES, GERARDO.
CASTRO ESCARPULLI, GRACIELA.

Directores de tesis: Dra. Maria Teresa Orta L.
Dr. Gerardo Aparicio O.
Q.B.P. Graciela Castro E.

80 páginas

Orta



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación es dedicado a mis padres, Francisco y María del Socorro, los cuales sacrificaron su bienestar material, para poder darme la oportunidad de tener una educación universitaria que me permitirá ser un hombre de provecho en la vida

Con cariño y gratitud por su comprensión dedico esta tesis a mis hermanos Ignacio, Francisco, José Román, María del Socorro, Guadalupe y Andrea Tulia; igualmente a mis cuñados Leticia, Angela, Pilar y Oscar, y por ultimo a mis sobrinos Luis Fernando, Guillermo, y Josué Román.

ÍNDICE

	pag.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I. HISTORIA DEL CÓLERA	
1.1 Desarrollo histórico del cólera.....	4
1.2 El cólera en México.....	6
II. EL CÓLERA	
2.1 Características generales.....	10
2.2 Ecología de <i>Vibrio cholerae</i>	13
III. DESINFECCIÓN	
3.1 Definición.....	17
3.2 Antecedentes de la eficacia de un desinfectante.....	17
3.3 Desinfección en agua.....	21
3.4 Eficacia de un desinfectante ante la presencia de un microorganismo.....	23
IV. EL CLORO	
4.1 Antecedentes históricos.....	29
4.2 Características de la cloración.....	30
4.3 Interacción entre la célula y el cloro.....	33
V. EL OZONO	
5.1 Antecedentes históricos.....	34
5.2 Características de la ozonación.....	36
5.3 Interacción entre la célula y el ozono.....	38
OBJETIVOS.....	39
METODOLOGÍA.....	40
PRIMERA ETAPA.....	41
SEGUNDA ETAPA.....	46
TERCERA ETAPA.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
APÉNDICE.....	73

RESUMEN

El presente trabajo es una contribución al conocimiento en la aplicación del ozono como un desinfectante alternativo al hipoclorito de sodio para potabilizar agua de consumo humano. En este caso se utilizaron ozono e hipoclorito de sodio de calidad analítica como desinfectantes; y a la bacteria *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor, serovar Ogawa (CT) como organismo a eliminar. El agua que se utilizó en este proceso de desinfección provino de un manantial. A partir de una cepa *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor, serovar Ogawa, (CT) adaptada a una dosis aplicada de cloro disponible de 0.31mg/L, se elaboró una suspensión bacteriana con una turbiedad similar al tubo número 4 del nefelómetro de McFarland, lo cual provee una estimación poblacional de 12×10^8 bacterias/mL. Esta suspensión se preparó en un volumen de 500mL de agua de manantial estéril; posteriormente la suspensión fue retada con diferentes concentraciones de ozono y de hipoclorito de sodio. A continuación utilizando las técnicas de microdilución y Miles-Misra se procedió a verificar si hubo una disminución en el número de UFC. Los datos obtenidos por las cuentas viables en las pruebas testigo dieron en promedio valores de 10^6 UFC/5mL en la suspensión celular. Las pruebas de desinfección usando concentraciones de ozono en fase gaseosa de 45 y 50mg/L, y a un tiempo de contacto de 10 minutos mostraron que la concentración de UFC disminuyeron en un 99.9999%. En tanto al utilizar el hipoclorito de sodio fue necesario utilizar una dosis aplicada de 40mg/L y a un tiempo de contacto de 30 minutos para lograr disminuir el número de UFC en un 99.9999%.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad entérica que se adquiere por ingestión de alimentos y agua contaminados con heces de enfermos. Esta enfermedad entérica se manifiesta por una diarrea acuosa, vómito, deshidratación y colapso respiratorio; si no es atendido el enfermo puede morir en un lapso entre 4 y 48 horas. La diarrea es producida por una exotoxina que provoca en las células epiteliales del intestino un exceso de permeabilidad, lo que conduce a una pérdida de agua y electrolitos (Giono, *et al.*, 1993; Stanier, *et al.*, 1986; Sánchez, 1991).

El agente etiológico que provoca esta enfermedad es la bacteria *Vibrio cholerae* O1. Este microorganismo se mantiene viable en un pH entre 7.6 y 8.6, el rango de temperatura óptimo se encuentra entre 18 y 40, y 5 y 10°C, mientras que el rango de salinidad que prefiere está entre 15 y 25‰ (Baumann, *et al.*, 1984; Sánchez, 1991).

Cuando las heces de enfermos que contienen esta bacteria entran en contacto con agua destinada para consumo humano, o agua residual que se usa para irrigar plantaciones, tales aguas se vuelven un medio de transmisión de la enfermedad (si dichas aguas presentan los rangos físicoquímicos arriba descritos). La sobrevivencia de *V. cholerae* en agua de mar que esté a una temperatura entre 30 y 32°C es entre 10 y 13 días, mientras que en agua de pozo o de cisterna a una temperatura entre 5 y 10°C es de 18 días (Giono, *et al.*, 1993; Sánchez, 1991).

En México las vías principales de transmisión del cólera son el agua y los alimentos contaminados con *V. cholerae*. La séptima pandemia del cólera hizo su aparición en el país desde 1991, la diseminación de la enfermedad se ha dado en casi todos los estados de la República (Giono, *et al.*, 1993; Dirección General de Epidemiología, 1995).

Debido a esto se hace necesario el llevar a cabo procesos de desinfección del agua que se destinará para consumo humano. Uno de los desinfectantes más utilizados para este fin es el cloro, del que se recomienda mantener en el agua una concentración residual mínima de 0.5mg/L para tener certeza de que dicha agua mantenga una calidad microbiológica adecuada (AWWA, 1973; SSA, 1994).

Si se aplica una dosis de cloro disponible sin tomar en cuenta la cantidad de materia orgánica que pudiese contener el volumen de agua que será desinfectado, puede ocurrir la formación de compuestos carcinógenos como los trihalometanos. También si en dicha aplicación no se toman en cuenta factores como la turbidez, el pH y la distribución adecuada en todo el volumen de agua del desinfectante, puede acontecer que alguna cepa de *V. cholerae* que se encuentre en el agua adquiera resistencia al cloro

(Trojan, *et al.*, 1989; Clark, *et al.*, 1994; Rice, *et al.*, 1992; Seyfried, *et al.*, 1980; Ridway, *et al.*, 1982).

Por lo anterior, es necesario desarrollar tecnología en la aplicación de desinfectantes alternativos al cloro; una de estas alternativas es el uso del ozono, el cual se ha observado su eficacia en la eliminación de microorganismos (Kott, *et al.*, 1980; Bablon, *et al.*, 1991).

I. Historia del cólera

1.1 Desarrollo histórico del cólera

La primera vez que se hizo mención del cólera fue en los trabajos de Hipócrates. Se piensa que el cólera proviene de las palabras chole (bilis) y rein (fluido). En 1872 Emile Lihreun filologista consideró que la palabra cólera tiene el significado en griego de canal (tejido) ya que el síntoma principal es parecido a la descarga de un canal. El médico inglés Tomas Sydenham estableció el término *Cholera morbus* para distinguir la enfermedad del cólera del estado de ira (Barúa, 1992).

John Snow era un investigador y médico obstetra de la reina Victoria (pionero en anestesiarse pacientes mediante inhalación de éter), realizó un estudio en la ciudad de Londres en el año de 1849 durante una explosiva epidemia de cólera; determinó que el grueso de la gente que se enfermó, se debió a que tomó agua de una estación de bombeo localizada en la calle Broad de Londres. El agua que salía de la estación provenía del río Támesis; dicha agua (menciona) tenía un sabor y olor a agua residual. Snow estaba convencido que la enfermedad fue causada por un agente presente en dicha agua, la cual estaba contaminada con materia fecal (Hirschhorn, 1971; Kumate, *et al.*, 1993; Equihua, *et al.*, 1992).

En 1883 Roberto Koch descubrió en sus estudios realizados en Egipto y la India a la bacteria causante del cólera a la cual inicialmente llamó *Komabacillus*; (aunque desde 1854 F. Pazzini hizo una descripción de la bacteria, pero sin relacionarla con la enfermedad del cólera). En 1895, un investigador llamado Gotschlich examinando cadáveres de peregrinos en la ciudad de El Tûr en Egipto descubrió a una cepa de *V. cholerae* con un biovar¹ diferente al denominado Clásico, a este nuevo biovar lo llamó, *V. cholerae* biovar El Tor (Valdespino, *et al.*, 1991; Freeman, 1986; Kumate, *et al.*, 1993; Joklik, 1992).

¹ Biovar: conjunto de características fisiológicas o bioquímicas de un cultivo.

El cólera hizo aparición durante el siglo XIX por medio de 5 pandemias, siendo las rutas comerciales y las vías de retorno de los ejércitos a sus países de origen (después de ir a pelear a otro lugar) los causantes de que el cólera se diseminara mundialmente. Los períodos en que se dieron estas pandemias fueron las siguientes:

I.- 1817 a 1823

II.- 1826 a 1837

III.- 1846 a 1862

IV.- 1864 a 1875

V.- 1887 a 1896

Estas pandemias partieron de los sitios geográficos en los cuales el cólera es endémico; sitios como Bengala en los deltas de los ríos Ganges y Brahmaputra, Burma en los deltas de los ríos Irrawady y Salween; de estas localidades la enfermedad se esparció hacia el sureste de Asia, Europa, norte de África y América del norte. Durante estas pandemias generalmente la mitad de los enfermos morían

(Valdespino, *et al.*, 1991; Freeman, 1986; Kumate, *et al.*, 1993; Equihua, *et al.*, 1992).

La sexta pandemia que ocurrió de 1899 a 1923 alcanzó a diseminarse por Asia, Europa y África, pero no llegó al hemisferio occidental. La última pandemia (que hoy en día está presente) comenzó entre 1937 y 1938 en Sulawesi, Indonesia; abarcando luego Hong Kong en 1960. En 1963 llegó a las islas del sur del Pacífico y al norte de Corea, llegando en 1971 al oriente medio, Rusia, África, y finalmente al hemisferio occidental en los últimos años; esta pandemia es provocada por *V. cholerae* O1 biovar El Tor

(Freeman, 1986; Kumate, *et al.*, 1993; Equihua, *et al.*, 1992).

1.2 El cólera en México

El cólera llegó a México por primera vez, en 1833, dándose el reporte en la ciudad de Saltillo, extendiéndose poco después a los estados de Campeche, Yucatán, San Luis Potosí, Guanajuato y a la ciudad de Tampico. Para agosto la enfermedad se propagó a las ciudades de México y Guadalajara; tan solo en la primera hubo 14 000 muertos (Valdespino, *et al.*, 1991; Kumate, *et al.*, 1993).

El cólera nuevamente se presentó en el país en los años de 1849 y 1854 extendiéndose por todo el territorio y ocurriendo alrededor de 200 000 defunciones. De 1855 a 1871 la enfermedad se presentó sin interrupción. En 1882 el cólera afectó a los estados de Chiapas, Tabasco y Oaxaca; a mediados de 1883 el cólera fue aislado en la ciudad de Juchitán y por medio de incomunicación la enfermedad no se presentó más (Valdespino, *et al.*, 1991).

La aparición de la séptima pandemia del cólera en el país se dió desde el 17 de junio de 1991, dándose el primer caso en una persona de 68 años y cuya residencia era San Miguel Totolmoloya, municipio de Sultepec en el Estado de México; a las pocas semanas se dieron más casos en el altiplano mexicano; extendiéndose después la enfermedad hacia los estados del sureste, donde se manifestaron los números más altos de casos (Giono, *et al.*, 1993; Kumate, *et al.*, 1993).

Durante 1991 los estados más afectados presentaron las siguientes tasas de incidencia por 100 000 habitantes:
Tabasco 54.3%, Hidalgo 28.2%, Yucatán 19.2%, Chiapas 15.0%, Puebla 7.5%, y Guerrero 4.3%. Mientras que los estados que tuvieron mayores tasas de letalidad fueron:
Guerrero 3.5%, Oaxaca 2.9%, y Yucatán 1.7% (Giono, *et al.*, 1993).

En 1992 los estados que tuvieron mayores tasas de incidencia por 100 000 habitantes fueron: Yucatán 60.1%, Guerrero 56.3%, Tabasco 24.5%, Morelos 19.4%, Tamaulipas 19.3%, Chiapas 16.8%, Hidalgo 12.4%, Michoacán y Veracruz 10.9% cada uno. Los estados que presentaron mayores tasas de letalidad fueron:

Morelos 3.3% y Veracruz 2.5% (*op. cit.*).

Para el primer bimestre de 1993 hubo un cambio que se empezaba a notar desde finales del año de 1992, los estados más afectados por el cólera ya no fueron los del sureste, sino los del altiplano y el norte del Golfo de México, dándose las siguientes tasas de incidencia por 100 000 habitantes:

Morelos 37%, Puebla 19.3%, Tlaxcala 19.1%, Tamaulipas 10.8%, Michoacán 5.7%, y Guerrero 5.2%; las entidades federativas con más altas tasas de letalidad fueron:

Veracruz 3.5%, Distrito Federal 2.8%, Michoacán 1.9%, y Tlaxcala 1.5% (*op. cit.*).

Cuadro 1

Casos de Cólera reportados en México, en 1994.

Entidad	Casos	Entidad	Casos
Aguascalientes	-	Durango	-
Baja California Norte	-	Durango	20
Baja California Sur	-	Guanajuato	176
Campeche	76	Guerrero	121
Coahuila	-	Hidalgo	19
Colima	1	Jalisco	290
Chiapas	567	Estado de México	42
Chihuahua	-	Michoacán	111
Distrito Federal	216	Morelos	-

Continúa

Entidad	Casos
Nayarit	-
Nuevo León	16
Oaxaca	91
Puebla	120
Querétaro	56
Quintana Roo	1
San Luis Potosí	119
Sinaloa	-
Sonora	-
Tabasco	300
Tamaulipas	110
Tlaxcala	58
Veracruz	1031
Yucatán	-
Zacatecas	-

Fuente: Dirección General de Epidemiología, 1995.

Se puede observar en los datos arriba expuestos que las estados del sur, el Golfo y el altiplano siguen siendo las entidades federativas que más daño sufren por la enfermedad.

Cuadro 2

Casos de Cólera reportados en México hasta la semana 45, en 1995.

Entidad	Casos	Entidad	Casos
Aguascalientes	5	Querétaro	149
Baja California Norte	-	Quintana Roo	-
Baja California Sur	-	San Luis Potosí	102
Campeche	1446	Sinaloa	-
Coahuila	23	Sonora	1
Colima	119	Tabasco	835
Chiapas	1417	Tamaulipas	548
Chihuahua	1	Tlaxcala	321
Distrito Federal	1033	Veracruz	1798
Durango	1	Yucatán	2296
Guanajuato	408	Zacatecas	-
Guerrero	742		
Hidalgo	261		
Jalisco	522		
Estado de México	844		
Michoacán	271		
Morelos	416		
Nayarit	6		
Nuevo León	144		
Oaxaca	516		
Puebla	812		

Fuente: Dirección General de Epidemiología, 1995.

Se nota en los datos presentados para 1995, que además de las entidades federativas que han sido afectadas por el cólera en años anteriores, algunos de los estados del norte del país también sufren la epidemia.

II. El cólera

2.1 Características generales

El cólera se define como una enfermedad entérica, debido a que se adquiere por ingestión de alimentos y agua contaminada con heces de enfermos. Tiene la particularidad de tener un período de incubación corto, de 3 a 5 días y en ocasiones es tan solo de 24 horas (Stanier, *et al.*, 1986).

No se considera una infección invasiva porque los microorganismos no llegan a la sangre. Esta enfermedad intestinal aguda se manifiesta por una diarrea acuosa en forma de "agua de arroz", también hay vómito, deshidratación, calambres musculares y colapso respiratorio. El enfermo grave si no es atendido puede morir en un lapso de 4 a 48 horas (Sánchez, 1991).

La fuerte diarrea que se padece al tener cólera, se debe a una exotoxina que actúa sobre las células epiteliales del tracto intestinal, haciendo que se vuelvan permeables y provocando la pérdida de agua y electrolitos. Se considera como dosis infectiva para adultos un valor de 10^8 microorganismos; aunque personas que tengan una acidez gástrica baja (aclorhidria) pueden infectarse con dosis más bajas

(Equihua, *et al.*, 1992; Sánchez, 1991; Giono, *et al.*, 1993; Feachmen, 1983).

El agente etiológico causante de la enfermedad del cólera es la bacteria llamada *V. cholerae*. Es un microorganismo anaerobio facultativo, tiene forma de vibrio (coma); no fija ni desnitrifica el nitrógeno. Es quimioheterótrofo, oxidasa positivo y Gram negativo

(Baumman, *et al.*, 1984; Freeman, 1986; Joklik, 1992; Farmer III, *et al.*, 1985).

Fermenta la D-glucosa produciendo ácido; también utilizan la D-fructuosa, la Maltosa, y el Glicerol. En medios líquidos presenta movimiento debido a la formación de flagelos polares, forma colonias lisas, redondas, de color amarillo y de 2mm de diámetro en promedio

(Baumman, *et al.*, 1984; Freeman, 1986; Joklik, 1992; Farmer III, *et al.*, 1985).

Esta bacteria tiene un crecimiento óptimo a temperaturas entre 18 y 40°C y 5 a 10°C; el pH adecuado para su sobrevivencia se da entre 7.6 y 8.6; la salinidad que prefiere está entre 15 y 25‰. Dentro de los medios comúnmente utilizados para cultivar *V. cholerae* están el agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (el cual es un agar selectivo para este tipo de organismo), y el medio McConkey

(Baumann, *et al.*, 1984; Freeman, 1986; Joklik, 1992; DIFCO, 1984; Stanier, *et al.*, 1986;

Feachem, *et al.*, 1983; Sánchez, 1991; Sakazaki, 1992).

Cuando *V. cholerae* entra en contacto con el antisuero polivalente O1 reacciona (produciéndose una aglutinación) debido a la presencia del antígeno O. Si no reacciona con tal antisuero se le denomina *V. cholerae* no O1. Es de mencionar que desde 1992 en Madras, India, Bangladesh y Tailandia aparecieron brotes de cólera producidos por una cepa de *V. cholerae* no O1; este vibrión a pesar de no ser O1, se ha comprobado que contiene el gen que codifica la producción de la toxina; a esta cepa se le denominó *V. cholerae* O139

(Calia, *et al.*, 1994; Figueroa, *et al.*, 1994; WHO, 1993).

V. cholerae O1 incluye dos clases de biovars El Clásico y El Tor, siendo este último el causante de la séptima pandemia. *V. cholerae* O1 además se divide en los serovares¹, Ogawa, Inaba, y Hikojima. Los serovares se deben a una reacción de aglutinación con antisueros específicos sobre diferentes antígenos presentes en estas variedades.

Cuadro 3

SEROVAR	ANTÍGENO
Ogawa	AB
Inaba	AC
Hikojima	ABC

(Baumann, *et al.*, 1984; Freeman, 1986; Farmer III, *et al.*, 1985; Giono, *et al.*, 1993; Sakazaky, 1992).

¹ Serovar: identificación de un biovar basado en sus características antigénicas.

2.2 Ecología de Vibrio cholerae

Estudios realizados por Colwell y colaboradores en la Bahía Chesapeake, sugieren el hecho de que *V. cholerae* O1 toxigénico (CT⁺) y no toxigénico (CT⁻), y *V. cholerae* no O1 pueden ser recuperados del medioambiente. También muestran que esta bacteria no mantiene una relación en su número poblacional con bacterias coliformes, los cuales se consideran típicos indicadores de agua contaminada (Colwell, *et al.*, 1992).

Las investigaciones realizadas por Colwell y otros investigadores en lagunas costeras, ríos, y lagos han permitido determinar que *V. cholerae* puede adaptarse a condiciones medioambientales poco favorables asumiendo la siguiente condición:

La bacteria entra en un estado de letargo en el cual adquiere una forma redonda y reduce su tamaño; además grupos de bacterias se agregan y producen un material quitinoso. En tal estado *V. cholerae* no forma colonias lisas y redondas, sino rugosas; este tipo de colonias pueden ser aisladas en agar Luria o agar cerebro-corazón. Para poder observar al vibrión en su forma redondeada es necesario utilizar técnicas de microscopía de inmunofluorescencia

(Kaper, *et al.*, 1995; Colwell, *et al.*, 1992).

La variedad rugosa de *V. cholerae* se conoce desde 1938, la descripción fue hecha por Bruce White; él comentó que tal variedad fenotípica mantiene su capacidad virulenta. En México se ha aislado a esta variedad rugosa, la cepa fue obtenida de un paciente del estado de Puebla; el muestreo se realizó por medio de la técnica de hisopo rectal

(Rice, *et al.*, 1992; Rodríguez, *et al.*, 1994).

También *V. cholerae* ha sido aislado en instalaciones fabricadas por el hombre (tuberías, cisternas, tinacos, etc.) pudiendo ser hallada tanto en agua para consumo humano como en aguas residuales. Por ejemplo en el brote de cólera en Jerusalén de 1972 se encontró a la bacteria en aguas residuales en una concentración de 10^4 . En Manila se recuperó *V. cholerae* de agua de pozo a temperatura de refrigeración (entre 5 y 10^0 C) después de 18 días (Feachmen, *et al.*, 1981; Feachem, *et al.*, 1983).

Durante la epidemia de cólera en Perú en el año de 1991 se realizó un monitoreo en diversos tipos de agua encontrándose las siguientes concentraciones de la bacteria

Cuadro 4

CIUDAD	MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE <i>Vibrio cholerae</i> O1 (por dL)
Lima	agua de mar	10^4
	agua de río	10^3
	agua residual municipal	10^5
	agua residual de un Hospital	10^4
	agua para irrigación	10^5
Puerto de Callao	agua de mar	10^4
	agua de río	10^2
Puno	agua de lago	0 a 4
	agua residual	10^2
Iquitos	agua de río	10^3

(Tamplin, *et al.*, 1991)

En este cuadro se observa la presencia de la bacteria en concentraciones altas en agua de mar y agua residual. La salinidad del agua de mar y su contaminación por aguas residuales que contengan heces de enfermos permite tales concentraciones de la bacteria.

En un estudio hecho en Bangladesh se encontró que el agua que tomaron personas que desarrollaron la enfermedad contenía una concentración de 500 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)²/mL; también se ha observado que el ingerir grandes cantidades de agua contaminada permite a la población bacteriana pasar rápidamente por el estómago sin ser afectada por su acidez (Glass, *et al.*, 1992).

La transmisión del cólera por agua contaminada durante esta séptima pandemia ha sido localizada en aguas no potabilizadas provenientes de ríos, estanques, canales de irrigación y pozos; estas fuentes de agua pueden causar brotes de la enfermedad a nivel comunitario o familiar. Un hecho que ocurre en países en desarrollo que dificulta conocer con exactitud la fuente de agua por donde el cólera se disemina, es que la población con menos recursos toma de diversos sitios el agua que utiliza para beber, lavar, bañarse y cocinar. No hay que olvidar que la transmisión del cólera no solo se da por agua contaminada sino otra vía muy importante son los pescados y crustáceos que provienen de agua de mar contaminada con heces de enfermos de cólera; esta vía junto con la falta de disposición de agua potable y el tratamiento adecuado de aguas residuales son las principales fuentes de transmisión en el Continente Americano (Glass, *et al.*, 1992; de Castro, 1991).

² Una Unidad Formadora de Colonia es una célula simple o una agrupación de ellas, capaces de formar una colonia.

La posibilidad de encontrar a *V. cholerae* en agua que puede ser utilizada para consumo humano, hace necesario elaborar un programa de monitoreos en las redes de agua potable, sobre todo en los sitios donde se cruce con tuberías de aguas residuales, porque puede haber un rompimiento de tuberías y darse una contaminación del agua potable (Craun, *et al.*, 1991; Feachem, *et al.*, 1983; Giono *et al.*, 1993).

III. DESINFECCIÓN

3.1 DEFINICIÓN

La desinfección es definida como un proceso que permite inactivar microorganismos patógenos; pero a diferencia de la esterilización, es un proceso que tiene una acción restringida en contra de las endosporas (Favero, *et al.*, 1993; Block, *et al.*, 1971).

Los desinfectantes son generalmente agentes químicos, que tienen como función la de inactivar microorganismos que se encuentren presentes en el agua, sitios donde se da asistencia médica y se producen alimentos y medicamentos (Favero, *et al.*, 1993; Block, *et al.*, 1971).

3.2 ANTECEDENTES DE LA EFICACIA DE UN DESINFECTANTE

La evaluación de la eficacia de un desinfectante originalmente fueron llevadas a cabo con el fin de determinar en cual concentración mínima y tiempo de contacto un desinfectante es efectivo para eliminar un contaminante. Actualmente las pruebas de desinfección se diseñan con base a instalaciones de servicio público como:

- 1.- Plantas de tratamiento de aguas residuales
- 2.- Plantas potabilizadoras de agua
- 3.- Industria alimenticia
- 4.- Industria farmacéutica

debido a la variedad de situaciones, las posibilidades de diseñar pruebas para evaluar desinfectantes son múltiples; por tanto no existe una prueba que sea aceptada mundialmente (Russell, *et al.*, 1982).

El siguiente cuadro ejemplifica el hecho de tener que tomar en cuenta varios parámetros para poder estructurar una prueba de eficacia de un desinfectante.

Cuadro 5

Clasificación de acuerdo con el organismo a testificar
1.- Determinación de la actividad antibacteriana.
2.- Determinación de la actividad antifúngica.
3.- Determinación de la actividad antiviral.
Clasificación de acuerdo al tipo de acción
1.- Inhibición del crecimiento de microorganismos.
2.- Destrucción total del organismo.
Clasificación de acuerdo a la estructura de la prueba
1.- Pruebas <i>in vitro</i> = pruebas que se realizan con suspensiones celulares o en un flujo.
2.- Pruebas prácticas= pruebas que se realizan en superficies, instrumentos, piel, manos.
3.- Pruebas de aplicación.
Clasificación de acuerdo con el propósito de la prueba
1.- Primera fase= son pruebas preliminares que permiten determinar si una sustancia o preparación química tiene propiedades desinfectantes; también determinan tiempos de contacto, diluciones apropiadas e influencia de materia orgánica.
2.- Segunda fase= son pruebas que determinan la efectividad de una concentración de un desinfectante para una aplicación en particular.
3.- Tercera fase= son pruebas que determinan si un desinfectante tiene una aplicación práctica en una situación real.

(Russell, *et al.*, 1982)

En base al cuadro anterior se determina la necesidad de tomar en cuenta en una prueba de evaluación de un desinfectante parámetros como el tipo de organismo que será probado; la manera en que se aplicará desinfectante; bajo que circunstancias es efectivo y si tiene una aplicación práctica (*op. cit.*).

El conocer el tiempo en que una concentración "X" de un desinfectante permite eliminar una población bacteriana es necesario; con tal conocimiento es posible asegurar situaciones como:

1.- La esterilidad de productos farmacéuticos, y utensilios médicos

2.- La buena calidad microbiológica de alimentos y agua de consumo humano

también es importante tener una estimación del tamaño de la población microbiana que va a ser eliminada, puesto que entre más grande sea la población el tiempo que requiere un desinfectante para eliminarla aumentará; un punto más a considerar es la localización y distribución de la población microbiana, ya que si dicha población se encuentra en un sitio donde no se encuentre uniformemente distribuida y al desinfectante le cueste trabajo llegar, su actividad antimicrobiana se verá disminuida (*op. cit.*).

La efectividad del desinfectante sobre la población microbiana que será eliminada debe provocar la pérdida irreversible de la capacidad de multiplicación. Un método cuantitativo para determinarlo es por medio de la técnica de cuenta viable¹. Los datos acerca de la muerte de una población bacteriana pueden ser expresados mediante una gráfica que contenga en el eje de las abscisas a la variable independiente expresada en una escala aritmética (por ejemplo, tiempo); y en el eje de las ordenadas a la variable dependiente expresada en una escala logarítmica o exponencial (por ejemplo, número de sobrevivientes) (ver figura 1) (Joklik, 1992; Stanier, *et al.*, 1986).

¹ Realizando una serie de repeticiones con esta prueba es posible llegar a estimar el número de microorganismos viables que se encuentran en una población de bacterias.

Curva de muerte de una población microbiana

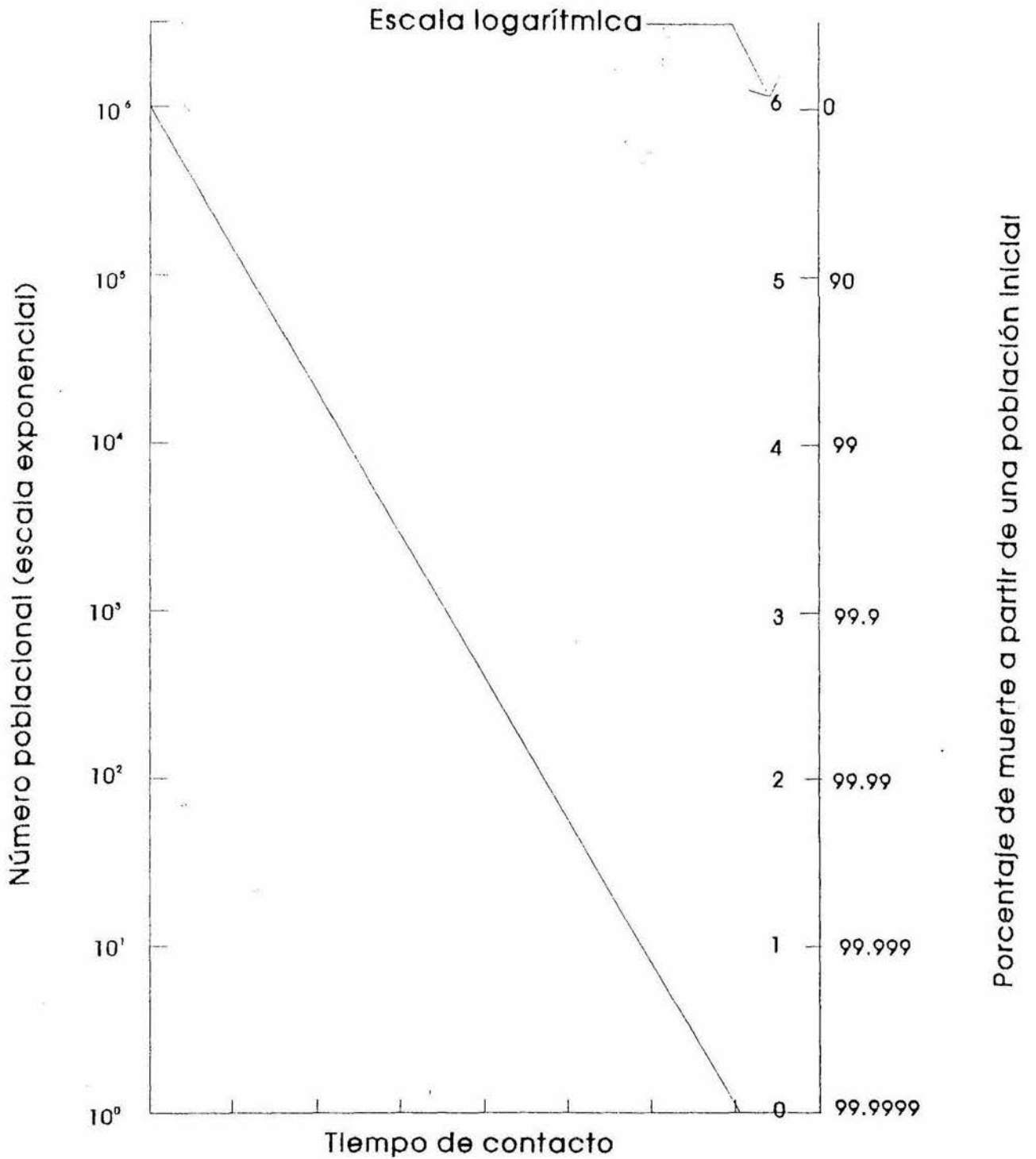


Figura 1

Tomado de Borls, *et al.*, 1982

3.3 DESINFECCIÓN EN AGUA

La desinfección que se lleva a cabo en el agua se puede realizar utilizando alguno de los siguientes métodos, los cuales pueden combinarse:

- 1.- Tratamiento físico= aplicación de calor, filtración.
- 2.- Irradiación= luz ultravioleta.
- 3.- Utilización de oxidantes= halógenos, ozono.
- 4.- Floculación (AWWA, 1973).

Todos los métodos mencionados tienen como finalidad eliminar del agua sustancias químicas y microorganismos que pueden ser perjudiciales para el ser humano. Después de aplicar un proceso de desinfección al agua que se destinará para consumo humano, ésta deberá encontrarse dentro de ciertos parámetros microbiológicos, químicos, fisicoquímicos, organolépticos los cuales determinarán si efectivamente esta agua es apta para el consumo humano. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Secretaría de Salud de México (SSA) han emitido valores guía o límites permisibles de dichos parámetros; algunos de estos valores se presentan a continuación.

Cuadro 6

PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR GUÍA	PROYECTO de la NORMA OFICIAL MEXICANA del AGUA POTABLE
Bacterias coliformes totales	en un volumen de 100mL	0	2
Bacterias coliformes fecales	en un volumen de 100mL	0	0
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	mg/L	400	400.00
Nitratos (NO ₃ ⁻)	mg/L	10	10.00
Cloruros (CL ⁻)	mg/L	250	250.00
Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM)	mg/L	—	0.50
Turbidez ²	Unidad Nefelométrica de Turbiedad (UNT)	5	5
Total de Sólidos Disueltos ³	mg/L	1000	1000.00
Dureza total (CaCO ₃)	mg/L	500	500.00
pH	unidad de pH	6.5 a 8.5	6.5 a 8.5

(OPS, 1985; SSA, 1994)

² La turbidez en el agua se debe a la presencia de partículas en suspensión como: arcillas, sedimentos, partículas orgánicas coloidales, plancton y otros organismos microscópicos.

³ Los sólidos disueltos se componen de sales inorgánicas como: carbonato, bicarbonato, cloruro, sodio, potasio, calcio y magnesio.

Los datos expresados en coliformes totales y fecales de la OPS es para agua entubada y purificada; mientras los datos por la SSA es solo para agua potable. El valor dado de cloro libre residual por la OPS y la SSA es después de un tiempo de contacto de 30 minutos. La OPS a pesar de expresar un valor de 5 UNT, recomienda un valor menor de 1, para asegurar la efectividad del proceso de desinfección (OPS, 1985; SSA, 1994).

Dentro de los valores guía para el agua desinfectada (entubada o embotellada) dados por la OPS y los límites permisibles para el agua potable de la SSA, no se establece un valor o límite para *V. cholerae*. Dentro de los límites permisibles para el agua purificada, dados por la SSA se menciona que en una muestra de 3 litros no debe existir *V. cholerae*. También la SSA en su Norma Técnica número 339 menciona la necesidad de realizar en áreas con riesgo de transmisión de la enfermedad monitoreos constantes en tomas domiciliarias de agua potable, pipas, agua envasada, hielo, hidrantes, ríos, canales de riego, lagos, pozos, canales de aguas negras; igualmente comenta que debe clorarse el agua para obtener un residual de cloro 0.5mg/L, o hervir el agua durante 10 minutos (OPS, 1985; SSA, 1994; SSA, 1991).

3.4 EFICACIA DE UN DESINFECTANTE ANTE LA PRESENCIA DE UN MICROORGANISMO

Se han realizado investigaciones que muestran que diversos microorganismos se adaptan (volviéndose resistentes) a la presencia de ciertos desinfectantes. Tales investigaciones han mostrado que tal resistencia microbiana es debida a efectos como asociación de microorganismos con partículas, agrupamiento, o modificaciones debidas a antecedentes en las condiciones de crecimiento (Clark, *et al.*, 1994)

En 1991 la división de investigaciones de agua potable de la agencia del medio ambiente de E.U.A. (US EPA) mando un equipo de trabajo al Perú a petición del gobierno de ese país con el objeto de ayudar a capacitar personal en el manejo y control de la epidemia de cólera. A lo largo de las investigaciones el equipo de trabajo americano obtuvo de un paciente una cepa de *V. cholerae* que presentaba 2 morfologías coloniales en agar no selectivo; una de estas morfologías era la típica colonia redonda, lisa de 2mm de diámetro en promedio; pero la otra morfología presentaba una colonia rugosa, la cual parecía estar embebida en una masa mucoide (*op. cit.*).

Posteriormente los investigadores retaron una suspensión bacteriana de 500mL con una concentración entre 10^5 y 10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/100mL, tanto para la variedad lisa como la rugosa contra concentraciones de cloro que abarcaban un rango entre 0.25 a 2.00mg/L; la temperatura que en la que trabajaron fue de 20°C y en un pH de 7. Ellos encontraron que la variedad lisa fue eliminada en un 99.9999%, utilizando una concentración de cloro de 0.5mg/L en un tiempo de contacto de 1.33 minutos; mientras tanto la variedad rugosa mantenía una cuenta viable de 210-250 UFC/mL después de 30 minutos de tiempo de contacto. La conclusión fue que la cepa de *V. cholerae* de morfología colonial rugosa al presentar masas mucoides que agrupan a subpoblaciones de la bacteria permitió a dicha cepa tener una mayor resistencia que la cepa de morfología colonial lisa (*op. cit.*)

En el trabajo presentado por Rice y colaboradores retaron una cepa de *V. cholerae* O1 de morfología colonial rugosa obtenida en Perú a una concentración de cloro libre de 2mg/L durante 30 minutos de tiempo de contacto; partiendo de un valor inicial de 10^5 UFC la disminución poblacional fue alrededor de 99%, recobrando aún microorganismos viables. También retaron 2 cepas peruanas de *V. cholerae* O1 de morfología colonial lisa (una de las cepas fue obtenida de un paciente, la otra fue recobrada de agua de mar) a una concentración de cloro libre de 0.5mg/L; iniciando el número poblacional en ambas cepas con un valor de 10^5 UFC, la disminución poblacional fue de 99.99% en ambas (Rice, *et al.*, 1992).

En el trabajo presentado por Rodda y colaboradores realizaron un proceso de desinfección en agua con gran demanda de cloro (debido a la presencia de materia orgánica). Prepararon una suspensión bacteriana a partir de una cepa de *V. cholerae* proveniente de un Instituto de investigación médica; la suspensión era de 1L y tenía una concentración de 4.6×10^8 UFC en promedio. Ellos colocaron una tableta para desinfectar agua, la cual contenía entre 14 000 y 25 000mg/L de cloro disponible; agitaron el matraz por un minuto y tomaron muestras a los 4, 10 y 20 minutos. Encontraron que a partir de los 4 minutos la población de *V. cholerae* fue removida en 7.5log (Rodda, *et al.*, 1993).

Aparicio y colaboradores evaluaron si había alguna diferencia en la resistencia al cloro entre 2 cepas de *Staphylococcus aureus*, una de estas cepas se adaptó previamente a una dosis aplicada de 200mg/L de cloro disponible en 3mL de caldo nutritivo. Utilizando la técnica de Kirby-Bauer de difusión en disco y el método de ensayo en medio líquido para evaluar un desinfectante, descrito por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) (ambas técnicas tuvieron algunas modificaciones) (Aparicio, *et al.*, 1993).

Se retaron ambas cepas a una dosis de 40ug de cloro disponible en un pH de 8 en el caso de la técnica de Kirby-Bauer y en la técnica de la AOAC se retaron a dosis de 5, 10, 20, 50, 100 y 200mg/L en un pH de 8; en ambos métodos los cultivos se incubaron a 37°C durante un tiempo entre 18 y 48 horas. En el método de difusión en disco no encontraron diferencias significativas, mientras que en el método de ensayo en medio líquido observaron que la cepa adaptada al cloro resistió la dosis de 10mg/L, en tanto que con la cepa que no se adaptó previamente no resistió tal dosis; los autores concluyen que la cepa de *S. aureus* desarrolla resistencia a concentraciones subletales de cloro (*op. cit.*)

Ridway y Olson elaboraron un trabajo para evaluar la resistencia al cloro de diferentes grupos de bacterias; las cepas con que trabajaron fueron recuperadas de 2 diferentes sistemas de distribución de agua; uno de estos sistemas es comúnmente tratado con cloro, para mantener un cloro residual de 0.5mg/L, mientras que en el otro sistema comúnmente no es clorada. Uno de los métodos que utilizaron para realizar el trabajo fue el de filtración de membrana; muestras de agua entre 0.05 y 200mL (dependiendo de la densidad bacteriana) fueron filtradas en membranas de una porosidad de 0.2um, a continuación se hizo filtrar en por las mismas membranas un buffer de fosfatos a pH 7, posteriormente se filtraron soluciones de cloro de 0.05mg/L, después se dejó actuar al cloro por un lapso de 2 minutos al término del lapso se filtró a través de las membranas 10mL de una solución de tiosulfato de sodio 10mM, finalmente las membranas se incubaron a 35°C por 2 días; esta prueba se repitió con dosis de 0.1, 0.5, 1.0 y 10mg/L de cloro disponible. Sus resultados mostraron que bacterias formadoras de esporas gram positivas tales como *Bacillus sp.* que provengan del sistema de distribución de agua clorada tienen un porcentaje de sobrevivencia del 50% al ser retadas con una dosis de cloro de 10mg/L, en cambio la misma especie pero proveniente del sistema de agua que no es clorada tiene un porcentaje de sobrevivencia del 48.3% al ser retada con la misma dosis. En otro tipo de bacteria, como

Klebsiella sp. en una dosis de cloro de 0.1mg/L; la cepa que proviene del agua clorada tuvo un porcentaje de sobrevivencia de 3.6%, mientras que la cepa que proviene del agua no clorada tuvo un porcentaje de sobrevivencia del 2.3%. Estos autores concluyeron que la resistencia a dosis aplicadas de cloro por parte de bacterias se da por medio de agrupación, agregación dentro de masas de mucopolisacáridos, adhesión a partículas suspendidas que provocan turbidez, o formación de esporas (Ridway, *et al.*, 1982).

Seyfried y Fraser realizaron una recolecta de muestras de agua en diversas albercas que se hallaban al aire libre y en interiores, a tales muestras de agua se les determinó el pH y el cloro residual por el método de DFD. Ellos encontraron *Pseudomonas aeruginosa* en una concentración mayor de 2400 UFC/100mL en una muestra de agua que contenía un cloro residual de 1mg/L a un pH de 8.4, los autores expresan la idea de que en un pH que tienda a ser alcalino la efectividad del cloro como desinfectante disminuirá debido a que el porcentaje de ácido hipocloroso se reduce también (Seyfried, *et al.*, 1980).

Kott y colaboradores en parte de su trabajo, buscaron determinar la resistencia o sensibilidad de ciertos microorganismos, al ser retados con diversas dosis de cloro y ozono. El proceso de evaluación lo realizaron en un volumen de agua de 30L, esta contenía NH₄Cl como fuente de nitrógeno o 5mL de ácido glutámico como fuente orgánica, además de agua residual proveniente de la etapa secundaria de una planta de tratamiento de agua (Kott, *et al.*, 1980).

Las dosis de los desinfectantes, concentraciones de las poblaciones de microorganismos y porcentajes de muerte se muestran en el siguiente cuadro.

agente desinfectante utilizado (mg/L)	Coliformes en 100mL	porcentaje de muerte	<i>Streptococcus fecalis</i> en 100mL	porcentaje de muerte
control	7.2×10^6	—	3.9×10^4	—
cloro (10.0)	6.6×10^4	98.40	4.1×10^2	98.94
ozono (10.2)	4.5×10^4	98.93	5.3×10^3	86.40
ozono (10.2), seguido de cloro (10)	3.5×10^3	99.92	8.0	99.98
cloro (10), seguido de ozono (10.8)	1.9×10^3	99.95	1.1×10^3	96.72
ozono (10.8), más cloro (10)	3.3×10^3	99.92	18	99.95

continúa

agente desinfectante utilizado (mg/L)	Colifagos en 100mL	porcentaje de muerte	Poliovirus-1 aplicado en 5 litros	porcentaje de muerte
control	7.9×10^3	—	1.9×10^4	—
cloro (10.0)	2.4×10^3	69.62	3.8×10^3	80
ozono (10.2)	7.9×10^2	90.00	1.0×10^2	99.43
ozono (10.2), seguido de cloro (10)	2.2×10^2	97.22	21	99.89
cloro (10), seguido de ozono (10.8)	1.4×10^3	82.28	1.0×10^3	94.63
ozono (10.8), más cloro (10)	17	99.78	0	100

el pH en que trabajaron fue de 8 después de verter la cepa atenuada de Poliovirus-1; el tiempo de contacto fue de 30 minutos en cada prueba.

Los resultados según los autores sugieren que la combinación de ambos desinfectantes resulta ser el método más apropiado para tratar el agua residual simulada que ellos elaboraron (Kott, *et al.*, 1980).

IV. EL CLORO

4.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El cloro fue descubierto en Suecia en 1744. En 1804 Sir Humphrey Davy determinó que el cloro es un elemento dándole su nombre, el cual proviene de la palabra griega **chlros** (verde pálido). En la naturaleza el cloro no se encuentra como elemento solo, sino que está combinado con otros elementos como el sodio, calcio y el magnesio. El cloro es un gas verde amarillento, de olor irritante y penetrante. No fue sino hasta la primera mitad del siglo XIX que se reconocieron las propiedades desinfectantes del cloro, específicamente en forma de cal clorada. En Londres se usó esta cal clorada para tratar aguas residuales. A principios del siglo XX en los Estados Unidos la mayoría de las plantas de agua potable utilizaron hipocloritos en combinación con métodos de filtración para potabilidad el agua (Block, *et al.*, 1971; AWWA, 1973).

Al desarrollarse la aplicación del cloro y sus derivados en el proceso de desinfección de agua se hizo necesario el aplicar diversas dosis, basándose en la medición del cloro residual; esta medición se pudo lograr gracias al desarrollo de técnicas como la iodométrica y la de ortotolidina creada en 1909; años después se desarrolló la técnica amperométrica (AWWA, 1973).

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CLORACIÓN

Los hipocloritos son ampliamente utilizados en el campo de la desinfección química; debido a las siguientes características:

- 1.- Tienen acción bactericida sobre un amplio número de especies de microorganismos.
- 2.- Son relativamente económicos.
- 3.- Son de fácil manejo y aplicación.

(Troyan, *et al.*, 1989).

Los hipocloritos pueden ser provistos en forma de polvo, como el hipoclorito de calcio el cual llega a tener un 70% de cloro disponible¹. También puede presentarse en forma de solución como el hipoclorito de sodio, el cual tiene de 1 a 5% de cloro disponible

(Block, *et al.*, 1971; AWWA, 1973).

Cuando el cloro es añadido al agua ocurre la siguiente reacción:



el ácido hipocloroso HClO se disocia a su vez en hidrógeno y el ion hipoclorito según la siguiente reacción:



La proporción entre el HClO y el ClO⁻ depende del pH, cerca de 6 la presencia de HClO es de 100%, mientras que el ion hipocloroso alcanza una presencia del 100% a un pH de 9. Tanto el HClO como el ClO⁻ se consideran las formas de cloro disponible libre en el agua (ver figura 2)

(Troyan, *et al.*, 1989; Block, *et al.*, 1971; AWWA, 1973).

¹ El cloro disponible puede definirse como la capacidad oxidativa y se expresa como la cantidad equivalente de cloro como elemento. Al referirse a los hipocloritos, el cloro disponible se indica como la cantidad de cloro utilizado para preparar estos compuestos.

Porcentaje de HClO y ClO⁻ en agua a los pH Indicados

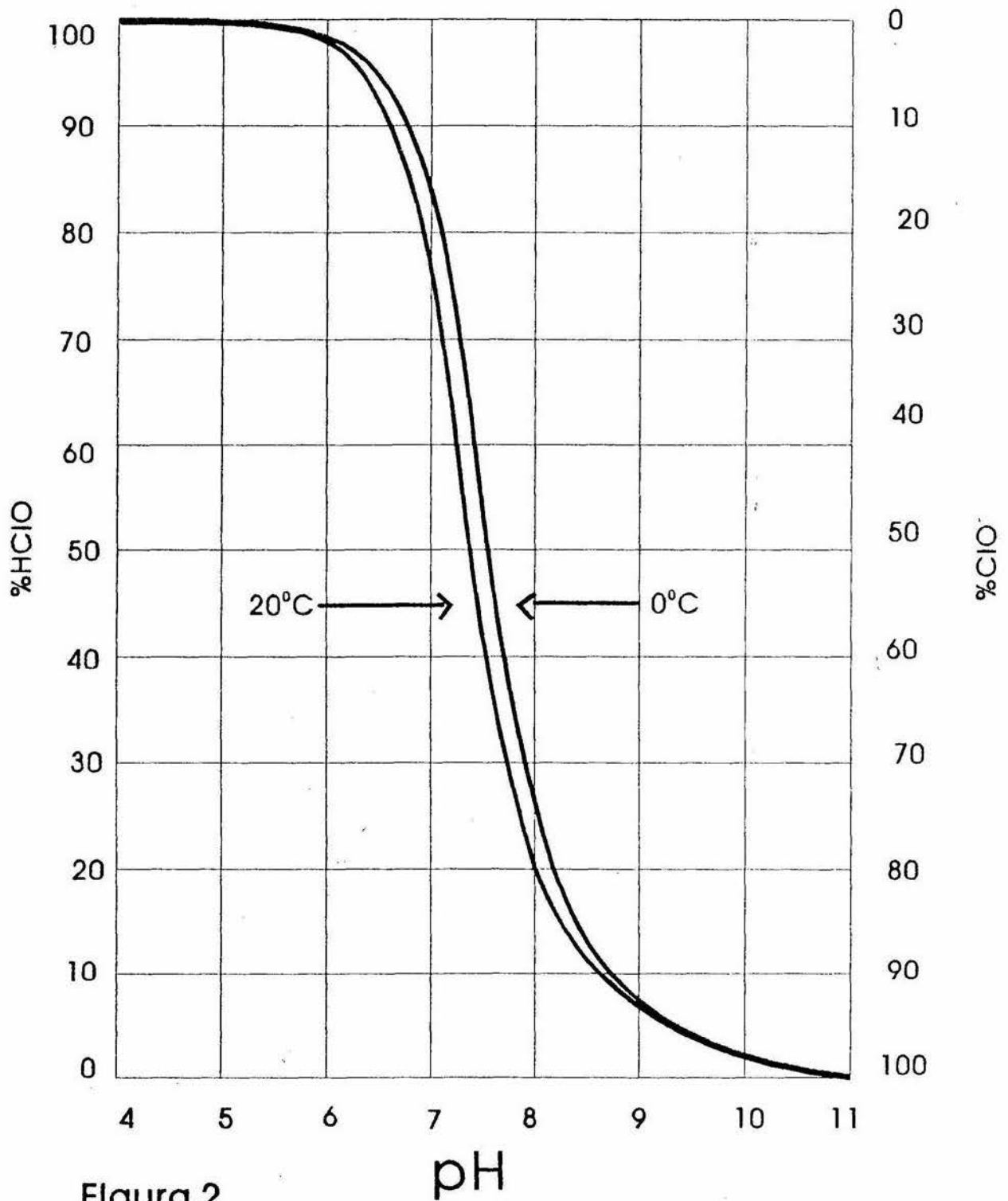


Figura 2

Tomado de AWWA, 1973

El ácido hipocloroso HClO y el ion hipoclorito son los responsables de destruir los microorganismos, aunque varía considerablemente su potencial destructor de uno a otro, siendo el ácido hipocloroso el que carga con la mayor responsabilidad; debido a su tamaño pequeño y relativa neutralidad pasa la pared celular (Block, *et al.*, 1971; AWWA, 1973).

Al darse el proceso de cloración cierta porción del cloro se combina con amoníaco y otros compuestos nitrogenados que se encuentran en forma natural en el agua, formándose las llamadas cloraminas o compuestos N-cloro; estos compuestos se consideran las formas de cloro disponible combinado (Block, *et al.*, 1971).

Existen varios métodos para determinar la concentración de cloro disponible, ya sea libre, combinado o total; entre los métodos más utilizados se pueden mencionar los siguientes:

1.- Método amperométrico= es utilizado para medir cloro libre, combinado y total; por ser un método muy sensible, detecta cantidades de cloro por abajo de 1mg/L.

2.- Método iodométrico= esta metodología se aplica para detectar cloro total por encima de 1mg/L en aguas tratadas y naturales.

Se recomienda que a nivel de laboratorio utilizar el método amperométrico (Block, *et al.*, 1971; Clesceri, *et al.*, 1989).

En la cloración del agua parte de la dosis de cloro disponible actuará sobre los microorganismos, mientras otra porción del cloro no será consumido; este cloro que no se consume recibe el nombre de cloro residual. La importancia de tener cloro residual al final del proceso de desinfección radica en que en caso de contaminación del agua potable, este cloro residual actuará para desinfectar de nueva cuenta. La diferencia entre la dosis de cloro disponible y el cloro residual, recibe el nombre de demanda de cloro (Block, *et al.*, 1971).

Es de mencionarse que al utilizar el cloro y sus derivados para desinfectar agua, si no es aplicado en una dosis adecuada este reacciona con ciertas sustancias orgánicas produciendo trihalometanos, cloroformo y otros compuestos residuales que son potencialmente carcinógenos (Trojan, *et al.*, 1989).

4.3 INTERACCIÓN ENTRE LA CÉLULA Y EL CLORO

En general se puede mencionar que la actividad del cloro sobre las células vegetativas es la lisis de la membrana celular y la acción destructiva sobre enzimas con grupos tiol (SH). El cloro y sus derivados se consideran como desinfectantes de medio nivel, ya que su acción sobre endosporas es restringido

(Block, *et al.*, 1971; Russell, 1993; Russell, *et al.*, 1982; Ledenberg, 1992).

Dentro del grupo de enzimas que el cloro ataca se pueden mencionar aquellas que intervienen en el proceso respiratorio, sobre todo en el proceso de oxidación de la glucosa. El daño que provoca el cloro en la membrana celular se da en la bomba de potasio, provocando una salida masiva del ion potasio, o causar una gran permeabilidad de la membrana celular, lo cual incrementa la entrada del ion; también puede ocurrir una combinación de ambas situaciones (Hass, *et al.*, 1976).

Un perjuicio más que provoca es en el proceso de síntesis de proteínas sobre todo en los pasos de transporte y transcripción de aminoácidos; también la autoreplicación de la molécula de ADN se daña al ocurrir mutaciones que impiden a la célula ser viable (*op. cit.*)

V. EL OZONO

5.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Otro desinfectante que actúa como oxidante es el ozono; fue descubierto en 1785 por Van Marum. La molécula de ozono es la forma alotrópica¹ del oxígeno; es un gas azulado inestable, tiene un olor picante. Su nombre es derivado de la palabra griega **ozein** que significa “oler”. Se forma fotoquímicamente en la estratosfera (entre 12872m y 24,135m) al interactuar la luz ultravioleta proveniente del Sol y el oxígeno; también ocurre la reacción contraria, el ozono absorbe las radiaciones ultravioleta volviendo al estado de oxígeno (Brink, *et al.*, 1991).

No fue hasta 1886 que de Meritens reconoció la capacidad desinfectante del ozono. A finales del siglo XIX, la firma alemana Siemens & Halske elaboró el primer equipo eléctrico productor de ozono; el cual fue utilizado para realizar pruebas de desinfección en agua para consumo humano en la planta de Martinikenfelde, Alemania. En 1891 Freulich reportó que el ozono había sido efectivo en la eliminación de bacterias en el agua de la planta (Brink, *et al.*, 1991; White, 1978).

La primera planta de agua potable que utilizó ozono fue la de Oudshoorn en Holanda en 1893, posteriormente se construyeron otras plantas en:

París, Francia 1888

Wiesbaden, Alemania 1901

Cataratas del Niágara, E.U. 1903

San Petesburgo, Rusia 1905

Nice, Francia 1906

(Brink, *et al.*, 1991).

¹ Alotropía: existencia en el mismo estado físico de 2 o más formas del mismo elemento.

Hacia 1915 en Europa se contaban con 49 plantas que usaban generadores de ozono. Este desinfectante fue utilizado con 2 fines:

- 1.- Realizar una labor de desinfección en agua para consumo humano.
- 2.- Eliminar olores y sabores.

En Inglaterra se instalaron pequeñas plantas de desinfección por ozono con el fin de tratar agua subterránea, ya que se consideraba inapropiado utilizar cloro (*op. cit.*).

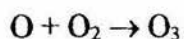
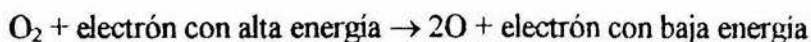
En los 60^{os} en Francia y Alemania se utilizaba el ozono para oxidar hierro y magnesio que se encontraban en el agua; igualmente fue utilizado para el tratamiento de aguas residuales. Así pues en los 60^{os} el proceso de ozonación se aplicó en las primeras fases del proceso de tratamiento; anteriormente solo se utilizaba en la última fase (*op. cit.*).

Es importante mencionar que el ozono tiene la capacidad de eliminar compuestos residuales, mencionando en este caso que con el descubrimiento en 1974 de los trihalometanos como productos residuales de la cloración, el ozono juega un papel importante en su eliminación. Debido a esta situación, en E.U. se le dio una mayor atención al uso del ozono en las plantas de agua potable a partir de los 70^{os}; siendo que el cloro ocupaba un papel preponderante en la desinfección del agua. Así pues para 1990 había en E.U. 40 plantas equipadas con ozonizadores, siendo la de Los Ángeles la 3^a más grande del mundo (*op. cit.*).

5.2 CARACTERÍSTICAS DE LA OZONACIÓN

Debido a sus propiedades como fuerte oxidante y su poder desinfectante el ozono es usado en industrias como la de bebidas, alimentos, criaderos de peces, enlatadoras de alimentos, aguas purificadas y plantas de tratamiento de agua.

Las formas comerciales más comunes de producir ozono es por medio fotoquímico, electrolítico y por medio de una descarga en corona; este último es el más utilizado en el tratamiento de grandes cantidades de agua. El ozono se puede formar en un ozonizador de este tipo a partir de descargas eléctricas de 4 000 a 30 000 volts sobre aire u oxígeno puro inyectado. Las descargas provocan que las moléculas de oxígeno se desdoblén; los átomos de oxígeno formados reaccionan con moléculas de oxígeno aun presentes formándose entonces el ozono; las reacciones son:



(Sintim, 1993).

Dentro de los factores que intervienen en la eficacia del ozono como desinfectante se encuentran:

- 1.- Temperatura; aunque el ozono pierde solubilidad en el agua con el incremento de la temperatura, su efecto desinfectante no es afectado ya que se incrementa la tasa de reacción con el sustrato.
- 2.- Turbidez; se ha comprobado que en valores de 1 a 5 Unidades Nefelométricas de Turbiedad, bacterias y virus no son capaces de resistir la capacidad desinfectante del ozono.
- 3.- pH; aunque a un pH entre 8 y 14 el ozono se descompone más rápidamente en solución acuosa, no es significativo la variación en cuanto el poder desinfectante del ozono contra bacterias.
- 4.- Dureza; la presencia de carbonatos en cantidades por arriba del valor estipulado para el agua para consumo humano provocará demanda de ozono (Bablon, *et al.*, 1991).

Dentro de las técnicas de medición de ozono en fase acuosa se puede mencionar el método colorimétrico de trisulfonato potásico de índigo, el cual permite medir cuantitativamente el ozono residual que se encuentra en el agua tratada; con este método se pueden medir valores hasta de 2ug/L. Al entrar en contacto el ozono con el colorante ocurre una decoloración; tal disminución en la intensidad del colorante es medida por absorbancia en un espectrofotómetro; un aumento en los valores de absorbancia es proporcional al aumento de ozono residual en el agua. Para poder conocer la concentración de ozono en fase gaseosa se utiliza una variante del método iodométrico (*op. cit.*).

5.3 INTERACCIÓN ENTRE LA CÉLULA Y EL OZONO

Muchos de los estudios hechos para observar las reacciones que ocurren entre el ozono y las biomoléculas que conforman a las células se han realizado en reactores batch, preparando soluciones del componente (carbohidratos, lípidos, proteínas, y bases de nucleótidos) y poniéndolas en contacto con otra solución que contiene una "X" concentración de ozono (Bablon, *et al.*, 1991).

La destrucción de bacterias por el ozono se considera una reacción de oxidación, siendo la membrana de las bacterias el primer sitio en ser atacado, actuando el ozono tanto en glicoproteínas como en glicolípidos ocurriendo también un aumento de la permeabilidad celular, dando pie a una lisis celular (Wolfe, *et al.*, 1989).

También el ozono actúa sobre las rutas enzimáticas de las bacterias, su actividad es sobre grupos sulfhidrilos de ciertas enzimas, pero a diferencia del cloro el ozono muestra ser un agente oxidante más potente. El ozono igualmente reacciona con el material nuclear, especialmente sobre las bases nitrogenadas (Wolfe, *et al.*, 1989; Bablon, *et al.*, 1991).

OBJETIVOS

General

Establecer el protocolo preliminar para desinfectar agua de suministro contaminada con

V. cholerae.

Particulares

- 1.- Buscar la concentración máxima de cloro disponible a la cual una cepa de *V. cholerae* se adapta *in vitro*.
- 2.- Demostrar *in vitro* la eficacia del ozono como desinfectante en agua superficial, contra una cepa de *V. cholerae*, adaptada a una concentración de cloro disponible.
- 3.- Demostrar *in vitro* la eficacia del hipoclorito de sodio como desinfectante en agua superficial, contra una cepa de *V. cholerae*, adaptada a una concentración de cloro disponible.

METODOLOGÍA

Se realizó en el laboratorio de Ingeniería ambiental del Instituto de Ingeniería (II) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el laboratorio de Bacteriología médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), el tratamiento de desinfección oxidación, utilizando como microorganismo a eliminar *V. cholerae*; como agentes bactericidas el cloro y el ozono; y como el agua a desinfectar se utilizó agua de manantial proveniente del Centro ecologista de Loreto y Peña Pobre, localizado en San Fernando 765, México, D.F.

Al agua de manantial se le aplicaron las pruebas de caracterización de:

- 1.- Cromatografía de iones.
- 2.- Coliformes totales.
- 3.- Turbidez.
- 4.- Carbono Orgánico Total (COT).
- 5.- Dureza.
- 6.- Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM).

utilizando las metodologías descritas en el Standard Methods (Clesceri, *et al.*, 1992).

Se diseñó la siguiente metodología que se dividió en tres etapas

PRIMERA ETAPA

Esta etapa se dividió en 2 fases y se realizaron en el IPN; en la fase 1 se procedió a realizar un trabajo de adaptación al cloro en las siguientes cepas:

- 1.- *V. cholerae* O1, biovar El Tor, serovar Ogawa, (CT) cuyo origen es agua residual de México (Popovic, *et al.*, 1993).
- 2.- *V. cholerae* no O1 1-ENCB.
- 3.- *V. cholerae* no O1 2-ENCB¹.

Fase 1

Para realizar tal adaptación se elaboró la siguiente metodología:

Se prepararon tres suspensiones celulares (cada una hecha a partir de un cultivo) que fueron ajustadas al tubo número 0.5 del nefelómetro de McFarland; de esta manera se obtuvo una estimación poblacional de 1×10^8 bacterias/mL en cada suspensión.

Se prepararon 3 series de 7 tubos con 3mL de caldo nutritivo (Oxoid) por tubo; (con duplicado) cada serie correspondió a una cepa. La serie de *V. cholerae* O1 fue inoculada con 20uL (por tubo) de una suspensión celular elaborada a partir de un cultivo de la misma cepa. De igual manera se procedió con las otras cepas.

¹ Las tres cepas se encontraban en tubos eppendorf los cuales contenían caldo nutritivo y glicerol en una proporción de 7:3; estos tubos se colocaron en una criocaja la cual se introdujo en un congelador (Baxter), el cual mantenía una temperatura de -70°C .

Después de haber inoculado las series (y su duplicado) se les aplicó a cada tubo una dosis de cloro disponible, para aplicar las dosis se utilizó una solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico (Clorox), cuya concentración de cloro disponible es de 60 000mg/L; después se dejó incubar por un periodo de 24 horas.

Cuadro 7

TUBO NÚMERO	DOSIS APLICADA DE CLORO DISPONIBLE (mg/L)
1	0
2	300
3	500
4	700
5	900
6	1100
7	1200

Al término de la incubación se verificó por turbidez en que tubos de las tres series, se dio la reproducción de la bacteria. El tubo que contenía la concentración subletal de cada serie se utilizó para elaborar una suspensión celular que se ajustó al tubo número 0.5 del nefelómetro de McFarland. A continuación con la suspensión celular se inoculó otras 3 series pero ahora fueron de 5 tubos (con duplicado); cada inóculo fue de 20uL.

Posteriormente se aplicó las siguientes dosis de cloro disponible por tubo a las 3 series.

Cuadro 8

TUBO NÚMERO	DOSIS APLICADA DE CLORO DISPONIBLE (mg/L)
1	0
2	700
3	800
4	900
5	1000

Esta metodología se repitió, hasta que alguna de las cepas se adaptó a la mayor concentración subletal de cloro disponible. Posteriormente el proceso continuó con tal cepa sucesivamente hasta que la concentración subletal de cloro disponible no cambió con los pases, lo que indicó que la cepa se adaptó a tal dosis aplicada de cloro disponible².

Fase 2

En esta fase se sustituyó al caldo nutritivo con el agua de manantial; se pretendió evitar la acción demandante de cloro que tiene la materia orgánica del caldo nutritivo. Para desarrollar esta fase se utilizó el mismo hipoclorito de sodio; con el se hizo una dilución en 50mL de agua de manantial estéril, para obtener una concentración de 100mg/L.

Después de conocerse cual de las tres cepas alcanzó la concentración subletal más alta en la fase 1, se utilizó un cultivo congelado de la cepa, para preparar una suspensión celular en 1mL de agua de manantial estéril, la suspensión se ajustó al tubo número 4 del nefelómetro de McFarland, así se tuvo una estimación poblacional de 12×10^8 bacterias/mL; esta suspensión se agitó en Vortex.

² Ver apéndice, diagrama de flujo 1

Posteriormente se procedió a trabajar con una microplaca estéril (Costar) de la siguiente manera:

utilizando una micropipeta P1000 (Socorex) al pozo número 1 de la línea A se le añadió 1.8mL de agua de manantial estéril, de los pozos 2 al 6 de la misma línea se les añadió solo 1mL; a continuación de la disolución de hipoclorito se tomó 0.2mL y se añadió al pozo 1A haciéndose una mezcla, para ello se utilizó una micropipeta P20 (Gilson). Después se tomó 1mL del pozo 1A y se añadió al pozo 2A y de igual manera se hizo una mezcla; este proceso se repitió hasta el pozo 6A. Posteriormente se tomaron con la micropipeta P20 alícuotas de 10uL de la suspensión celular elaborada y se añadieron a todos los pozos de la línea A. También se tuvo un pozo testigo, el 1B, el cual tuvo 1.8mL de agua de manantial estéril y 0.2mL de la suspensión bacteriana.

De esta manera se tenían 6 pozos experimentales que contenían las siguientes dosis aplicadas de cloro disponible.

Cuadro 9

POZO	Dosis aplicada de cloro disponible (mg/L)
1A	10
2A	5
3A	2.5
4A	1.25
5A	0.62
6A	0.31
1B	0

Se dejó actuar al cloro disponible por un lapso de 30 minutos, al término del cual se añadió 10uL de tiosulfato de sodio (Sigma) estéril al 1% a todos los pozos de la línea A y al pozo 1B; el tiosulfato de sodio tenía la función de neutralizar la actividad del cloro. Después se añadió con una micropipeta P200 (Gilson) 150uL de caldo nutritivo (Oxoid) a cada pozo trabajado. El pozo 1B tuvo como finalidad verificar que todas las sustancias utilizadas estuvieran estériles. Finalmente la microplaca se incubó a 37⁰C por 24 horas.

Se observó en que pozos al término de la incubación hubo crecimiento y se denominó concentración subletal a la dosis aplicada de cloro disponible anterior a la letal que permitió un crecimiento bacteriano.

El cultivo bacteriano que se encuentra en el pozo con la concentración subletal de cloro disponible se inoculó en un matraz erlenmeyer el cual contenía 150mL de caldo nutritivo, este cultivo se dejó incubar por 4 horas, al término del cual se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en agua de manantial estéril; a continuación se preparó una suspensión celular con 1mL de agua de manantial estéril, la cual se ajustó al tubo 4 del nefelómetro de McFarland, esta suspensión se agitó con Vortex; posteriormente se añadió al pozo 1C haciéndose una mezcla; finalmente se procedió a repetir los pasos descritos en el uso de la microplaca³.

Finalmente se siguieron realizando pases hasta que la cepa se adaptó a una dosis aplicada de cloro disponible. El cultivo adaptado se mantuvo en caldo cerebro-corazón y glicerol en una proporción de 7:3 a -70⁰C, hasta su uso posterior.

³ Ver apéndice, diagrama de flujo 2

SEGUNDA ETAPA

I.- A partir de un cultivo mantenido a -70°C de la cepa de *V. cholerae* que se adaptó a una dosis aplicada de cloro disponible en el agua de manantial (proceso realizado en la fase 2 de la primera etapa), se inocularon 800mL de caldo cerebro-corazón (Oxoid); este cultivo se dejó en una incubadora de agitación (New Brunswick Scientific) a 37°C por 4 horas.

Terminado el tiempo de incubación se vertió el caldo nutritivo en 16 tubos de centrifuga estériles de 50mL cada uno y se centrifugaron a 3 000 r.p.m. por 10 minutos, utilizando una centrífuga (International Centrifuge). Los paquetes celulares formados se resuspendieron con 500mL agua de manantial estéril y la suspensión se ajustó al tubo 4 del nefelómetro de McFarland, teniendo una estimación poblacional de 12×10^8 bacterias/mL. Esta suspensión se vertió dentro de un matraz de bola de 3 bocas, de una capacidad de 1000mL (Pirex); el cual recibió el nombre de **Reactor**.

II.- El ozono se creó a partir de un ozonador de descarga en corona (Emery Trailigaz) que utiliza oxígeno proveniente de un compresor de aire (Airsep). La concentración de ozono en fase gaseosa con que se trabajó fue de 45mg/L. Para determinar la concentración de ozono se realizó la medición de ozono con el método iodométrico modificado.

III.- El **Reactor** se colocó encima de un agitador magnético (Thermolyne), el cual tenía la función de mantener la suspensión celular en forma homogénea. Las bocas del **Reactor** se taparon con tapones de teflón estériles (ya que el ozono reacciona con el hule). Por una de las bocas del **Reactor** se burbujeó ozono a la concentración mencionada. Por otra boca se montó una manguera estéril (Tygon) la cual se conectó a una bomba (Master flex). De esta manguera se tomaron muestras experimentales (con duplicado) de 5mL los cuales se recogieron en viales (Wheaton) estériles de una capacidad de 8mL; estos viales contenían previamente 0.5mL de tiosulfato de sodio estéril (Baker) al 1%. Los tiempos en que se tomaron las muestras fueron de: 5, 10 y, 15 minutos.

IV.- Para determinar el ozono residual se realizó lo siguiente, a los mismos tiempos en que se recolectaban las muestras para los análisis microbiológicos, se tomaron muestras de 10mL del agua ozonada (suspensión celular) y se colocaron en matraces aforados de 100mL; cada matraz contenía 10mL de reactivo de índigo II; posteriormente se aforó con agua de manantial estéril. A cada matraz se le realizó el siguiente proceso, se tomó una muestra y se vertió en una cubeta y se realizó una lectura en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) a una absorbancia de 600nm^1 . Para elaborar el blanco se utilizó un matraz aforado de 100mL que contenía 10mL de reactivo de índigo II, este matraz se aforó con suspensión bacteriana sin ozonar (Clesceri, *et al.*, 1992).

V.- A cada muestra experimental (y duplicado) se le aplicó las técnicas de microdilución y de Miles-Misra modificada a continuación descritas. Se usó una microplaca estéril (Nucleon) para realizar la siguiente microdilución. En cada pozo numerado del 1 al 8 de la línea A se vertieron 90uL de agua de manantial estéril con una micropipeta P100 (Gilson); a continuación se vertió en el primer pozo de la línea A, 10uL de la muestra con una micropipeta P10 (Gilson), se hizo una mezcla y se tomó un inóculo de 10uL; el inóculo se colocó en una caja de Petri estéril con agar cuenta estándar (Bioxon); con anterioridad la base de la caja de Petri se dividió en 8 áreas; el inóculo proveniente del pozo 1 se colocó en el área 1 (Thornsberry, *et al.*, 1981; López, *et al.*, 1993).

¹ Ver apéndice, diagrama de flujo 3.

Posteriormente se tomó otro inóculo de 10uL del mismo pozo (1A) y se vertió en el pozo 2A; repitiéndose el proceso descrito para el pozo 1A. Esta metodología se continuó haciendo hasta llegar al pozo 8A. Al finalizar este proceso la caja de Petri que contenía los inóculos se incubó por 24 horas a 37⁰C; las colonias que aparecieron aisladas en cada área se contaron, y se reportaron relacionando el factor de dilución con las UFC/5mL.

VI.- Al realizarse las pruebas testigo se vertió una similar suspensión celular en el **Reactor**. Pero en este caso no se aplicó ozono. Las muestras testigo se recogieron de la misma manera y a los mismos tiempos que las experimentales; de igual manera se les aplicó el mismo análisis microbiológico².

VII.- Para identificar a *V. cholerae*, se tomaron inóculos del caldo nutritivo y se realizó un sembrado masivo en una caja de Petri la cual contenía agar cerebro-corazón (Bioxon), esta caja se incubó por 24 horas; al término del cual se tomó una muestra que sirvió para realizar un sembrado por estrías en una caja de Petri la cual contenía agar TCBS (Becton Dickson) y que se incubó por 24 horas a 37⁰C. Después del lapso de incubación se tomó una asada de las colonias aisladas del agar TCBS y se elaboró una tinción de Gram; del sembrado masivo se tomó una asada y se realizó la prueba de oxidasa. Por último se corrió una prueba de identificación en el sistema API 20E (Farmer III, *et al.*, 1985; Giono, *et al.*, 1993).

La metodología arriba descrita se repitió usando una concentración de ozono de 50mg/L en fase gaseosa. Esta etapa se realizó por triplicado con cada concentración.

² Ver apéndice, diagrama de flujo 4

TERCERA ETAPA

En este caso se utilizó un hipoclorito de sodio de calidad analítica (SIGMA) cuya concentración es de 10 000mg/L de cloro disponible; de este hipoclorito se tomó 1.5mL y se añadió al reactor, el cual se llenó con 500mL de una suspensión celular de *V. cholerae* (la elaboración se realizó de la misma manera que en la etapa 2) adaptada a la concentración de cloro disponible (proceso realizado en la fase 2 de la primera etapa); Al ocurrir la dilución del desinfectante en la suspensión se obtuvo una dosis aplicada de 30mg/L.

El **Reactor** se colocó encima de agitador magnético (Thermolyne). Sus bocas se taparon con tapones de teflón; en una de estas bocas se colocó una manguera estéril (Tygon) conectada a una bomba (Master flex); de esta manguera se tomaron muestras de 5mL, las cuales se colocaron en viales (Wheaton), que contenían 0.5mL de tiosulfato de sodio estéril (Baker) al 1%. Las muestras (con duplicado) se tomaron a los siguientes tiempos:

25, 30, y 35 minutos

posteriormente a las muestras (con duplicado) se les aplicó las técnicas de microdilución y Miles-Mirsna, descritas en la etapa dos.

Junto con la obtención de las muestras para los análisis microbiológicos, se tomaron muestras de 100mL las cuales se utilizaron para realizar la prueba amperométrica, con el fin de determinar el cloro residual¹ (Clesceri, *et al.*, 1992).

De igual manera que en la primera etapa se procedió a realizar pruebas testigo, siendo la metodología a utilizar la descrita en la etapa 2².

¹ Ver apéndice, diagrama de flujo 5.

² Ver apéndice, diagrama de flujo 4.

Todo el proceso arriba descrito también se hizo utilizando una dosis aplicada de 40mg/L, para lograr tal concentración de cloro disponible se vertió en la suspensión celular un volumen de 2mL de hipoclorito de sodio. Esta etapa se realizó por triplicado con cada dosis.

El análisis estadístico de los resultados de las etapas 2 y 3 se realizó utilizando la prueba de T de student, esta prueba estadística permite sugerir si los efectos de dos tratamientos experimentales realizados en poblaciones similares fueron parecidos o no (Scheffler, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa fase 1

Adaptación de las cepas de V. cholerae a una dosis de cloro disponible en caldo nutritivo

En esta fase se realizaron 8 pases, observándose que en los 3 primeros pases la cepa O1 manifestó una adaptación más consistente a la dosis aplicada de 800mg/L, mientras que las otras 2 cepas mantenían una adaptación no mayor a una dosis aplicada de 700mg/L. En base a lo anterior en los siguientes pases únicamente se trabajó con la cepa O1; después de 5 pases más la cepa O1 se adaptó a una dosis aplicada de 900mg/L (ver cuadro 1).

Cuadro que muestra la dosis de cloro aplicada en cada tubo.

Cuadro 1

Tubo	Dosis aplicada de cloro disponible mg/L	O1
1	0	+
2	850	+
3	900	+
4	950	-
5	1000	-

+ la bacteria creció en el medio.

- no hubo crecimiento de la bacteria.

fase 2

Adaptación de una cepa de V. cholerae a una dosis de cloro disponible en agua de manantial

En 2 semanas de trabajo la cepa *V. cholerae* O1 se adaptó a una dosis aplicada de 0.31mg/L de cloro disponible (ver cuadro 2). Al comparar este resultado con el resultado final obtenido en la primera fase se observa que la demanda de cloro disponible por parte del caldo nutritivo marca una diferencia notable en cuanto a la dosis de cloro disponible en la cual la cepa de *V. cholerae* O1 utilizada se adaptó; utilizando el agua de manantial

la cepa no creció en ningún pase a una dosis aplicada de 1.25mg/L, mientras que en caldo nutritivo su crecimiento se presentaba en una dosis aplicada de 300mg/L. La adaptación de la cepa O1 a una dosis aplicada de 0.31mg/L en agua fue menor a lo obtenido por Clark y colaboradores (Clark, *et al.*, 1994) ya que ellos encontraron UFC después de 30 minutos de contacto a una dosis aplicada de 0.5mg/L. Rice reporta una dosis aplicada mayor de adaptación (Rice, *et al.*, 1992) la cual es de 2mg/L, en un tiempo de contacto de 30 minutos; es de señalar que estos 2 trabajos fueron realizados con cepas que presentaban una morfología colonial rugosa, situación que expresa un antecedente de resistencia a condiciones ambientales adversas (Kaper, *et al.*, 1995; Colwell, *et al.*, 1992). La mayor resistencia de las cepas rugosas a condiciones ambientales desfavorables fue también detectado en estos 2 trabajos al comparar los resultados obtenidos de las cepas de morfología colonial con lo obtenido con cepas de morfología colonial lisa que fueron inactivadas por arriba de un 99% con las mismas dosis al mismo tiempo de contacto. Los resultados de Aparicio y colaboradores (Aparicio *et al.*, 1993) y Ridway y Olson (Ridway, *et al.*, 1982) muestran la adaptación de *S. aureus* y *Bacillus sp.* a una dosis aplicada de cloro de 10mg/L.

Cuadro que muestra la dosis de cloro aplicada en cada pozo.

Cuadro 2

Pozo	Dosis aplicada de cloro disponible mg/L	O1
1A	10	-
2A	5	-
3A	2.5	-
4A	1.25	-
5A	0.62	-
6A	0.31	+
1B	0	+

+ la bacteria creció en el medio.

- no hubo crecimiento de la bacteria.

Segunda etapa. Pruebas de desinfección con ozono utilizando agua de manantial y la cepa de *V. cholerae* adaptada en la fase 2 a una dosis aplicada de cloro disponible

En la segunda etapa se procedió a realizar el proceso de desinfección con ozono; los resultados de la prueba testigo muestran que la metodología y materiales utilizados permiten mantener un conteo de UFC estable durante los tiempos de muestreo; estas cuentas viables expresan que las UFC de la población de *V. cholerae* se mantenían en promedio en un valor de 10^6 (ver cuadro 3). Los promedios de los conteos de UFC por tiempo de muestreo expresados por medio de la curva logarítmica igualmente sugiere que tales conteos se mantienen estables durante los tiempos de muestreo, esto es entre 5 y 15 minutos (ver gráfica 1).

En la prueba de desinfección utilizando una concentración de ozono en fase gaseosa de 50mg/L, se obtuvieron cuentas viables que indican que conforme pasó el tiempo de contacto de 0 a 10 minutos el número de UFC de la población de *V. cholerae* disminuyó (ver cuadro 4). Tomando el promedio de las cuentas viables por cada tiempo de contacto para elaborar la curva logarítmica, se observa una disminución en el conteo de UFC conforme transcurría el tiempo de contacto en comparación con los conteos de la prueba testigo (ver gráfica 1) teniéndose a los 10 minutos de tiempo de contacto un porcentaje de muerte de 99.9999%. La disminución en el número de UFC en esta prueba también se observa en los valores de inactivación de la población de *V. cholerae*; conforme transcurría el tiempo de contacto la concentración de ozono residual aumentaba y el valor de inactivación de la población también aumentaba, llegando a 6log a los 10 y 15 minutos de tiempo de contacto, teniendo un ozono residual de 5mg/L y 6.6mg/L respectivamente, mientras que a los 5 minutos fue de 3.4mg/L con un valor de inactivación de 3.4log (ver cuadro 6).

Los datos de las cuentas viables de la prueba de desinfección con ozono a una concentración de 45mg/L en fase gaseosa, muestran una disminución del número de UFC comparándolos con los valores de la prueba testigo (ver cuadro 5). Los valores de ozono residual en esta prueba resultaron menores que en la prueba de desinfección de ozono a 50mg/L; la inactivación poblacional a los 5 minutos de tiempo de contacto fue de 0.8log con un ozono residual de 3mg/L, menor que 3.4mg/L que fue lo obtenido en la prueba de desinfección de ozono a 50mg/L; a los 10 y 15 minutos de tiempo de contacto los valores de inactivación fueron de 6log teniendo un ozono residual de 4.7mg/L y 6.5mg/L respectivamente (ver cuadro 6). La curva logarítmica elaborada con los promedios de las cuentas viables de UFC por tiempo de contacto indican que el porcentaje de muerte de la población de *V. cholerae* fue de 99.9999% a los 10 minutos de tiempo de contacto (ver gráfica 1).

Los resultados de la prueba de T de student ($\alpha = 0.05$) determinan lo siguiente, en el muestreo de 5 minutos para las pruebas de desinfección utilizando tanto una concentración de ozono en fase gaseosa de 45mg/L como de 50mg/L la t teórica no fue superada por la t calculada, por tanto no se rechaza la hipótesis nula. Esto indica que las cuentas viables de UFC a este tiempo de contacto entre la prueba testigo y las pruebas de desinfección de ozono a las concentraciones mencionadas no son significativamente diferentes, esto es, el tiempo de contacto que se requiere para eliminar de manera importante las UFC de la población de *V. cholerae* debe ser mayor.

En los muestreos de 10 y 15 minutos para las pruebas de desinfección utilizando tanto una concentración de ozono en fase gaseosa de 45mg/L como de 50mg/L la t teórica fue superada por la t calculada; por tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, lo cual indica que las cuentas viables de UFC a estos tiempos entre la prueba testigo y las pruebas de desinfección de ozono a las concentraciones mencionadas son significativamente diferentes, en otras palabras, el utilizar un tiempo de contacto de 10 minutos con concentraciones de ozono en fase gaseosa de 45mg/L y 50mg/L permite la eliminación de las UFC de la población de *V. cholerae* en una cantidad substancial.

De los resultados obtenidos (tanto las pruebas testigo como las de desinfección de la segunda y tercera etapa) se obtuvieron promedios; posteriormente se cambiaron los valores exponenciales por \log_{10} , con el fin de elaborar las gráficas.

Promedios de las cuentas viables a los tiempos de muestreo indicados en la prueba testigo de la segunda etapa

Cuadro 3

tiempo (min)	resultados en forma exponencial	\log_{10}
5	4.00E+06	6.4
10	8.60E+06	6.8
15	1.40E+07	6.7

Promedios de las cuentas viables a los tiempos de contacto indicados en la prueba de desinfección a una concentración de ozono en fase gaseosa de 50mg/L.
(utilizando en el tiempo 0 el promedio total de las cuentas viables de la prueba testigo)

Cuadro 4

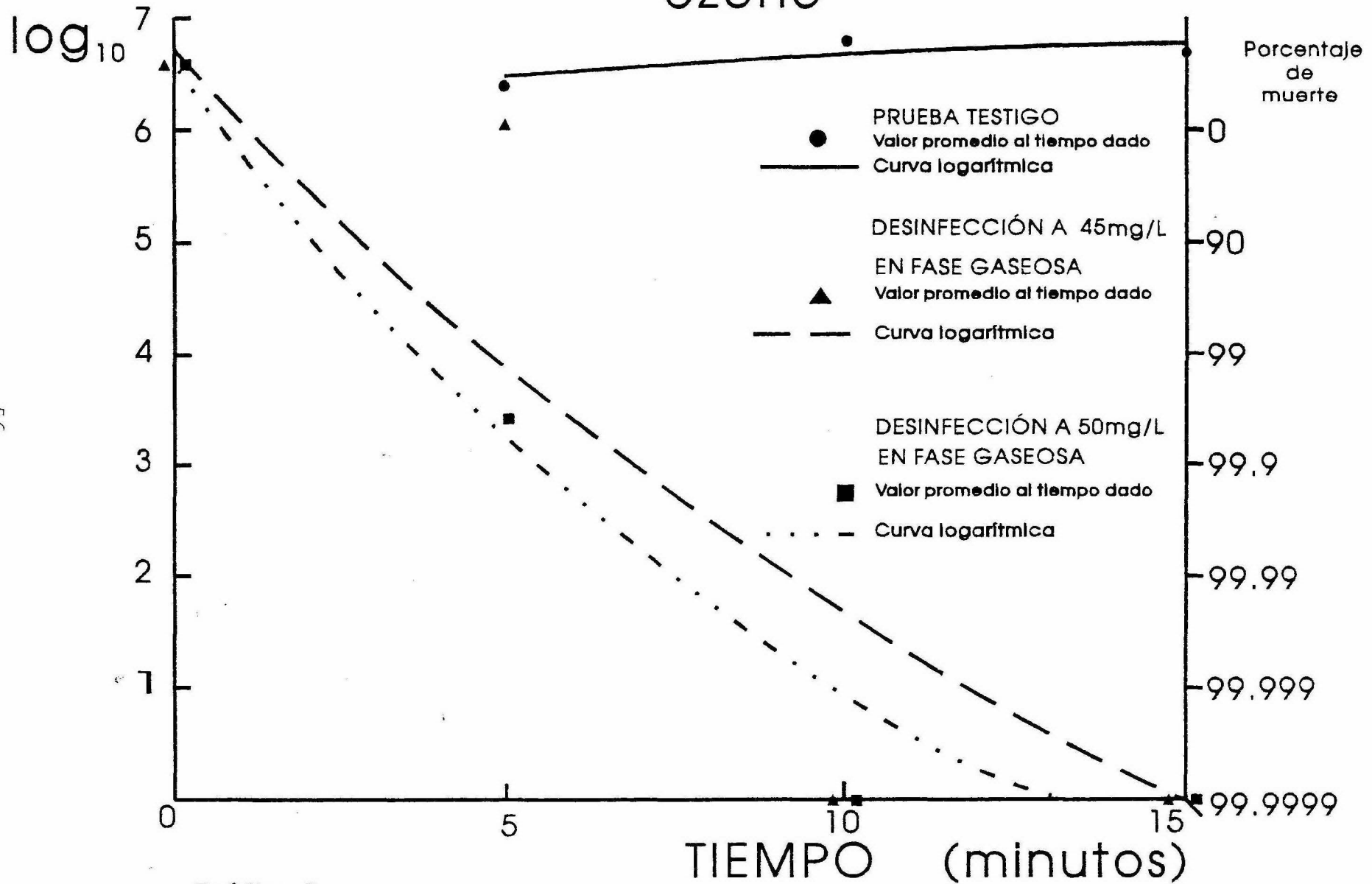
tiempo (min)	resultados en forma exponencial	\log_{10}
0	7.70E+06	6.6
5	2.70E+03	3.4
10	0	0
15	0	0

Promedios de las cuentas viables a los tiempos de contacto indicados en las pruebas de desinfección a una concentración de ozono en fase gaseosa de 45mg/L.
(utilizando en el tiempo 0 el promedio total de las cuentas viables de la prueba testigo)

Cuadro 5

tiempo (min)	resultados en forma exponencial	\log_{10}
0	7.70E+06	6.6
5	1.10E+06	6.06
10	0	0
15	0	0

Gráfica de las pruebas de desinfección con ozono



Gráfica 1

Cuadro que ejemplifica la relación entre el ozono residual y la disminución poblacional de *V. cholerae* expresada en \log_{10} .

Cuadro 6

tiempo de contacto (min)	concentración de ozono en fase gaseosa (mg/L)	promedios de ozono residual (mg/L)	inactivación ($\log_{10}N/N_0$)*
5	45	3	0.8
10	45	4.7	6
15	45	6.5	6
5	50	3.4	3.4
10	50	5	6
15	50	6.6	6

*N: población de *V. cholerae* al tiempo de contacto indicado.

N_0 : población de *V. cholerae* al tiempo 0.

Las concentraciones de ozono en fase gaseosa de 45mg/L y 50mg/L utilizadas en este experimento son valores mayores a los mencionados por Kott y colaboradores (Kott, *et al.*, 1980); aunque cabe mencionar que estos autores no especifican si los valores de ozono que reportan son concentraciones en fase gaseosa o dosis de transferencia. También se observa que las concentraciones de las suspensiones celulares con que trabajaron son menores a las utilizadas en este trabajo, esto permite utilizar concentraciones de ozono en menor cantidad (Russell, *et al.*, 1982). El porcentaje de muerte de las poblaciones de coliformes fecales, *S. fecalis*, Colifagos y Poliovirus que reportan son similares a los encontrados en este trabajo la excepción sería al utilizar la concentración de ozono de 10.2mg/L en contra de la suspensión celular de *S. fecalis*, ya que reportan un porcentaje de muerte de 86.40%.

El pH de la suspensión celular con que se trabajó en este experimento tuvo en todas sus pruebas una ligera alcalinidad (entre 7.5 y 8.5) lo cual permite la sobrevivencia de la bacteria del cólera (Sakazaki, 1992); este valor de pH según lo reportado en la bibliografía no provoca interferencia en la actividad desinfectante del ozono (Bablon, *et al.*, 1991). Con respecto a la temperatura, en la suspensión celular en todas las pruebas mantuvo un valor alrededor de 10⁰C, dicho valor facilita la sobrevivencia de la bacteria y no afecta la actividad desinfectante del ozono (Bablon, *et al.*, 1991). El obtener una presencia negativa de colonias de *V. cholerae* en las cuentas viables después del proceso de desinfección con ozono en concentración en fase gaseosa en un tiempo de contacto de 10 minutos expresa que el agua de manantial después de ser desinfectada cumple con la Norma Oficial Mexicana del agua purificada en el punto para *V. cholerae* (SSA, 1991; Joklik, 1992).

Tercera etapa. Pruebas de desinfección con hipoclorito de sodio, utilizando agua de manantial y la cepa de *V. cholerae* adaptada en la fase 2 a una dosis de cloro disponible.

La tercera etapa consistió en realizar un proceso de desinfección utilizando hipoclorito de sodio. La prueba testigo mostró que las cuentas viables de UFC mantenían un valor consistente de 10^6 en promedio durante los tiempos de muestreo (ver cuadro 7), esto es, a los 25, 30 y 35 minutos; lo anterior indica que tanto los tiempos de muestreo, la metodología y materiales permiten tener un conteo de UFC estable en la población de *V. cholerae*. Al elaborar la regresión lineal con los promedios de las cuentas viables por tiempo de muestreo también indica la estabilidad de los conteos de UFC entre los 25 y 30 minutos (ver gráfica 2).

Al realizar la prueba de desinfección utilizando una dosis aplicada de 30mg/L de cloro disponible las cuentas viables muestran que hubo una disminución en el número de UFC al compararlas con los valores de las cuentas viables de la prueba testigo (ver cuadro 8). Elaborando la regresión lineal con los promedios de las cuentas viables de UFC por cada tiempo de contacto se observa que el porcentaje de muerte de la población de *V. cholerae* a los 35 minutos de tiempo de contacto fue poco mayor de 99.9% (ver gráfica 2).

Expresado esto por medio de los valores de inactivación de la población se observa un aumento de dichos valores conforme transcurría el tiempo de contacto. A los 25 minutos la inactivación fue de 0.2log, mientras que a los 30 minutos fue de 2.3log, finalmente a los 35 minutos la inactivación poblacional fue de 3.7log (ver cuadro 10).

Llevando a cabo la prueba de desinfección con una dosis de cloro disponible de 40mg/L, las cuentas viables de UFC indican una disminución en su número en comparación con las obtenidas en la prueba testigo (ver cuadro 9). La regresión lineal hecha con los promedios de las cuentas viables de UFC por tiempo de contacto indican que hubo un porcentaje de muerte de la población de *V. cholerae* en un 99.9999% en comparación con lo observado en la prueba testigo (ver gráfica 2). Los valores de inactivación de esta prueba muestran un aumento conforme transcurría el tiempo de contacto; a diferencia de la prueba de desinfección a una dosis de cloro aplicada de 30mg/L a los 35 minutos de tiempo de contacto se alcanzó un valor de inactivación de 6log (ver cuadro 10).

Al elaborar la prueba de T de student ($\alpha = 0.05$) se obtuvo lo siguiente, en el muestreo de 25 minutos para la dosis aplicada de cloro disponible a 30mg/L la t teórica no fue superada por la t calculada, por tanto no se rechaza la hipótesis nula. Esto indica que las cuentas viables de UFC con la prueba de desinfección a la dosis mencionada y tiempo citado no son significativamente diferentes de la determinada en la prueba testigo en el mismo tiempo; lo cual quiere decir que en tal tiempo de contacto y tal dosis aplicada la eliminación de UFC de la población de *V. cholerae* es mínima.

En el muestreo de 25 minutos para la dosis aplicada de cloro disponible de 40mg/L y en los tiempos de muestreo de 30 y 35 minutos para ambas dosis la t teórica fue superada por la t calculada, por tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa; de esta manera se determina que las cuentas viables de UFC entre la prueba testigo y las pruebas de desinfección a las dosis y tiempos mencionados son significativamente diferentes. Esto indica que en un tiempo de contacto de 25 minutos con una dosis aplicada de 40mg/L y en un tiempo de contacto de 30 minutos con una dosis aplicada de 30mg/L la eliminación de UFC de la población de *V. cholerae* se da de manera importante.

Promedios de las cuentas viables a los tiempos de muestreo indicados en la prueba testigo de la tercera etapa.

Cuadro 7

tiempo (min)	resultados en forma exponencial	log ₁₀
25	2.00E+06	6.3
30	2.10E+06	6.38
35	4.80E+06	6.6

Promedios de las cuentas viables a los tiempos de contacto indicados en las pruebas de desinfección a una dosis aplicada de hipoclorito de sodio de 30mg/L.

(en el tiempo 0 se utilizó el promedio total de las cuentas viables de la prueba testigo)

Cuadro 8

tiempo (min)	resultados en forma exponencial	log ₁₀
0	3.00E+06	6.3
25	1.76E+06	6.2
30	1.35E+04	4.1
35	5.66E+02	2.7

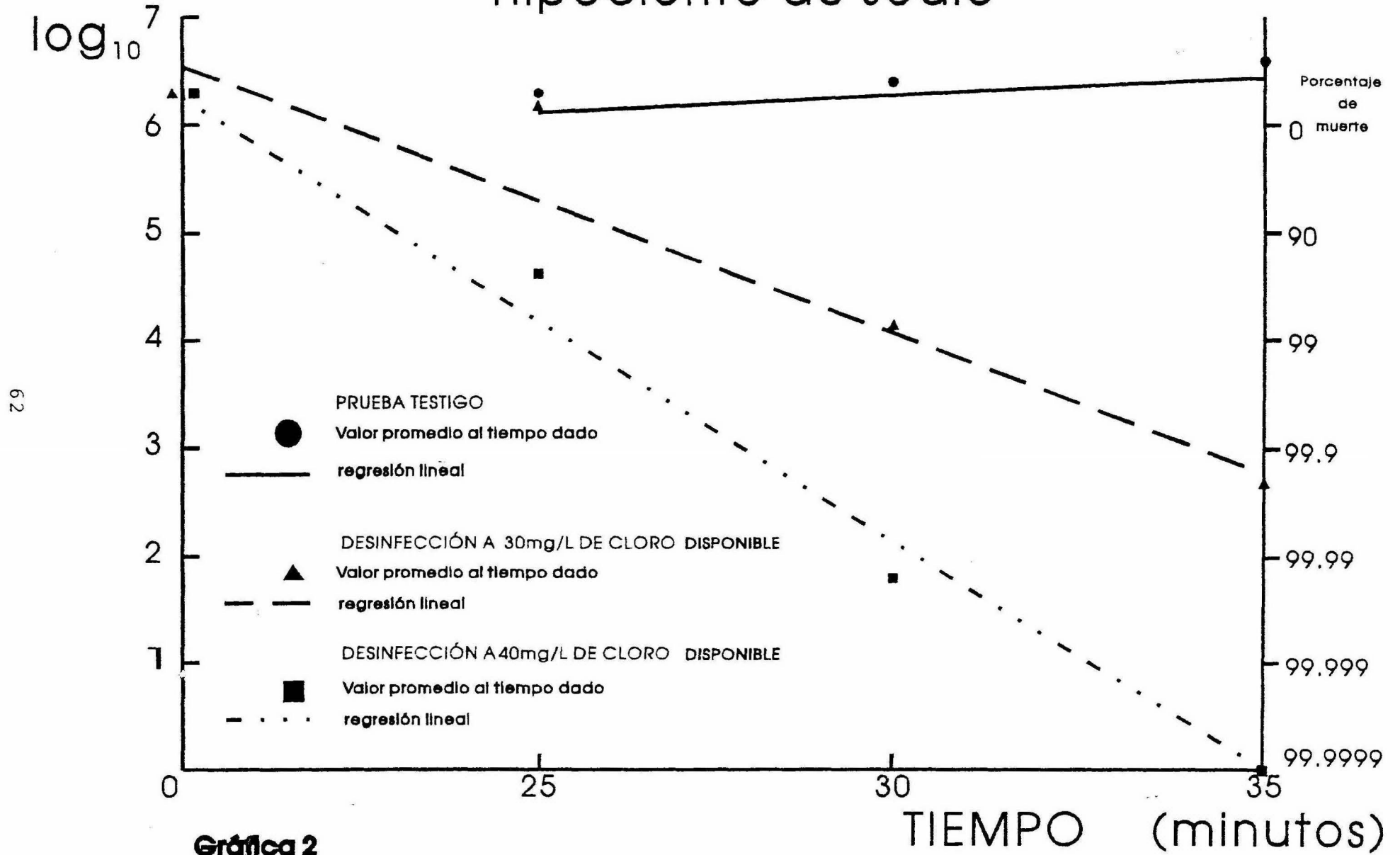
Promedios de las cuentas viables a los tiempos de contacto indicados en las pruebas de desinfección a una dosis aplicada de hipoclorito de sodio de 40mg/L.

(en el tiempo 0 se utilizó el promedio total de las cuentas viables de la prueba testigo)

Cuadro 9

tiempo (min)	resultados en forma exponencial	log ₁₀
0	3.00E+06	6.3
25	4.5E+04	4.6
30	7.6E+01	1.8
35	0	0

Gráfica de las pruebas de desinfección con hipoclorito de sodio



62

Gráfica 2

Cuadro que ejemplifica la relación entre el cloro residual y la disminución poblacional de *V. cholerae* expresada en \log_{10} .

Cuadro 10

tiempo de contacto (min)	dosis de hipoclorito de sodio aplicada (mg/L)	promedios de cloro residual (mg/L)	inactivación ($\log N/N_0$)*
25	30	3	0.2
30	30	2.5	2.3
35	30	2	3.7
25	35	2	1.8
30	35	2.5	4.5
35	35	2	6

*N: población de *V. cholerae* al tiempo de contacto indicado.

N_0 : población de *V. cholerae* al tiempo 0.

La dosis aplicada de cloro a 40mg/L permitió inactivar en más de un 99% las UFC de la población de *V. cholerae*, este resultado es similar a lo encontrado por Rodda y colaboradores (Rodda, *et al.*, 1993) y Kott y colaboradores (Kott, *et al.*, 1980) los primeros autores utilizaron dosis mayores (entre 14 000 y 25 000mg/L) lo cual posibilitó en tiempo de contacto de 4 minutos eliminar las UFC de la población de *V. cholerae* en más de un 99%; en este trabajo se necesitó un tiempo de contacto de 35 minutos. En el trabajo de Kott reportan que utilizando una dosis aplicada de cloro (10.2mg/L) menor a lo reportado en este trabajo (40mg/L) en un tiempo de contacto menor a 35 minutos es posible inactivar una población de microorganismos patógenos; cabe mencionar que las concentraciones de microorganismos viables que mencionan en sus suspensiones celulares son menores (alrededor de 10^2) a las reportadas en este trabajo, tal hecho facilita el utilizar dosis de un desinfectante en menor cantidad (Russell, *et al.*, 1982)

El pH de la suspensión celular de 7.7 sugiere la aparición del ácido hipocloroso en un porcentaje alrededor del 40%, siendo esto importante en la efectividad del cloro como desinfectante (AWWA, 1973). El trabajar con este pH es congruente con lo reportado por Seyfried y Fraser (Seyfred, *et al.*, 1980) investigadores que reportaron la presencia de *P. aeuroginosa* por encima de 2400 UFC/100mL en agua de alberca que contenía un cloro residual de 1mg/L y un pH de 8.4; se interpreta que en dicho valor de pH la presencia del ácido hipocloroso debe estar por abajo del 20%, situación que provoca una disminución notable en la efectividad del cloro como desinfectante (AWWA, 1973). También se debe resaltar el hecho de que la presencia de semejante cantidad de UFC de *P. aeuroginosa* en un agua que contiene un valor de cloro residual de 1mg/L contradice el valor de cloro residual estipulado en el proyecto de la Norma Oficial Mexicana del agua potable, que establece un rango entre 0.5 y 1mg/L para mantener potable el agua (SSA, 1994)

La temperatura en la suspensión celular en todas las pruebas testigo y de desinfección no afecto la viabilidad de la bacteria del cólera, según lo expresado en las pruebas testigo. El resultado de las cuentas viables obtenidas en la prueba de desinfección a una dosis aplicada de 40mg/L en un tiempo de contacto de 35 minutos expresan que los valores de UFC de *V. cholerae* son aceptables dentro de la Norma Oficial Mexicana para el agua purificada (SSA, 1991; Joklik, 1992). Aunque el valor de cloro residual fue más alto que el estipulado en el proyecto de la Norma Oficial Mexicana del agua potable; es necesario recalcar el hecho de que si no se toma en cuenta la cantidad de materia orgánica que este presente en el agua a desinfectar se podrían formar compuestos carcinógenos (SSA, 1994; Troyan, *et al.*, 1989).

Los valores de turbidez y dureza detectados en el agua de manantial (ver cuadro 11) sugieren que no deben interferir con la actividad desinfectante tanto del ozono como del cloro por encontrarse por debajo de los valores estipulados por la OPS (OPS, 1985). También el valor de Carbono Orgánico Total (ver cuadro 11) determinado en el agua de manantial se encuentra por debajo del valor de 30mg/L para un agua residual tratada, este valor determinado por tanto no debe provocar interferencia en la actividad desinfectante del ozono y del cloro

Valores promedio de las pruebas fisicoquímicas, de cromatografía de iones y coliformes totales determinados en el agua de manantial y la suspensión celular.

Cuadro 11

Parámetro	Valor promedio determinado
Total de sólidos disueltos	0.098mg/L
Turbidez	0.28 UNT
pH de la suspensión celular	7.7
Temperatura de la suspensión celular	10 ⁰ C
Carbono Orgánico Total	5mg/L
Dureza	64mg/L
Sustancias Activas al Azul de Metileno	< .125mg/L
Cromatografía de iones	
Cloruros	0.0126mg/mL
Sulfatos	0.0163mg/mL
Nitratos	0.0137mg/mL
Coliformes totales (antes de esterilizar el agua)	0

CONCLUSIONES

Se demostró que la cepa de *V. cholerae* O1, biovar El Tor, serovar Ogawa (CT) es una bacteria que tiene la capacidad de adaptarse y mantenerse viable en agua de manantial a la cual se le aplique una dosis de cloro disponible de 0.31mg/L.

El hipoclorito de sodio utilizado en pruebas *in vitro* a una dosis de 40mg/L durante 35 minutos de tiempo de contacto, en un pH de 7.7 y a una temperatura de 10⁰C permite eliminar en un 99.9999% una población de *V. cholerae* O1, biovar El Tor, serovar Ogawa (CT) que contenga una concentración de 10⁶ UFC y que esté adaptada a una dosis aplicada de cloro disponible de 0.31mg/L.

El ozono se manifiesta como alternativa de desinfección *in vitro*; usando una concentración de ozono en fase gaseosa de 45 y 50mg/L durante 10 minutos de tiempo de contacto a un pH de 7.7 y a una temperatura de 10⁰C puede eliminar una población de *V. cholerae* O1, biovar El Tor, serovar Ogawa (CT) que contenga una concentración de 10⁶ UFC y que esté adaptada a una dosis aplicada de cloro disponible de 0.31mg/L.

La desinfección de agua de suministro contaminada con *V. cholerae* utilizando ozono e hipoclorito de sodio es factible; fue posible establecer valores iniciales de tiempo de contacto y concentración en fase gaseosa en el caso del ozono y dosis aplicada para el cloro que permitieron eliminar UFC de la población de dicha bacteria.

Se sugiere el hecho de seguir la investigación para determinar si el tiempo de contacto y dosis aplicada (concentración en fase gaseosa en el caso del ozono) permiten la eliminación de microorganismos viables en poblaciones de otros patógenos entéricos como son *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y Poliovirus que no solo se encuentren en agua para consumo humano, sino en agua residual tratada que podría ser destinada para irrigar plantaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- *American Water Works Association, (several). 1973. *Manual of water supply practices, Water chlorination, Principles and Practices*. American Water Works Association (AWWA). USA. pp. 1-43.
- *Aparicio, G.O., Avilés, F.J., Ribas, R.M.A., y Osorio, L.C. 1993. "Estudio de 2 métodos para evaluar la actividad desinfectante del hipoclorito de sodio sobre Staphylococcus aureus". *Bioquimia*. 1(69):43-47.
- *Bablon, G., Bellamy, W.D., Billen, G., Bourbigot, M.M., Daniel, F.B., Erb, F., Gomella, C., Gordon, G., Hatemann, P., Joret, J.C., Knocke, W.R., Langlais, B., Laplanche, A., Legube, B., Lykins, Jr. B., Martin, N., Montiel, A., Morin, M.F., Miltner, R.S., Perrine, D., Prévost, M., Reckhow, D.A., Servais, P., Singer, P.C., Sproul, O.J., and Ventresque, C. 1991. "Practical application of ozone". In *Ozone in water treatment*, Langlais, B., (ed.). American Water Works Association (AWWA) and Lewis Publishers. USA. pp. 218-272.
- *Barua, D. 1992. "History of cholera", In *Cholera*. Barua, D., and Greenough III B.W., (eds). Plenum Medical Book Company. USA. pp. 1-35.
- *Baumann, P., and Schubert, R.H.W. 1984. Family II. "Vibrionacea" Veron 1965, 5245^{AL}, In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holt, J.G., (ed.). Williams & Wilkins. Baltimore. 1:516-535.
- *Block, S.S., and Lawrence, C.A., (eds). 1971. *Disinfection Sterilization and Preservation*. Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 9-11, 15-22, 32-42, 278-300.
- *Brink, D.R., Langlais, B., and Reckhow, D.A. 1991. "Introduction". In *Ozone in water treatment*. Langlais, B., (ed.). American Water Works Association, and Lewis Publishers. USA. pp. 1-10.
- *Calia, E.K., Murtagh, M., Ferraro, M.J., y Calderwood, B.S. 1994. "Comparación de Vibrio cholerae O1 biotipos Clásico y El Tor". *Boletín cólera/Diarreas infecciosas*. Trad. Rodríguez, A.M.G., y Giono, C.S. Dirección General de Epidemiología. 4(5):519-522.

*Clark, M.R., Rice, W.E., Pierce, K.B., Johnson, H.C., and Fox, R.K. 1994. "Effect of agregation on Vibrio cholerae inactivation". *J. Environ. Engin.* EPA/600/J-94/364 paper 7141. 120(4): 875-887.

*Clesceri, L., Greenberg, A., and Trussell, R. 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation. Washington. 18th ed. pp. 2-8 a 2-9, 2-35 a 2-38, 2-40 a 2-41, 4-36 a 4-41, 4-105 a 4-107, 5-10 a 5-12, 9-1 a 9-101.

*Colwell, R.R., and Spira, W.M. 1992. "The ecology of Vibrio cholerae". In *Cholera*. Barua, D., and Greenough, B.W., (eds.). Plenum Medical Company. USA. pp. 107-123.

*Craun, G., Swerdlow, D., Tauxe, R., Clark, R., Fox, K., Geldreich, E., Reasoner, D., and Rice, E. 1991. "Prevention of waterborne cholera in the United States". *JAWWA*. 83 (11):40-45.

*de Castro, J.F. 1991. "El cólera un problema no resuelto". *Ciencias*. 24:33-41.

*DIFCO, (several). 1984. *DIFCO Manual dehydrated culture media and reagents for microbiology*. DIFCO Laboratories. USA. pp. 930-931.

*Dirección General de Epidemiología, (varios). 1995. *Epidemiología*. Dirección General de Epidemiología, SSA. semana 45. 12(20):7.

*Equihua, L., Jiménez, B., Cortés, J., Ramírez, P., y Memije, P. 1992. *El cólera como enfermedad diarreica*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). México. 2^a ed. vol. 1. pp. 1-22, 26-27, 30.

*Farmer III, J.J., Hickman, B.F.W., and Kelly, M.T. 1985. "Vibrio". In *Manual of Clinical Microbiology*. Lennette, E.H., (ed.). American Society for Microbiology. USA. 4th ed. pp. 282-301.

*Favero, M.S., and Bond, W.W. 1993. "The use of liquid chemical germicidal". In *Sterilization Technology*. Morrissey, R.F., and Briggs, G. P., (eds.). Van Nostrand Reinhold. Canada. pp. 309-317.

*Feachmen, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H., and Mara, D. 1983. *Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management*. World Bank and John Wiley & Sons. Great Britain. pp. 297-322.

- *Feachmen, R.G., Miller, C., and Drasar, B. 1981. "Occurrence and survival of *Vibrio cholerae* in the environment". *Trop. Dis. Bull.* 78(10):865-880.
- *Figueroa, A.P., García, L.H., Chávez, R.K., Gutiérrez, C.L., y Valdespino, G.J.L. 1994. "*Vibrio cholerae* no O1 toxigenico involucrado en brotes de diarrea". *Boletín cólera/Diarreas infecciosas.* 4(1):440-450.
- *Freeman, B.A. 1986. *Microbiología de Burrows.* Interamericana. Madrid. 22 ed. pp. 139-153, 551-564.
- *Giono, C.S., Escobar, G.A., y Valdespino, J.L., (eds.). 1993. *Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales.* Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). México. pp. III-2-16 a III-2-18, III-9-1 a III-9-59.
- *Glass, R.Y., and Black, R.E. 1992. "The epidemiology of cholera". In *Cholera.* Barua, D., and Greenough III, B.W, (eds.). Plenum Medical Book Company. USA. pp. 129-150.
- *Hass, N.C., and Engelbrecht, S.R. 1980. "Physiological alterations of vegetative microorganism resulting from chlorination". *JWPCF.* 52(7):1976-1989.
- *Hirschhorn, N., and Greenough III, W.B. 1971. "Cholera". *Sci. Am.* 225:15-21.
- *Joklik, W.K., (ed.). 1992. *Zinsser Microbiology.* Apleton Lange. pp. 556-575.
- *Kaper, J.B., Morris, G.J., and Levine, M.M. 1995. "Cholera". *Clin. Microbiol. Rev.* 8(1): 48-86.
- *Kott, Y., Vinokur, L., and Ben-Ari, H. 1980. "Combined effects of disinfectants on bacteria and viruses" In *Water chlorination, Environmental Impact and Health effects.* ANN Arbor Science. USA. pp. 677-687.
- *Kumate, J., Sepúlveda, J., y Gutiérrez, G. 1993. *El cólera.* Interamericana y McGraw Hill. México. pp. 3-52, 88, 93-106, 178-183.
- *Lederberg, J., (ed.). 1992. *Encyclopedia of Microbiology.* Academic Press. USA. vol. 4. pp. 393-394.

- *López, A.R., Ruíz, A.D., Eusebio H.M.G., Fernández, R.E., Mota, G.L., Quiñonez, R.E.I., y Rodríguez, M.R. 1993. *Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria*. López, A.R., Fernández, R.E., y Rodríguez, M.R., (eds.). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). México. pp. 14-28.
- *Organización Panamericana de la Salud, (varios). 1985. *Guías para la calidad del agua potable*. Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). USA. vols. 1 y 2.
- *Popovic, T., Bopp, Ch., Olsvik, O., and Wachsmuth, K. 1993. "Epidemiologic application of a standardized of ribotype scheme for Vibrio cholerae O1". *J. Clin. Microbiol.* 31(9):2474-2482.
- *Rice, E.W., Johnson, C.J., Clark, R.M., Fox, K.R., Reasoner, D.J., Dunnigan, M.E., Panigrahi, P., Johnson, J.A., and Morris, J.G. 1992. "Chlorine and survival of rugose Vibrio cholerae". *Lancet*. 340:740.
- *Ridway, H.F., and Olson, B.H. 1982. "Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems". *App. Environ. Microbiol.* 44(4):972-987.
- *Rodda, N., Bateman, B., and Kfir, R. 1993. "Removal of Salmonella thyphi, Shigella disenteriae, Vibrio cholerae, and Rotavirus from water using a water treatment tablet". *Wat. Sci. Tech.* 27(3-4):347-350.
- *Rodríguez, A.G., Giono, C.S., Cortés, O.Y., y Valdespino, J.L. 1994. "Caracterización de una cepa mexicana hemolítica de Vibrio cholerae O1 que presenta morfología colonial lisa y rugosa". *Boletín cólera/Diarreas infecciosas* 4(1):447-450.
- *Russell, A.D. 1993. "Theoretical aspects of microbial inactivation". In *Sterilization Technology*. Morrisey, R.F., and Briggs, G. P., (eds.). Van Nostrand Reinhold. Canada. pp. 3-7.
- *Russell, A.D., Hugo, W.B., and Ayliffe, G.A. (eds.). 1982. *Principles and practice of disinfection preservation and sterilization*. Blackwell Scientific Publications. London. pp. 112-117, 124-126, 136-144, 160-176.
- *Sakazaki, R. 1992. "Bacteriology of Vibrio and related". In *Cholera*. Barua, D., and Greenough, III B.W., (eds.). Plenum Medical Book Company. USA. pp. 37-54.

- *Sánchez, P.S. 1991. *Manual de métodos de aislamiento e identificación de Vibrio cholerae en aguas*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental. México. pp. 1-8, 20-40.
- *Scheffler, W.C. 1981. *Bioestadística*. Fondo Educativo Interamericano. México. pp. 193-212.
- *Secretaría de Salud, (varios). 1991. *Norma Técnica número 339 para la prevención, control, manejo y tratamiento del cólera*. Secretaría de Salud (SSA). México.
- *Secretaría de Salud, (varios). 1991. *Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993, Bienes y servicios. Agua purificada*. Secretaría de Salud (SSA). México.
- *Secretaría de Salud, (varios). 1994. *Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*. Secretaría de Salud (SSA). México.
- *Seyfried P.L., and Fraser, D.J. 1980. "Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated swimming pools". *Can. J. Microbiol.* 26:350-355.
- *Sintim, D.K. 1993. "Other gaseous sterilization methods". In *Sterilization Technology*. Morrisey, R.F., and Briggs, G. P., (eds.). Van Nostrand Reinhold. Canada. pp. 342-344.
- *Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., e Ingraham, J.L. 1986. *Microbiología*. REPLA. España. pp. 33-34, 295, 600-602, 778-779.
- *Tamplin, M.L. 1991. "Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Peru". *Lancet*. 338:1216-1217.
- *Thornsberry, C., and Baker, C. N. 1981. "Antimicrobial susceptibility tests for bacteria". In *Diagnostic bacterial, mycotic and Parasitic Infections*. 6a ed. Balows, A., and Hausler, W. J., (eds.). Interdisciplinary Books & Periodicals and American Public Health Association. USA. pp. 747-759.
- *Trojan, J.J., and Hansen, S.P. 1989. *Treatment of microbial contaminants in potable water supplied technologies and costs*. Noyes Data Corporation. USA. pp. 103-121, 135-143.
- *Valdespino, J.L., García, M.L., Sarti, E., y Sepúlveda, J. 1991. "Epidemia del cólera en América". *Ciencia y Desarrollo*. 17:55-64.

*White, C. 1978. *Disinfection of wastewater and water for reuses*. Van Nostrand Reinhold, USA. pp. 316-359.

*Wolfe, R.L., Stewart, M.H., Liang, S., McGuire, M.J. 1989. "Disinfection of model indicator organisms in a drinking water pilot plant by using peroxono". *App. Environ. Microbiol.* 55(9):2230-2241.

*World Health Organization, (several). 1993. "Epidemic diarrhoea due to Vibrio cholerae non O1". *Weekly epidemiological record.* 68:141-142.

APÉNDICE

Prueba de T student para las pruebas de desinfección usando ozono

La t calculada en todos los casos es para una docima bilateral y con un nivel de significancia de 0.05.

H_0 = no existe diferencia significativa entre los conteos de UFC de *V. cholerae* de la prueba testigo y las pruebas de ozonación.

H_A = existe diferencia significativa entre los conteos de UFC de *V. cholerae* de la prueba testigo y las pruebas de ozonación.

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 45mg/L

5 minutos de contacto

t_0 :0.417

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 50mg/L

5 minutos de contacto

t_0 :1.488

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 45mg/L

10 minutos de contacto

t_0 :4.628

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 50mg/L

10 minutos de contacto

t_0 :4.628

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 45mg/L

15 minutos de contacto

t_0 :5.565

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de ozonación a 50mg/L

15 minutos de contacto

t_0 :5.565

t_{10} :2.228

Prueba de T student para las pruebas de desinfección usando hipoclorito de sodio

La t calculada en todos los casos es para una docima bilateral y con un nivel de significancia de 0.05.

H_0 = no existe diferencia significativa entre los conteos de UFC de *V. cholerae* de la prueba testigo y las pruebas de hipoclorito de sodio.

H_A = existe diferencia significativa entre los conteos de UFC de *V. cholerae* de la prueba testigo y las pruebas de hipoclorito de sodio.

Prueba testigo / Prueba de cloro 30mg/L

25 minutos de contacto

t_0 :0.396

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de cloro 40mg/L

25 minutos de contacto

t_0 :3.098

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de cloro 30mg/L

30 minutos de contacto

t_0 :5.36

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de cloro 40mg/L

30 minutos de contacto

t_0 :5.41

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de cloro 30mg/L

35 minutos de contacto

t_0 :2.882

t_{10} :2.228

Prueba testigo / Prueba de cloro 40mg/L

35 minutos de contacto

t_0 :2.88

t_{10} :2.228

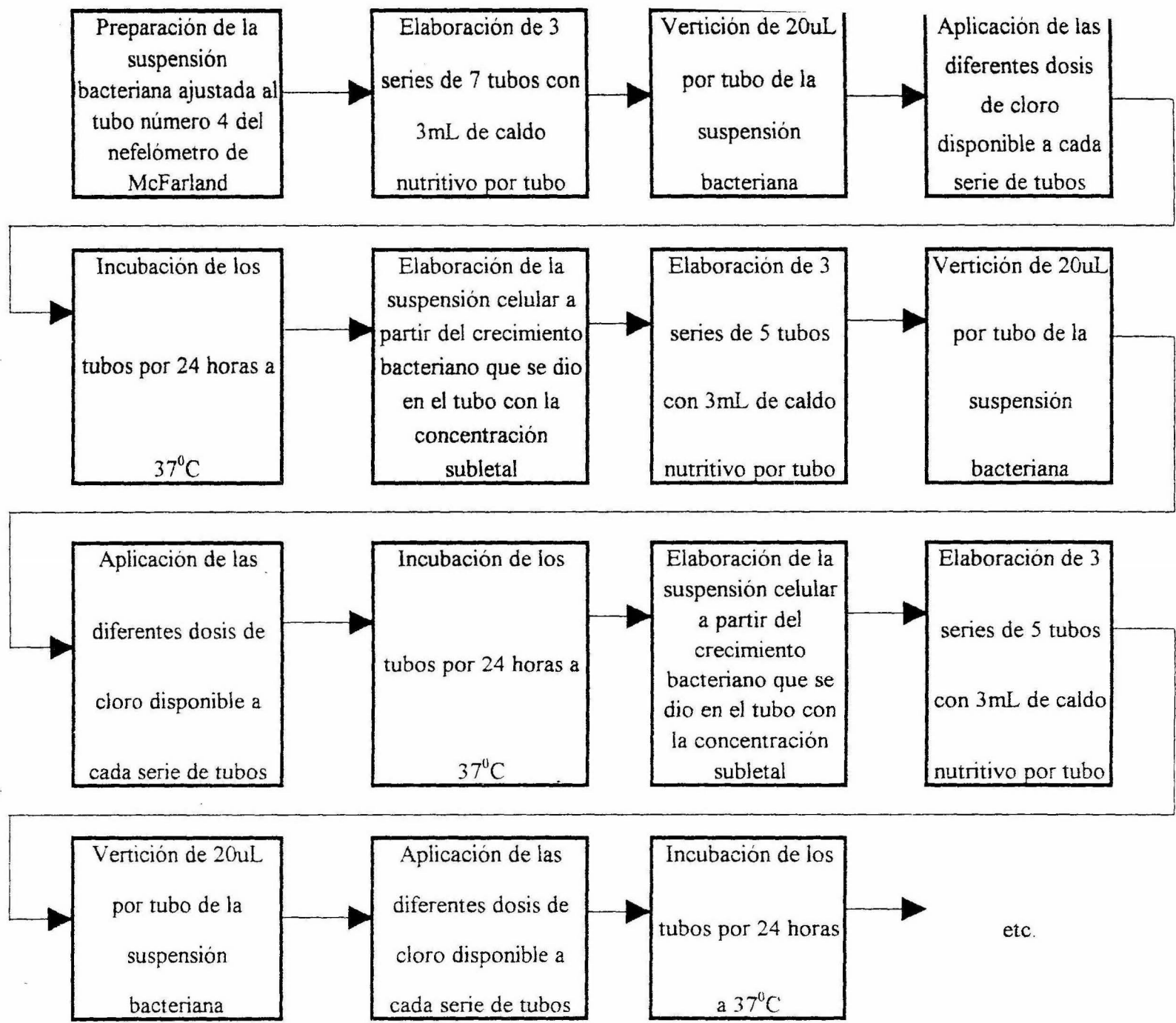


Diagrama de flujo 1

Diagrama de flujo de la adaptación de *V. cholerae* a una dosis aplicada de cloro disponible en agua de manantial

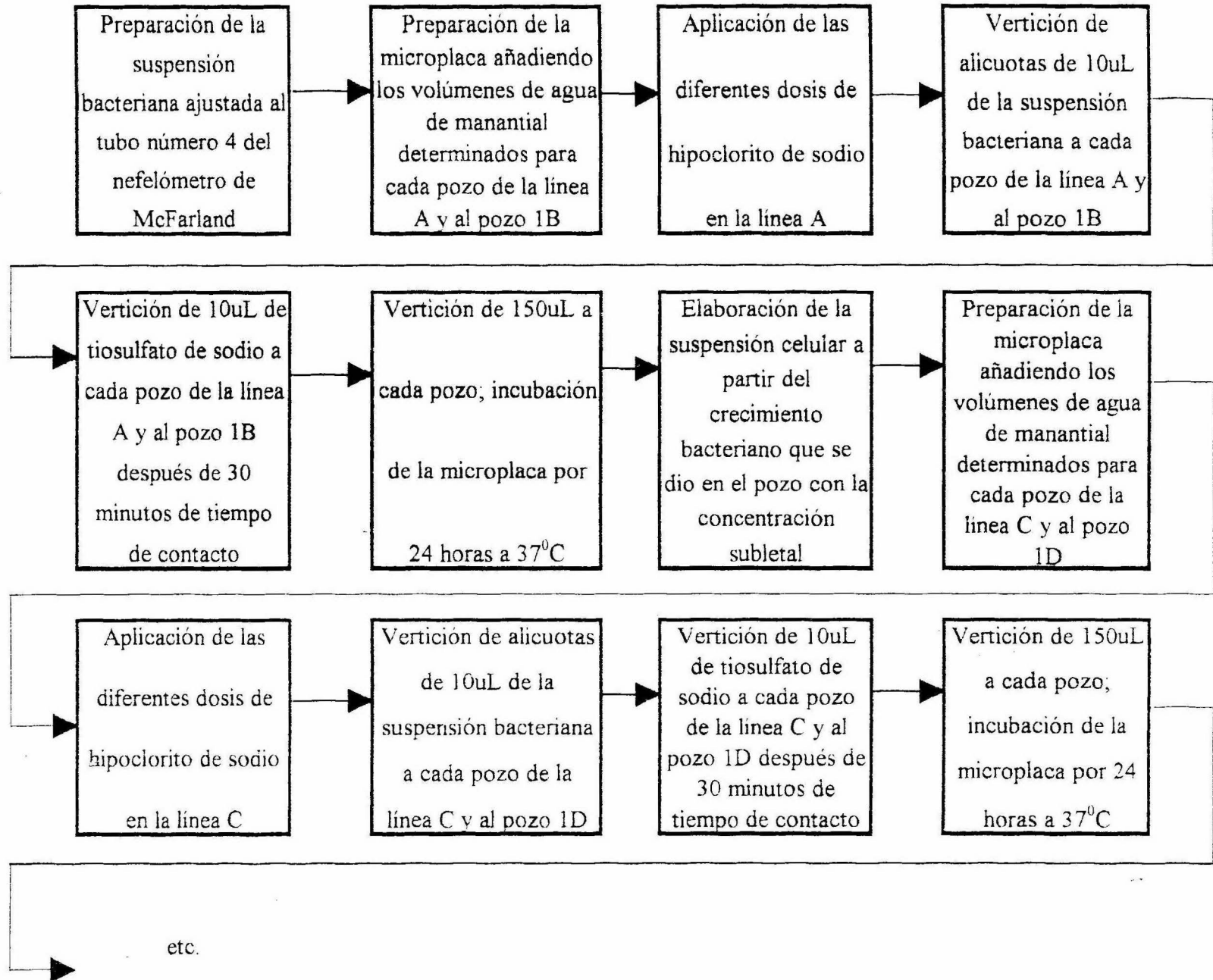


Diagrama de flujo 2

DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS PRUEBAS DE DESINFECCIÓN CON OZONO

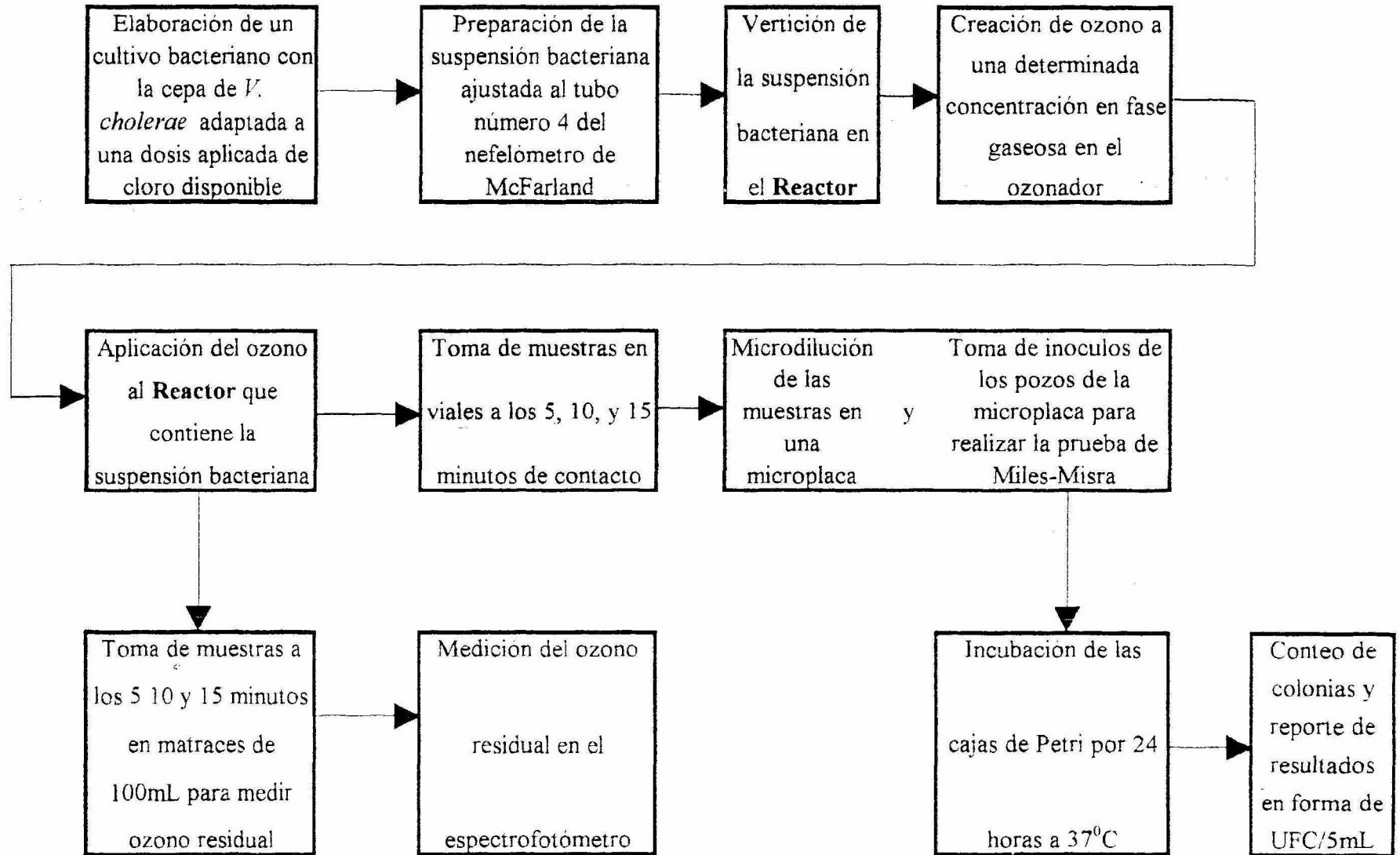


diagrama de flujo 3

DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS PRUEBA TESTIGO DE LA SEGUNDA Y TERCERA ETAPA

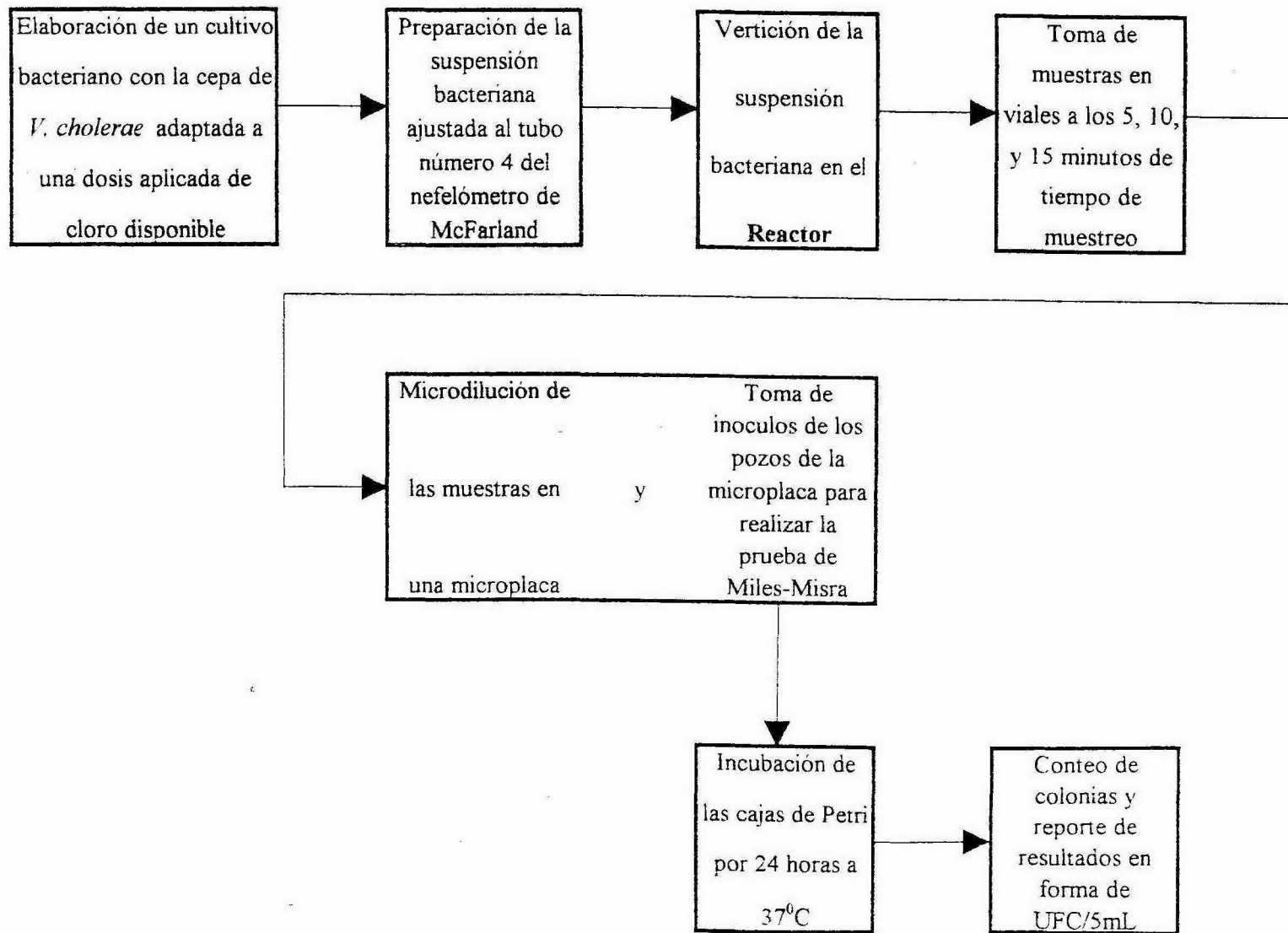


Diagrama de flujo 4

DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS PRUEBAS DE DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE SODIO

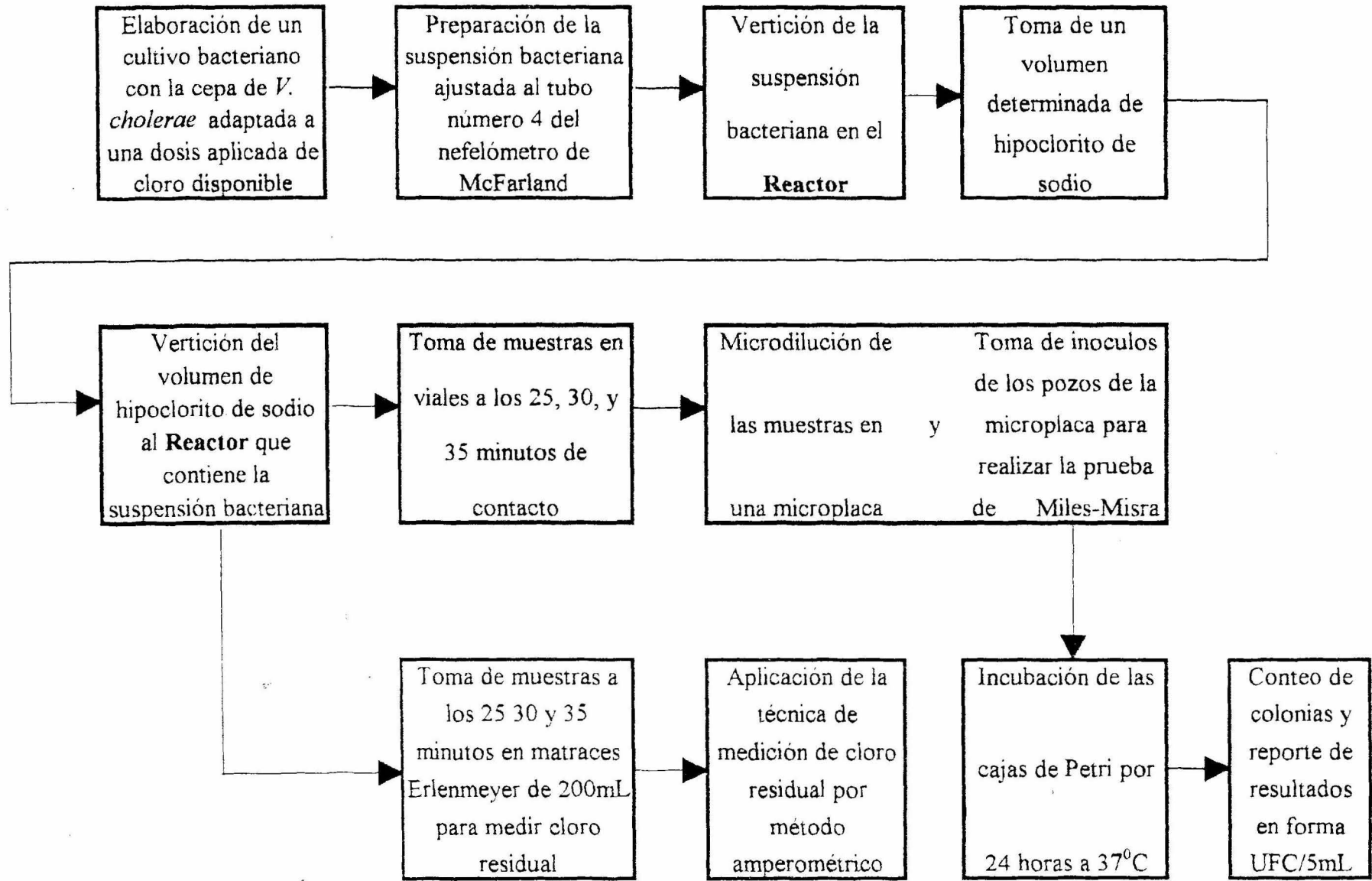


Diagrama de flujo 5