

50524
93



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**EVALUACION COMPARATIVA DE LA EFICIENCIA
DE ELIMINACION DE *Escherichia coli* EMPLEANDO
HIPOCLORITO DE SODIO, PLATA COLOIDAL Y
Paramecium caudatum.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
CLAUDIA ANTARES } SILVA REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO



MEXICO, D. F.

2003.

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

SILVA REYES CLAUDIA ANTARES

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Evaluación comparativa de la eficiencia de eliminación de Escherichia coli empleando hipoclorito de sodio, plata coloidal y Paramecium caudatum.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN
VOCAL *	Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
SECRETARIO	Q.F.B. NORMA PATRICIA VIVAR GUZMÁN
SUPLENTE	Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN
SUPLENTE	Q.F.B. MANUEL ORDUÑA SÁNCHEZ

M. Zamudio
[Firma]
[Firma]
[Firma]
[Firma]

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 30 de Enero de 2003.

[Firma]
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Experimental, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM; bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Luna Pabello y con el apoyo económico del subprograma 127 "Formación Básica en investigación" de la coordinación de superación académica y con fondos del PAIP 5290-12 del año 2001 y 2002, otorgado por la Facultad de Química de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, les agradezco todo el esfuerzo y sacrificios para que yo pudiera alcanzar este sueño.

A Héctor por todo su amor por su ejemplo y apoyo dedicados en todos estos años de estar juntos.

Al Dr Víctor Manuel Luna Pabello por haber confiado en mi para la realización de este trabajo, así como su apoyo, paciencia y comprensión.

A la maestra Paty Vivar asesora interna, por sus aportaciones para el mejoramiento del presente trabajo.

A Mónica y a Paty por guiarme y aconsejarme durante la realización del trabajo experimental.

A las personas del laboratorio de microbiología experimental que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, especialmente a la maestra Guadalupe Tsuzuki por sus valiosos consejos.

Al Ing. Ciro Marques, por el apoyo otorgado en la realización de las pruebas para cuantificar la concentración de plata por absorción atómica.

A mis grandes amigos Olga, Diana y Honorio por su apoyo incondicional y porque siempre estuvieron conmigo cuando mas los necesite.

MUCHAS GRACIAS

D

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis hijas Brenda Itzel y Amalinalli y a mi esposo Héctor porque son mi principal motivo para seguir adelante.

A mis padres María de Jesús Reyes y Agustín Silva, que siempre me han apoyado incondicionalmente para que estudie y salga adelante, especialmente mi madre.

A mis hermanos Agustín, y Adán que aunque estén lejos siempre cuento con ellos, a Ángela y Renato que siempre están dispuestos a ayudarme y apoyarme en los momentos difíciles.

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	3
2.1. PROBLEMÁTICA DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA	3
2.2. DESINFECCIÓN DEL AGUA	5
2.2.1. Microorganismos que se eliminan con la desinfección.	5
2.2.2. Factores que afectan la desinfección.	8
2.2.3. Métodos de desinfección.	9
a) Métodos físicos.	10
b) Métodos químicos.	10
c) Métodos biológicos.	26
2.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS	29
2.3.1. Métodos directos.	29
2.3.2. Métodos indirectos o culturales.	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GENERAL	33
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	33
5. HIPÓTESIS	34
6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	34
6.1. DIAGRAMA DE FLUJO	34
6.2. TIPO DE ESTUDIO	35
6.3. POBLACIÓN	35

F

6.4. CRITERIOS:	35
6.5. VARIABLES:	36
6.6. DISEÑO ESTADÍSTICO	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
7.1. MATERIALES	38
7.2. PRUEBAS COMPARATIVAS DE LAS TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS	39
7.3. PRUEBAS COMPARATIVAS DE LA EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> DE LA PLATA COLOIDAL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO	42
7.3.1. Preparación del inóculo.	42
7.3.2. Evaluación de la eficiencia variando la concentración del desinfectante.	42
7.3.3. Evaluación de la eficiencia variando el tiempo de contacto y la concentración de <i>Escherichia coli</i> .	43
7.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDADORA DEL <i>Paramecium caudatum</i> SOBRE POBLACIONES DE <i>Escherichia coli</i> .	44
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	45
8.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPARATIVAS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS	45
8.2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPARATIVAS DE LA EFICIENCIA DE DESINFECCIÓN DE LA PLATA COLOIDAL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO	47
8.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDADORA DEL <i>Paramecium caudatum</i> SOBRE POBLACIONES DE <i>Escherichia coli</i>	51
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
9.1. CONCLUSIONES	55
9.2. RECOMENDACIONES	55
ANEXOS	56
REFERENCIAS	74

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 2.1. Microorganismos potencialmente transmitidos por el agua y sus enfermedades.	7
Tabla 2.2. Eficacia de los principales desinfectantes para el agua.	11
Tabla 2.3. Productos de la cloración del amonio.	17
Tabla 2.4. Posibles productos de oxidación del amonio por cloro.	17
Tabla 2.5. Principales compuestos organoclorados generados por la cloración de aguas residuales.	20
Tabla 2.6. Criterios de la literatura para la protección del agua potable.	23
Tabla 7.1. Escala de McFarland.	40
Tabla 8.1. Resultados obtenidos de la aplicación de las diferentes técnicas de cuenta de bacterias en muestras de agua.	45
Tabla 8.2. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y la plata coloidal con diferentes concentraciones de desinfectante y un tiempo de contacto de 30 minutos.	48
Tabla 8.3. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 3.3×10^2 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	49
Tabla 8.4. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 2.87×10^4 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	50
Tabla 8.5. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 3.5×10^5 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	51
Tabla 8.6. Eficiencia de desinfección del <i>Paramecium caudatum</i> con concentración de 2.03×10^4 UFC/mL.	52
Tabla 1b. Principales propiedades de algunos desinfectantes para el agua.	61
Tabla 1c. Resultados obtenidos para la curva de calibración de asas.	65
Tabla 2c. Resultados de la calibración de las asas.	66
Tabla 3c. Resultados de la eficiencia de desinfección del hipoclorito a diferentes concentraciones, expresado en UFC/mL.	66
Tabla 4c. Resultados de la eficiencia de desinfección de la plata coloidal a diferentes concentraciones, expresado en UFC/mL.	66

tt

Tabla 5c.	Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 3.3×10^2 de <i>Escherichia coli</i> , a diferentes tiempos de contacto.	67
Tabla 6c.	Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 2.87×10^4 de <i>Escherichia coli</i> , a diferentes tiempos de contacto.	67
Tabla 7c.	Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 3.5×10^5 de <i>Escherichia coli</i> , a diferentes tiempos de contacto.	67
Tabla 8c.	Resultados de la eficiencia de desinfección del <i>Paramecium caudatum</i> con una concentración de 2.05×10^4 UFC/mL, a diferentes tiempos de contacto.	67
Tabla 1d.	Datos seleccionados al azar para los diferentes tipos de desinfectantes.	68
Tabla 2d.	Tabla de contingencia de 5×4 para los diferentes tipos de desinfectantes.	68
Tabla 3d.	Análisis de resultados para la prueba de normalidad para la eficiencia de eliminación de <i>E. coli</i> con tres desinfectantes.	69
Tabla 4d.	Resultados estadísticos para la prueba de igualdad de varianzas.	71
Tabla 5d.	Resultados estadísticos para la prueba de igualdad de varianzas.	71
Tabla 6d.	Resultados estadísticos para la prueba de la diferencia significativa mínima, para la eficiencia de eliminación de <i>E. coli</i> con.	72
Tabla 7d.	Resultados estadísticos obtenidos para la prueba de DSM.	72
Tabla 8d.	Diferencias absolutas entre pares de medias para la prueba de la DSM, para la eficiencia de eliminación de <i>E. coli</i> con tres desinfectantes.	72

I

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1. Reacciones del cloro en el agua.	16
Figura 2.2. Mecanismo de acción del cloro.	21
Figura 2.3. Mecanismo de acción de los iones de plata.	25
Figura 2.4. Esquema de los componentes de un <i>Paramecium caudatum</i> .	28
Figura 2.5. Microfotografía de <i>Paramecium caudatum</i> 20 X, contraste de fases.	28
Figura 2.6. Esquema básico del funcionamiento de un espectrofotómetro.	29
Figura 2.7. Cámara cuenta colonias.	31
Figura 2.8. Equipo milipore.	32

LISTA DE GRÁFICAS

	Pag
Gráfica 8.1. Eficiencia de desinfección de la plata coloidal con diferentes concentraciones de desinfectante a tiempos de contacto de 0 y 30 minutos.	47
Gráfica 8.2. Eficiencia de desinfección del hipoclorito con diferentes concentraciones de desinfectante a tiempos de contacto de 0 y 30 minutos.	48
Gráfica 8.3. Comparación de la eficiencia de desinfección de <i>E. coli</i> , entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 3.3×10^2 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	49
Gráfica 8.4. Comparación de la eficiencia de desinfección de <i>E. coli</i> , entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 2.87×10^4 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	50
Gráfica 8.5. Comparación de la eficiencia de desinfección de <i>E. coli</i> , entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 3.5×10^5 UFC/mL de <i>E. coli</i> .	51
Gráfica 8.6. Capacidad predatora del <i>Paramecium caudatum</i> sobre poblaciones de <i>E. coli</i> , a diferentes tiempos de contacto.	51
Grafica 1c. Curva de calibración para asas.	66

5

RESUMEN

Se realizó el estudio comparativo de la eficiencia de eliminación de concentraciones conocidas de *Escherichia coli* presente en aguas residuales, al ser puesta en contacto, en tiempos preestablecidos y por separado, con concentraciones equivalentes de hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum*. Los resultados de las pruebas comparativas mostraron que para una concentración de *E. coli* de 2.87×10^4 por mililitro y un tiempo de contacto de 15 minutos, la plata coloidal resultó hasta 1.4 veces más eficiente que el hipoclorito de sodio, mientras que el *Paramecium caudatum* fue 3 veces menos eficiente que el hipoclorito de sodio y 5 veces menos eficiente que la plata coloidal. Por lo que se concluye que, bajo condiciones similares, la plata coloidal es el agente desinfectante con mayor eficiencia de eliminación de *E. coli*.

1. INTRODUCCIÓN

La transmisión de microorganismos patógenos mediante el agua para beber es un gran problema, sus efectos no sólo se presentan en países con bajas medidas de higiene sino también en países industrializados. En general, un agua residual doméstica es portadora de microorganismos patógenos que pueden poner en peligro la salud y la vida del ser humano. Los microorganismos patógenos más frecuentemente transmitidos por el agua producen infecciones del aparato digestivo como es el caso de la fiebre tifoidea, paratifoidea, disentería y cólera. Los agentes etiológicos de este tipo de enfermedades se encuentran en las materias fecales y la orina de los seres humanos infectados, las cuales al ser eliminadas sin tratamiento alguno, pueden llegar a algún cuerpo acuático receptor propiciando su contaminación y limitando así su uso como fuente de abastecimiento para las diferentes actividades humanas, principalmente para uso potable (Pelczar, 1977).

Por otra parte, uno de los principales agentes desinfectantes de agua para consumo humano es el cloro, no obstante por ser muy reactivo, presenta como inconveniente la formación de compuestos indeseables, tales como trihalometanos y haloácidos, generados por la reacción del cloro con la materia orgánica que se encuentra en el agua residual (Castro y Benavides, 1998). Sobre este tipo de compuestos se han realizado numerosos estudios toxicológicos y epidemiológicos que sugieren una asociación entre la exposición a agua clorada y el cáncer de vejiga, recto y colon, así como efectos adversos en el sistema reproductivo y en el de crecimiento (Bull, 1986; Craun, 1991; Betts, 1998; USEPA, 1998).

Por ese motivo, se han buscado nuevas alternativas de desinfección, como es el uso de luz ultravioleta (LUV) y ozono, los que a su vez tienen como inconveniente su relativo alto costo y la falta de efecto desinfectante remanente (Acher *et al.*, 1997; Lazarova *et al.*, 1998 y Xu *et al.*, 2002). Asimismo, se han considerado otros métodos alternos para la desinfección de aguas para consumo humano, como es el caso de recipientes de agua elaborados con plata, los cuales han sido utilizados desde tiempos antiguos, y al igual que el cloro, también poseen efecto desinfectante remanente (Davies y Etris, 1997).

En el caso de la desinfección de aguas residuales, no se encontró literatura que indique el uso de plata o sus compuestos como agente desinfectante de las mismas. De igual forma, no se detectó información que aludiera a que el *Paramecium caudatum* se utilizara como agente desinfectante biológico, lo cual es factible si se considera que es un ciliado libre nadador, predador natural de bacterias, el cual está presente en ambientes acuáticos y aguas residuales de tipo doméstico (Kudo, 1985). Al respecto, es importante destacar que ambas alternativas tienen como ventaja la no generación de productos secundarios tóxicos.

A partir de lo anterior, en el presente trabajo, se plantea evaluar y comparar la eficiencia de desinfección de dos agentes químicos (hipoclorito de sodio y plata coloidal) y uno de tipo biológico (ciliado), para la eliminación de bacterias en suspensión (del tipo coliformes), como se verá más adelante. En este tipo de trabajo, las técnicas de cuantificación de bacterias representan un papel sumamente importante para determinar la evaluación de la eficiencia de desinfección de los diferentes agentes desinfectantes propuestos para ser evaluados, por lo cual es de particular interés su selección.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. PROBLEMÁTICA DE LA DESINFECCIÓN DEL AGUA

El cloro ha sido el principal desinfectante de los abastecimientos de agua desde hace prácticamente un siglo, se considera el método más efectivo y económicamente factible, su empleo nunca fue discutido y los beneficios derivados de su empleo han sido evidentes, atajando y eliminando las grandes epidemias y brotes de enfermedades hídricas, hasta que en 1974, algunos investigadores como Rook en Holanda y Bellar en Estados Unidos, valiéndose de la cromatografía de gases y el espectrómetro de masas, pusieron en evidencia que el cloro por ser una molécula muy reactiva sufre un número de reacciones químicas con la materia orgánica del agua residual, que deben ser consideradas ya que éstas tienen entre sus productos compuestos organoclorados indeseables llamados subproductos de cloración (SPC). Los SPC más comunes son los trihalometanos (THMs), los ácidos haloacéticos (HAAs), los haloacetónitrilos (HANs), la cloropicrina (CHP), las cetonas halogenadas (HKs) y el hidrato de cloro (CH) (Kampioti, 2002; Zhang, 2002). El cloroformo que es el THM más importante al acumularse en los seres vivos es un agente cancerígeno y mutagénico potencial para los seres humanos (Netfirms, 2002), La mayoría de la actividad mutagénica en el agua para beber clorada ha sido asociada con HANs y especialmente con HAAs (Kampioti, 2002), además el cloro tiende a aumentar la proporción de bacterias resistentes a antibióticos, las cuales son potencialmente patógenas, causando un gran problema ambiental (Castro y Benavides, 1987).

Se han realizado numerosos estudios toxicológicos (Bull, 1986; Craun, 1991; Betts, 1998) en donde los resultados muestran que varios de los SPC como bromodiclorometano, bromoformo, cloroformo, ácido dicloroacético y bromato son cancerígenos en animales de laboratorio y compuestos como Dibromoclorometano y algunos ácidos haloacéticos, tienen efectos adversos en el sistema reproductivo y en el desarrollo (USEPA, 1998). En roedores, se identificaron como órganos blanco hígado, riñón y/o intestino (Dunnick y Melnick, 1993).

En humanos los datos muestran un riesgo potencial para la salud pública, su importancia deriva de el gran número de habitantes expuestos a través del agua, se sabe que el cloroformo afecta la función de el hígado y el riñón (Betts, 1998). Se han realizado estudios epidemiológicos que sugieren una asociación entre la exposición al agua clorada y el cáncer de vejiga (Castro, 1998; Villanueva *et al.*, 2001), recto y colon así como efectos adversos en el sistema reproductivo y en el crecimiento, sin existir pruebas contundentes aún (USEPA, 1998).

Considerando la evidencia de efectos en la salud producida por la ingestión de THM, en diversos países se han establecido regulaciones para los THM. La Secretaría de Salud ha establecido un límite permisible de THM de 0.2 mg/L para agua potable (NOM-127, 1996). En Estados Unidos se requiere un máximo de 0.08 mg/L (USEPA, 1998). La Organización Mundial de la Salud recomienda los siguientes lineamientos: 0.2 mg/L para cloroformo, 0.06 mg/L para bromodiclorometano, 0.1 mg/L para dibromoclorometano y 0.1 mg/L para bromoformo (WHO, 1995). En las recomendaciones sobre calidad del agua en la Comunidad Europea se señala una guía de 0.1 mg/L para compuestos halogenados, que incluye THM, pero no se da un límite específico (Villanueva *et al.*, 2001).

La materia orgánica natural (MON) es considerada como la mayor precursora de los SPC y las sustancias húmicas precursoras de los THM suelen constituir el 50% de la MON (Mylykangas *et al.*, 2002). En general la formación de los SPC se ve favorecida con el aumento de los precursores que son esencialmente los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, aminoácidos y nitrofenoles. Otros factores que favorecen su formación son el aumento de pH, de la temperatura, de la dosis de cloro y del tiempo de contacto. La formación de SPC, tiene lugar cuando el cloro empleado está en forma de cloro libre, no formándose cuando esta en forma combinada (cloraminas), ni con el dióxido de cloro (Schmidt *et al.*, 1998).

Un estudio de los niveles de THMs y HAAs del agua de la zona sur de la ciudad de México, reveló que se encuentran por debajo de los límites permisibles que establece la norma oficial mexicana, pero se observa que al existir materia orgánica aún en baja concentración (de 0.08 a 4.82 mg/L) y reaccionar ésta con el cloro residual se incrementa la formación de compuestos clorados. Los datos del cloro residual obtenidos indican que no existe un control adecuado del proceso de cloración, pues en ocasiones se encontraba por debajo del límite indicado, llevándose a cabo una desinfección insuficiente con el riesgo de crecimiento bacteriano, y en otras ocasiones las concentraciones del cloro residual libre se encontraban por encima del límite permisible (hasta 50 veces más), con los consecuentes riesgos para la salud (Mazarí, 2000).

Debido a lo anterior se han buscado nuevas alternativas para la desinfección de las aguas residuales entre las que se menciona principalmente a los rayos U.V y al ozono que presentan una alta eficiencia de desinfección, pero tienen la desventaja de tener un alto costo de implementación y la falta de efecto desinfectante remanente (Acher *et al.*, 1997; Lazarova *et al.*, 1998 y Xu *et al.*, 2002). Otra alternativa es la utilización de la plata, que desde tiempos muy antiguos, ha sido una opción empleada para la desinfección de agua, y al igual que el cloro, presenta efecto desinfectante remanente. En la actualidad, la plata o sus compuestos son empleados para la potabilización de aguas para consumo humano (Davies y Etris, 1997), sin embargo, su uso en aguas residuales es aún incipiente, aparentemente debido a lo prohibitivo que resultaría su costo de implementación.

El agua tratada con compuestos de plata, no tiene ningún efecto nocivo sobre el ser humano, sin haber aún evidencia de que la plata sea transformada naturalmente en compuestos peligrosos para los seres vivos. Tampoco afecta el sabor ni el olor del agua siendo bien aceptada para su consumo (Warrigton, 1996). Con los iones de plata se ha reemplazado gradualmente al cloro como agente antibacterial de elección, las investigaciones han tomado a esta tecnología como un paso al futuro (Etris, 1997).

Otra alternativa de desinfección es la aplicación de métodos biológicos. Ejemplo de ello es el uso de microorganismos inoocuos consumidores de bacterias como el *Paramecium caudatum* el cual consume 5 mil bacterias por día, además de materia orgánica (Del Vecchio, 2000).

2.2. DESINFECCIÓN DEL AGUA

El término desinfección del agua hace referencia a la "destrucción de microorganismos patógenos en el agua" (Droste, 1997). El proceso de desinfección ha ganado gran importancia en el tratamiento del agua, durante el último siglo, debido a que ha sido la solución al gran problema de los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por el agua, como: cólera, salmonelosis, shigelosis, etc.

2.2.1. Microorganismos que se eliminan con la desinfección

Los microorganismos que pueden estar presentes en el agua de consumo humano, debido a su contaminación son: bacterias, virus, protozoos y helmintos. Se sabe que los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua proceden de las descargas intestinales de hombres y animales, y se ha estimado que el número de bacterias coliformes en las descargas fecales llega hasta, quizás, 200×10^9 organismos diarios por persona (McJunkin, 1988).

De todos los microorganismos, las bacterias son las más numerosas y las que también se encuentran con más frecuencia en el agua. Las bacterias patógenas que se han encontrado en el agua son: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter pylori*.

Ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli* y otros géneros como, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* y microorganismos similares son denominados coliformes, ya que son miembros comunes de la biota intestinal (Bitton, 1994). Históricamente han sido recomendados como indicadores para la evaluación microbiológica de la calidad del agua (APHA, 1998). Durante muchos años, los investigadores han buscado organismos indicadores más adecuados a las necesidades del área de abastecimiento de agua que los grupos coliforme y coliforme fecal, como los estreptococos fecales, el *Clostridium perfringens*, las *Pseudomonas*, la *Klebsiella pneumoniae* y algunas especies patógenas de *Salmonellas*, y aunque de tiempo en tiempo se proponen varias alternativas, usándose algunas intermitentemente como adjuntas a las pruebas de coliformes, no se ha encontrado todavía ningún organismo que parezca convincente mejor que el grupo coliforme (McJunkin, 1988).

La *Escherichia coli*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* del grupo de los coliformes, que se caracterizan por ser bacilos cortos que miden de 1.1 a 1.5 μm de ancho y 2.0-6.0 μm de largo; son gramnegativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos con motilidad en la mayoría de las cepas debido a un flagelo peritrico. En cultivo forma colonias redondas convexas y lisas, con bordes definidos; teniendo una temperatura óptima de crecimiento de 37.5 °C (Holt, 1994). Bioquímicamente tiene la capacidad para reducir nitratos a nitritos y utilizar la glucosa con producción de ácido y gas, fermenta la lactosa rápidamente y es oxidasa negativa (Jawetz, 1985 y Baker, 1990). Esta bacteria se ha estudiado desde los inicios de la bacteriología y ha sido prominente en investigaciones de laboratorio por casi un siglo. Las razones de la popularidad de esta especie en investigaciones microbiológicas son:

- Crece fácilmente en medios de cultivo definidos.
- Tiempo de generación rápido (20 minutos).
- Puede ser contabilizado fácilmente por medio de cuenta en placa ya que no forma agregados.
- Ciclo de vida muy bien definido.
- Algunos biotipos son poco virulentos (Neidhardt, 1987).

Otros microorganismos patógenos que también pueden ser transmitidos por el agua son los virus. Son parásitos intracelulares, generalmente específicos respecto a las células que constituyen su albergue. Los virus que más interesan en cuanto a la transmisión de enfermedades infecciosas hídricas, son principalmente los que se multiplican en el intestino y son expelidos en gran número en las heces de los individuos infectados. Si bien la reproducción no ocurre fuera de huéspedes vivos, los virus entéricos tienen una gran capacidad para sobrevivir en el ambiente acuático y pueden permanecer vivos por días o meses (Cáceres, 1990).

Existen tres tipos de protozoos intestinales patógenos para el hombre, que pueden ser transmitidos por el agua: *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* y especies de *Giardia*. Todos han sido asociados a brotes epidémicos causados por el agua potable. Los quistes de *E. histolytica* pueden sobrevivir por varios meses en el agua a 0°C; 30 minutos a 45°C y 5 minutos a 50°C. Es uno de los patógenos conocidos más resistentes al cloro. Existen amebas de vida libre pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* que son parásitos facultativos del hombre, producen la meningoencefalitis amibiana primaria enfermedad mortal para el hombre. Estas propiamente no se transmiten por la ingesta de agua, sino por la penetración del microorganismo a través de la nariz en agua para uso recreativo (piscinas, aguas termales, lagos, etc.) (Beaver, 1992)

También se han encontrado una gran variedad de huevos y larvas de helmintos en el agua potable. Los helmintos intestinales más difundidos son los *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, *Schistosoma* y *Ancylostoma*, los mismos que también pueden estar presentes en las aguas de recreación.

La contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua con aguas residuales domésticas puede transmitir estos microorganismos por el agua potable, así como agua que sólo tuvo tratamiento deficiente de desinfección (Cáceres, 1990).

En la tabla 2.1 se muestran los principales microorganismos patógenos que pueden transmitirse por el agua y las enfermedades que producen.

Tabla 2.1. Microorganismos potencialmente transmitidos por el agua y sus enfermedades (McJunkin, 1988).

Microorganismos	Enfermedad
<u>Bacterias</u>	
<i>Salmonella sp.</i>	Salmonelosis, diarrea acuosa con sangre.
<i>Shigella sp.</i>	Shigelosis, disentería, fiebres altas, retorcijones y convulsiones.
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea acuosa, vómito, deshidratación.
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (ECEH) O157:H7	Diarrea acuosa con sangre y moco, dolor abdominal agudo, vómito, no hay fiebre.
<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (ECEI)	Diarrea, fiebre, cefalea, mialgias, dolor abdominal, a veces las heces son mucosas y con sangre.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarrea, dolores abdominales, fiebre y algunas veces heces fecales con sangre, dolor de cabeza.
<u>Virus</u>	
<i>Enterovirus Polio</i> <i>Poliovirus</i>	Poliomielitis, meningitis, fiebre.
<i>Virus de la hepatitis A</i>	Hepatitis infecciosa.
<i>Virus de la hepatitis E</i>	Hepatitis infecciosa.
<i>Adenovirus</i>	Enfermedades respiratorias, infecciones en los ojos.
<i>Rotavirus</i>	Vómito y diarrea.
<u>Protozoos</u>	
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis. Diarreas crónicas con mala absorción y distensión abdominal.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amibiasis. Dolor abdominal, estreñimiento, diarrea con moco y sangre.
<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasis
<i>Acanthamoeba</i> y <i>Naegleria</i>	Meningoencefalitis amibiana primaria
<u>Helmintos</u>	
<i>Schistosoma mansoni</i>	
<i>Taenia solium</i>	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	
<i>Enterobius vermicularis</i>	
<i>Trichuris trichura</i>	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	

2.2.2. Factores que afectan la desinfección

Los factores que influyen en la desinfección son:

a) Tipo de microorganismo y estado fisiológico

El tipo y la concentración de los microorganismos a ser destruidos, así como su distribución y condición en el agua tienen una gran influencia en la eficiencia de la desinfección. La acción desinfectante sobre los microorganismos, parece estar determinada por la resistencia de sus membranas celulares a la penetración del desinfectante y por la relativa afinidad química con las sustancias vitales del microorganismo.

Las bacterias como las del grupo coliforme, y las salmonellas son las que menos resistencia presentan a la desinfección, ya que su respiración se efectúa en la superficie de la célula. Algunos grupos de bacterias, cuando se encuentran en condiciones adversas, producen una espora que es bastante resistente a los desinfectantes y al calor seco, requiriendo de un proceso distinto para su eliminación.

Después de las bacterias no esporuladas, les siguen en resistencia los quistes de protozoos (quistes de amibas). Según investigaciones realizadas por Cáceres (1990), éstos son 100 veces más resistentes a la desinfección con cloro libre que la *E. coli* y 9 veces más resistente que los virus más fuertes. Cuando las bacterias como los estafilococos, forman grumos de células, las que se encuentran en el interior son protegidas pudiendo sobrevivir intactas. Por ello los microorganismos deben estar distribuidos uniformemente y moverse en el agua; esto puede lograrse mediante la agitación. Los virus entéricos como el *Echovirus*, *Cocksakievirus* y *Poliovirus*, son también bastante resistentes a la desinfección debido a la capa de proteínas que los cubre.

El estado fisiológico de los organismos influye en la susceptibilidad de los agentes desinfectantes. Las células jóvenes, por tener intenso metabolismo, son más vulnerables que las viejas, de menor actividad metabólica en el caso de un agente que cause daño por interferir en esa función, este tipo de agentes no afectará las células que no estén en desarrollo. Otras diferencias en cuanto a la resistencia se explican por cambios en la membrana celular porque el envejecimiento afecta la permeabilidad de ésta (Pelczar, 1977).

b) Tipo de desinfectante y distribución en el agua

La eficiencia de la desinfección depende del tipo de desinfectante empleado. Algunos desinfectantes tienen un poder oxidante mucho mayor (Ozono, dióxido de cloro) que otros desinfectantes, como el cloro y sus compuestos por ejemplo, pueden formar en el agua una serie de especies de cloro, cuya eficiencia desinfectante es muy diferente (Bitton, 1994). Para poseer un poder o intensidad efectiva, los desinfectantes se deben hallar uniformemente distribuidos en el agua, para actuar sobre todos los microorganismos presentes. Para ello se requiere que su aplicación se efectúe con una fuerte agitación (Cáceres, 1990).

c) Temperatura

Un aumento en la temperatura con un agente químico, apresura la destrucción de los microorganismos. Así una cantidad pequeña de desinfectante a una temperatura elevada (30 a 42°C) logrará el mismo resultado que una cantidad mayor del mismo desinfectante a temperatura más baja (Pelczar, 1977).

d) Concentración de desinfectante y tiempo de contacto

Estos dos factores deben considerarse como mutuamente ligados, pues por medio de ambos, se toma en consideración la duración del período de reacción disponible para la desinfección, así como la concentración de agente desinfectante. Si se considera el cloro combinado, que es un desinfectante débil, debe proporcionarse una mayor concentración actuando durante un tiempo mayor. Por otro lado si se va a mantener cloro libre residual, el cual es un desinfectante activo, entonces el periodo de reacción puede ser proporcionalmente menor. La experiencia ha demostrado que un cloro libre residual de 0.05 mg/L, con un periodo de reacción de 10 minutos, matará las bacterias igual que un cloro residual combinado (cloraminas) de 0.6 mg/L con un periodo de reacción de 60 minutos (Cáceres, 1990).

e) pH

El pH del agua es de suma importancia ya que valores muy altos o muy bajos ofrecen a los microorganismos un medio adverso, con excepción de los quistes de amebas que soportan pH tan altos como 13 o muy bajos como 1.

Por otra parte, la acción de los desinfectantes es fuertemente influida por el pH de las aguas. Cada desinfectante tiene un rango de pH en el que se determina su máxima efectividad, por ejemplo el poder bactericida de los iones plata aumenta en presencia de un valor de pH más alto, lo contrario a lo que ocurre con el cloro. A una misma dosis de iones plata, al aumentar el pH, aumenta el efecto bactericida pero al mismo tiempo la solubilidad de la plata es menor (Warrington, 1996).

f) Interferencia química y física

Los componentes químicos que interfieren con la desinfección son los compuestos de nitrógeno orgánico e inorgánico, fierro, manganeso y sulfuro de hidrógeno. Los compuestos orgánicos disueltos influyen en la demanda de cloro y su presencia resulta en la reducción de la eficiencia de desinfección.

La turbiedad del agua es debida a la presencia de materia inorgánica (sales, arcilla, óxidos de fierro) y materia orgánica así como células bacterianas. Ésta interfiere con la detección de coliformes en el agua y también reduce la eficiencia de desinfección con cloro y otros desinfectantes. Es necesario remover la turbiedad porque los microorganismos asociados con estas partículas son más resistentes a la desinfección que los microorganismos que están suspendidos libremente. Los microorganismos están asociados con materia fecal, restos celulares y sólidos de las aguas residuales son también protegidos de la desinfección (Bitton, 1994).

2.2.3. Métodos de desinfección

Existen diferentes métodos para la desinfección del agua; los cuales se clasifican en físicos, químicos y biológicos.

a) Métodos Físicos

Sedimentación natural.

Dentro de los métodos físicos está la sedimentación natural, que es el proceso por el cual se realiza la decantación de materias en suspensión, por la acción de la gravedad. Desde hace muchos siglos, la sedimentación ha sido utilizada como medio para mejorar la calidad del agua para uso doméstico. La decantación natural del material fino como, limo y arcillas, ayuda a la remoción de las bacterias, decantando más rápidamente los esporulados y los huevos de helmintos, dependiendo su eficiencia del tiempo de retención en el reservorio (Cáceres, 1990).

Sedimentación con coagulantes.

Otro método físico es el de sedimentación con ayuda de coagulantes, en el cual se agregan algunas sustancias al agua, para ayudar a la sedimentación de partículas coloidales, o finamente desmenuzadas que se encuentran en suspensión. En algunos casos, la adición de sales minerales o compuestos orgánicos producen la aglomeración de estas partículas, seguida su eliminación por decantación o filtración (Franceschi *et al.*, 2002). Debe tenerse en consideración, que los microorganismos son partículas coloidales y que por ello se encuentran sometidos a los mismos procesos de remoción de los demás coloides, por eso este proceso elimina con apreciable grado de eficiencia, la mayoría de las bacterias, protozoos y virus que se encuentran en el agua.

Filtración.

La filtración también es un proceso físico por el cual el agua pasa a través de sustancias porosas capaces de retener materias en suspensión. La filtración del agua es muy conocida y es un proceso muy efectivo para la eliminación de microorganismos patógenos del agua para beber. Puede remover microorganismos patógenos que se ocultan en partículas de materia orgánica que no pueden ser eliminados eficientemente por desinfectantes químicos (Schoenen, 2002). El mecanismo de remoción es una combinación de filtración física, reacciones químicas y transformaciones biológicas (Ausland *et al.*, 2002).

Luz solar y rayos UV.

La luz solar es un desinfectante natural, ya que actúa como agente desecante. Los rayos ultravioleta, procedentes del sol son conocidos hace mucho tiempo, ejerciendo su influencia sobre la superficie terrestre al atravesar la atmósfera. El potencial uso de los rayos UV como desinfectante para la inactivación de bacterias, protozoos y virus en agua potable ha sido constantemente desarrollado y se ha determinado que a una tensión baja y media puede inactivar al *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* a dosis que son fácilmente se pueden conseguir para el tratamiento del agua potable. (Huffman *et al.*, 2002). Como cualquier proceso, la desinfección con rayos ultravioleta, presenta ventajas y desventajas, las cuales se presentan en el anexo B.

b) Métodos químicos

Halógenos.

Los métodos químicos son los más utilizados para la desinfección del agua, entre los que podemos encontrar a los halógenos como el cloro el bromo y el yodo. Todos son desinfectantes muy estables y conservan un efecto desinfectante remanente, pero el más utilizado es el método de la cloración ya sea con el uso de gas cloro o con compuestos de

cloro (hipocloritos) por su capacidad para eliminar microorganismos patógenos y mantener una concentración remanente en el sistema de distribución, así como también su amplia disponibilidad y su costo moderado en la mayoría de las regiones del mundo.

Ozono.

Otro agente químico utilizado es el ozono, que actualmente es él más serio competidor del cloro por su eficiencia como desinfectante. En la actualidad, la única opción viable, en vez de la cloración para la desinfección de los suministros de agua comunales, es la ozonización, la cual se utiliza cada vez más en los sistemas europeos de abastecimiento. Sin embargo, el uso del ozono generalmente no se recomienda para los países en desarrollo, debido a los altos costos de instalación mantenimiento y operación, la necesidad de suministro constante de energía y la necesidad de importación del equipo y refacciones (Schulz y Okun, 1998). El ozono, además de ser un buen desinfectante, es desodorante y decolorante. Es poco soluble en el agua y es muy volátil. Se mantiene en el agua sólo algunos minutos; en su aplicación, se pierde aproximadamente cerca de 10% de su producción, al volatilizarse. (Bitton, 1994; Droste, 1997). Como todos los desinfectantes éste presenta ventajas y desventajas, las cuales se muestran en el anexo B.

Plata.

La plata también ha sido utilizada para la desinfección del agua potable desde tiempos muy antiguos, y debido a que es el objeto de estudio del presente trabajo, así como el cloro se describirán ampliamente más adelante.

En la siguiente tabla se muestra la eficacia de algunos de los desinfectantes químicos para eliminar a los principales agentes patógenos del agua.

Tabla 2.2. Eficacia de los principales desinfectantes para el agua
(modificado de Trussell, 1991)

Agentes	Luz U.V.	Ozono	Plata	Hipoclorito	Cloraminas
Bacterias	Muy bueno	Excelente	Muy bueno	Muy bueno	Escasa
Virus	Bueno	Excelente	Bueno	Regular	Muy escasa
Protozoos (quistes, oocystos)	Escaso	Muy bueno	Muy escaso	Regular	Muy escasa
Helminfos (huevos)	Escaso	Excelente	Falta información	Regular	Nula

CLORO

Generalidades

El cloro, es un gas verde, que pesa dos veces y media más que el aire. Se le produce en forma gaseosa por electrólisis de una solución de cloruro de sodio. El cloro es un elemento químico, su símbolo es Cl.; peso atómico 35.357 g; punto de fusión -101.4°C; punto de ebullición -34.5°C; densidad 2.5 g/mL aproximadamente, (aire = 1 g/mL). El cloro líquido es

de aspecto oleoso, color ámbar, densidad 1.5 g/mL aproximadamente; se le obtiene en ese estado, comprimiendo a 1.74 atmósferas y enfriándolo a -18°C .

El cloro envasado puede estar en forma gaseosa, líquida o ambos. El gas y el líquido existen en estado de equilibrio para todas las condiciones de temperatura y presión. El cloro, puede aplicarse también utilizando algunos de sus derivados. Entre los más conocidos están la cal clorada y el hipoclorito de sodio que se encuentra en solución, el dióxido de cloro y la halazona.

Probablemente, no existe un proceso más difundido que la desinfección de las aguas mediante la cloración. La cloración, es la introducción del cloro en el agua, no sólo para desinfectarla, sino para lograr otros resultados biológicos o químicos. Así, la cloración mejora la coagulación en muchas aguas especialmente las que contienen complejos coloreados, y hierro (Cáceres, 1990).

Las condiciones básicas para aconsejar el uso de cloro como desinfectante de las aguas son:

1. Destruye los organismos causantes de enfermedades, realizando esta acción a la temperatura del ambiente y en un tiempo corto.
2. Es de fácil aplicación, manejo sencillo y bajo costo.
3. Su grado de concentración en el agua es determinado fácilmente.
4. "Es inocuo para el hombre y los animales, en las dosis utilizadas para la desinfección de las aguas".
5. Deja un efecto desinfectante remanente que protege al agua de posteriores contaminaciones (Dekker, 1995).

Otras de sus ventajas y desventajas que presenta la utilización del cloro y algunos de sus derivados se presentan en el anexo B.

Derivados del cloro:

a) Cal clorada

La cal clorada es una combinación de cal apagada y gas cloro. Se conoce con el nombre de cloruro de cal, polvo para blanquear e hipoclorito de cal. El oxicluro de calcio (CaOCl_2) es el componente básico del cloruro de cal seco. Al disolverse en el agua, el oxicluro de calcio se descompone en hipoclorito de calcio y cloruro de calcio:



El hipoclorito de calcio, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, es el compuesto activo en la desinfección del agua. La cal clorada, se expande en forma de polvo blanco, seco, con un leve olor a cloro o ácido hipocloroso. Contiene de 30 a 37 % de cloro disponible cuando el producto es de reciente fabricación.

b) Hipoclorito de calcio

El hipoclorito de calcio, difiere de la cal clorada, en que el cloruro de calcio inerte ya ha sido eliminado en gran parte. Por esta razón el hipoclorito de calcio puede prepararse para contener concentraciones altas de cloro disponible. En condiciones de almacenamiento adecuado, este polvo conserva su poder inicial durante un año o más, disolviéndose fácilmente en el agua dejando poco sedimento. El hipoclorito de calcio es un fuerte agente oxidante. En contacto con materiales combustibles puede ocasionar incendios; por esta razón debe almacenarse en un lugar fresco y seco. La solución de hipoclorito de calcio permanece estable por dos a tres semanas, siempre que esté protegida de la acción directa de la luz y mantenida a temperaturas más bajas de 26°C.

c) Hipoclorito de sodio

Es un líquido de color amarillento, que no contiene más del 15% de cloro activo (1 al 10%), se vende en depósitos de plástico o botellones de vidrio, conservando su actividad por lo menos durante tres meses.

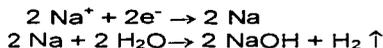
Se le prepara clorando hidróxido de sodio (sosa cáustica) lo que produce agua además de cloruro de sodio (sal común):



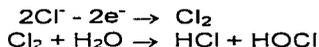
También se fabrica hipoclorito de sodio mediante la electrólisis de una solución de cloruro de sodio, procedimiento que también es llamado electro-cloración. Este procedimiento se utiliza principalmente cuando la solución de sal disponible se encuentra en forma de agua de mar; de esta manera se evita el inconveniente desde el punto de vista de seguridad, de tener un almacenamiento importante de cloro líquido..

La disociación iónica del cloruro de sodio mediante la electrólisis da las siguientes reacciones:

En el cátodo:



En el ánodo:



La sosa cáustica formada reacciona sobre los ácidos clorhídrico e hipocloroso, dando respectivamente cloruro de sodio e hipoclorito de sodio.

En forma general, la reacción que se produce es la siguiente:



La forma comercial concentrada o las soluciones preparadas, deben mantenerse fuera del alcance de la luz, pues ella disminuye la capacidad bactericida del compuesto. Por ello, antes de usar este compuesto en la desinfección de agua, es necesario constatar su verdadera concentración.

d) Dióxido de cloro

El dióxido de cloro, es un gas muy oxidante que no puede ser transportado en estado líquido como el cloro, por lo que es necesario fabricarlo en el mismo lugar donde se emplea. Las inversiones para la instalación de la planta productora de dióxido de cloro son elevadas, y solamente justificables para una producción superior a una tonelada por día, ya que el costo de este compuesto, de acuerdo con estudios realizados en Holanda, es 17 veces más caro que el cloro.

Se le produce haciendo reaccionar una solución de ácido clorhídrico sobre una solución acuosa de clorito de sodio. En otros casos se le produce también haciendo reaccionar agua clorada conteniendo de 3 a 4 gramos por litro, con una solución acuosa de clorito de sodio que contenga de 100 a 200 gramos de este compuesto por litro (Cáceres, 1990).

El dióxido de sodio posee propiedades bactericidas, esporocidas y también destruye virus y en algunos casos, compuestos orgánicos nocivos. El uso del dióxido de cloro, permite una rápida eliminación de bacterias en un rango de pH superior al del cloro, donde su velocidad de desinfección es superior al del cloro.

e) Halazona

Es un compuesto orgánico cuya fórmula es: $\text{NaOOC-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NCl}_2$ y que es bastante utilizado en casos de emergencia. Es un producto importado que evidentemente se fabricó para atender problemas de contaminación bacteriológica del agua de personal en campaña, ya que se señala que debe utilizarse una tableta por cantimplora de agua.

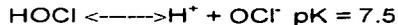
Reacciones del cloro con los componentes del agua residual

El cloro, más allá de su actividad desinfectante, sufre un número de reacciones químicas que deben ser consideradas, ya que éstas tienen entre sus productos compuestos organoclorados indeseables.

El cloro, reacciona con el agua, para formar el ácido hipocloroso (HOCl) y el ácido clorhídrico (HCl) según la reacción:



Esta reacción de hidrólisis que se produce en fracciones de segundo, es reversible. Además, el cloro como ácido hipocloroso, se disocia en iones de hidrógeno (H^+) e iones de hipoclorito (OCl^-), según la ecuación reversible.

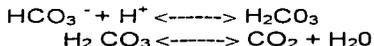


Estos compuestos de cloro que existen en el agua como ácido hipocloroso (HOCl) e ión hipoclorito (OCl^-) se les llama cloro activo libre. El (HOCl) es mucho más eficaz como

desinfectante que el ión (OCI⁻), el que para los efectos prácticos no se le considera como desinfectante.

Las cantidades relativas de las diferentes especies oxidadas del cloro son una función del pH. A 25° C y pH 7.5, las actividades del HOCl y del OCI⁻ son iguales.

Cabe anotar que la deficiencia de electrones del cloro en ambas formas los hace agentes muy activos y por lo tanto muy buenos oxidantes. Los protones producidos en esta reacción son neutralizados por el bicarbonato según:



Para lograr la desinfección de las aguas se dosifica a niveles conocidos de cloro activo, en cualquiera de sus diferentes formas, lo cual decrece luego de un periodo de contacto. Para producir el efecto desinfectante, el cloro dosificado debe ser consumido parcialmente. Es decir, luego del periodo de contacto debe mantenerse un nivel adecuado de cloro residual. A esta variación, entre el nivel de cloro teórico alcanzado luego de la dosificación y el nivel de cloro residual, se le denomina "demanda de cloro", y se debe a la gran variedad de reacciones entre el cloro activo y los compuestos presentes en el agua residual y también en algunas circunstancias a su propia descomposición. Ya se ha expresado el hecho de que el cloro libre reacciona con el amoníaco presente en el agua y también oxida a una serie de sustancias inorgánicas, dificultando así el mantenimiento de una cantidad de residual (combinado o libre) para la desinfección del agua.

La cloración sobre el punto de quiebre, consiste en añadir al agua tanto cloro como sea necesario, para oxidar todo el NH₃ presente en el agua, dejando además, un residual de HOCl, OCI⁻ (cloro residual libre) o una combinación de ambos, según el pH del agua. Lo expresado anteriormente, puede mostrarse en la figura 2.1.

En esta curva generalizada (cada tipo de agua, tendrá su propia curva), se puede observar que cuando se añade cloro al agua (como cloro líquido o gaseoso o compuestos clorados), las sustancias fácilmente oxidables tales como Fe⁺⁺, Mn⁺⁺, H₂S y la materia orgánica, reaccionan con el cloro reduciéndose la mayor parte de esta sustancia a ión cloruro (punto A).

Luego de satisfacer esta demanda inmediata, el cloro continuará reaccionando con el amoníaco para formar cloraminas entre los puntos A y B. En el caso de relaciones molares de cloro a amoníaco (C/N) menores que uno, se formarán monoclорamina y dicloramina, la distribución de estos dos compuestos viene regulada por sus velocidades de formación, que son a su vez dependientes del pH y la temperatura.

Las cloraminas restantes se oxidarán a óxido nitroso y nitrógeno, reduciéndose el cloro a ión cloruro. Con la adición continuada del cloro, casi todas las cloraminas se oxidarán en el punto de quiebre. La adición de cloro más allá del punto de quiebre dará como resultado un aumento directamente proporcional del cloro libre disponible. La razón fundamental para continuar añadiendo cloro suficiente para que aparezca cloro residual libre, es que la desinfección se logrará con toda seguridad, ya que se obtendrá un residual más estable, que puede ejercer su acción por un periodo prolongado, destruyendo también a los microorganismos patógenos en menor tiempo (D.S.E.N.Y, 1996).

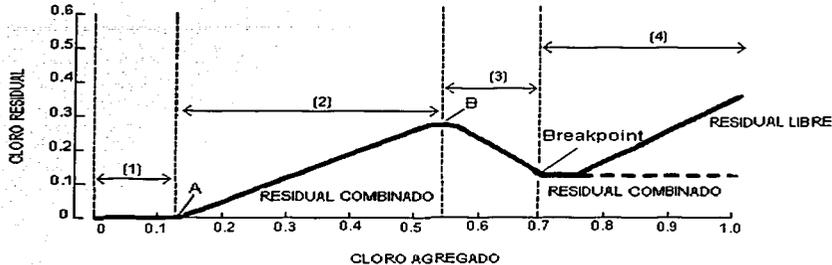


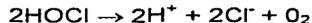
Figura 2.1. Reacciones del cloro en el agua (D.S.E.N.Y, 1996)

- (1) Destrucción del cloro por compuestos reductores
- (2) Formación de compuestos orgánicos de cloro y de cloraminas
- (3) Destrucción de cloraminas y compuestos orgánicos de cloro
- (4) Formación de cloro libre y presencia de compuestos orgánicos de cloro no destruidos

Se podrían agrupar estas reacciones de la siguiente forma:

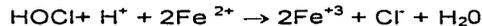
(1) *Reacciones provocadas por la radiación solar*

Se producen debido a la acción de la radiación ultravioleta que provee de energía para que se genere la reacción entre el cloro y el agua.



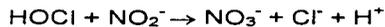
(2) *Reacciones del cloro activo con compuestos inorgánicos*

Estas reacciones se producen con compuestos inorgánicos reducidos, por ejemplo, Mn(II), Fe(II), NO₂⁻, S(II). En general estas reacciones de redox son rápidas, como por ejemplo en el caso del Fe(II).



Las reacciones del cloro con el S(II), NO₂ siguen este mismo comportamiento, al igual que el Mn(II) sólo que en este último ocurre sólo a pH > 8.5. A pHs altos también se formarán polisulfitos a partir de los sulfitos.

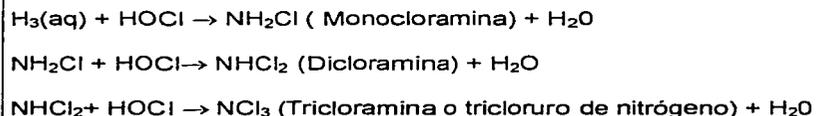
Si hay NO₂⁻ en el efluente el cloro activo lo oxidará a nitratos:



(3) Reacciones con el amonio y con el nitrógeno orgánico

Éstas son diferentes a las que se producen con los compuestos inorgánicos y orgánicos. El cloro activo cuando reacciona con el amonio genera los compuestos denominados cloraminas (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Productos de la cloración del amonio



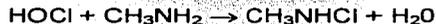
Asimismo, existe una variedad de productos libres de cloro que contienen nitrógeno (Tabla 2.4). Los mecanismos de reacción son complejos y los productos varían según las condiciones de pH, concentración del Cl_2 , nivel de amonio y tiempo de contacto. Puede resumirse como un proceso por pasos:

La formación de los productos finales de oxidación dados en la tabla 2.4, dependen de la relación cantidad de cloro/cantidad de nitrógeno amoniacal presente.

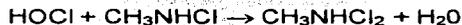
Tabla 2.4. Posibles productos de oxidación del amonio por cloro

Producto	Fórmula
Hidracina	N_2H_4
Hidroxilamina	NH_2OH
Nitrógeno	N_2
Óxido nitroso	N_2O
Óxido nítrico	NO^-
Nitrito	NO_2^-
Tetraóxido de nitrógeno	N_2O_4
Nitrato	NO_3^-

Con compuestos de nitrógeno orgánico el cloro reacciona fácilmente dando productos tales como la metilamina:

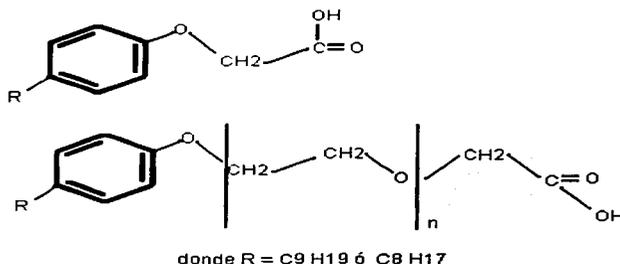


o de dicloro metilamina:



(4) Reacciones producidas con compuestos orgánicos

Son las que consideramos de mayor interés en el proceso de desinfección de aguas residuales. Las aguas residuales tienen un alto contenido de materia orgánica. Ésta tiene una enorme variedad de estructuras químicas las cuales dependen del origen de la misma. Aún así, se espera la presencia de ciertos tipos de materia orgánica. Por ejemplo, se espera encontrar carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, a diferentes niveles de biodegradación y otras materias de origen vegetal y animal; aceites y grasas, insecticidas, surfactantes y otros residuos sintéticos. Estos compuestos orgánicos tienen estructuras alifáticas y aromáticas, y contienen oxígeno y nitrógeno. Por ejemplo, los productos de la semibiodegradación de cierto tipo de surfactantes, los ácidos alquilfenoxi carboxílicos los cuales tienen las siguientes estructuras químicas (Marijan, 1987).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En general, la estructura fenólica y los compuestos alifáticos no saturados son bastante comunes. Por ejemplo, los derivados de la lignina, los ácidos húmicos y fúlvicos, los ácidos grasos no saturados, etc.

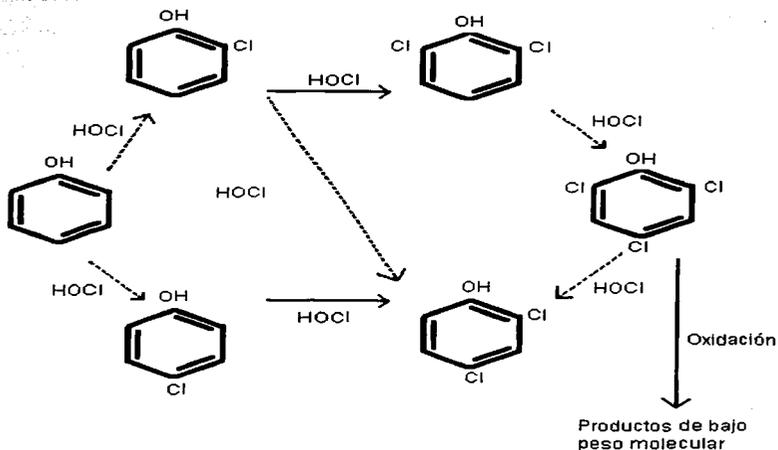
En el caso de compuestos orgánicos, los electrones más reactivos y por lo tanto los compuestos más fáciles de combinar serán aquellos que en su estructura tengan doble enlace. En la cloración de compuestos orgánicos se reconocen ciertos mecanismos típicos (Carrell, 1975). Por ejemplo:

1. Reacción con el anillo aromático, especialmente el fenólico.



La cloración puede ser extensiva, es decir, puede encontrarse la serie de fenoles clorados hasta pentaclorofenol. La actividad de cada anillo depende del tipo de compuesto de origen, cabe anotar el fuerte olor que presentan estos compuestos. Es posible que con una cloración intensiva y a concentraciones más elevadas se produzcan compuestos orgánicos clorados de menor peso molecular como los trihalometanos (Metcalf y Eddy, 1991). También se

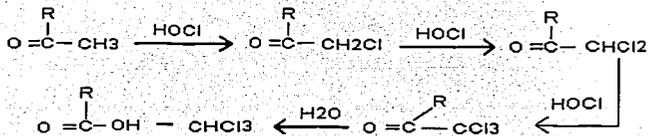
encuentra la ruptura del anillo aromático en la formación de cloroformo, como se muestra a continuación (Sechoing, 1984).



Adición a enlaces dobles



Formación de trihalometanos. Se tipifica el mecanismo de la siguiente manera:



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Según Norwood *et al*, éstos no son los únicos mecanismos en la formación de compuestos organoclorados, ya que a menudo se encuentran compuestos que no resultarían de estos mecanismos. Norwood *et al*, sugieren que aún falta mucha investigación para poder reconocer todos los procesos dentro de un sistema tan complejo como pueden ser las aguas naturales y residuales. De igual modo aún cuando se han identificado compuestos derivados de la cloración, hay muchos otros que aún no han podido ser determinados.

Más allá de las reacciones específicas se han realizado pruebas de cloración de aguas residuales municipales. Glaze *et al*, cloraron aguas residuales y posteriormente hicieron análisis de compuestos específicos por cromatografía de gas/espectrometría de masa. En lo que se refiere a compuestos clorados específicos se encontró una gran variedad de éstos. La gran mayoría son derivados de compuestos aromáticos, aunque también se encontraron compuestos no aromáticos (Tabla 2.5). Glaze *et al* coinciden con Norwood *et al* en que no todos los compuestos son el resultado de mecanismos conocidos.

Tabla 2.5. Principales compuestos organoclorados generados por la cloración de aguas residuales (Castro y Benavides, 1987).

Aromáticos	No aromáticos
O-Diclorobenceno	Cloroformo
Tricloroetilbenzeno	Cloro ciclohexano
p-Diclorobenceno	Dibromoclorometano
Triclorocumeno	Pentacloroacetona
Cloroetilbenzeno	3-Cloro-2-metil-1-eno
Diclorotolueno	Hexacloroacetona
Dicloroetilbenzeno	
Clorocumeno	
N-metil-tricloroanilina	
Triclorofenol	
Triclorodimetoxibenceno	
Tetraclorofenol	
Tetracloroetilestireno	
Tetracloro	
Triclorometilestireno	
dimetoxibenceno	

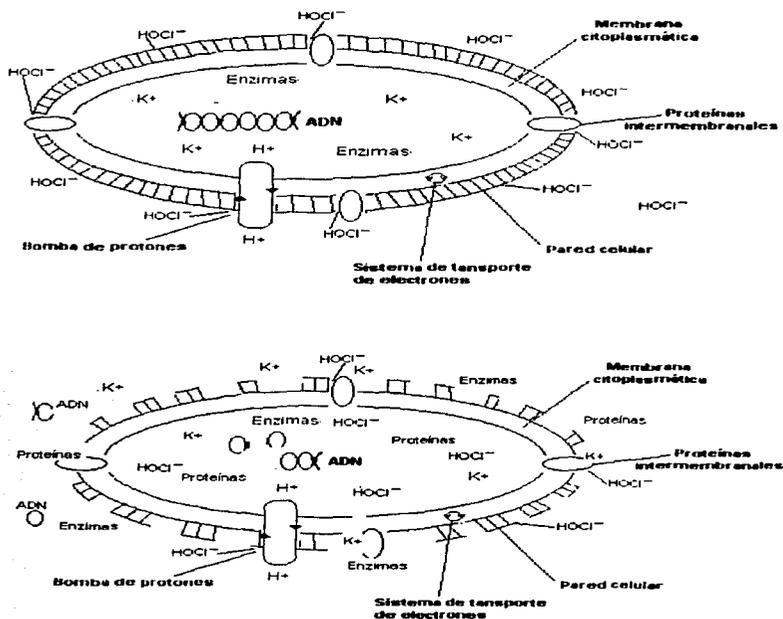
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Mecanismo de acción

En 1881, el bacteriólogo alemán Roberto Koch realizó observaciones sobre la manera en que el cloro mata a los microorganismos. Las observaciones mostraron que las células bacterianas, dosificadas con cloro liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio y las funciones de la membrana, tales como la respiración y transporte activo, son más afectadas por el cloro que los procesos citoplasmáticos, dirigiendo la atención de los investigadores a la superficie de la célula bacteriana. La hipótesis fue que la pared de las células bacterianas, bajo estrés ambiental, podría interactuar con el cloro. La exposición del cloro causa

alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared de la célula. Por lo tanto, destruye la barrera protectora de la célula, con lo que concluyen las funciones vitales y da lugar a la muerte del microorganismo (figura 2.2). Una posible secuencia de los casos durante la cloración sería:

- I) la interrupción de la pared celular mediante reacciones del cloro con sitios proyectados en la superficie bacteriana.
- II) descarga de los elementos constitutivos celulares vitales de la célula.
- III) terminación de las funciones asociadas con la membrana.
- IV) terminación de las funciones celulares dentro de la célula. Durante el curso de esta secuencia de casos, el microorganismo muere, lo que significa que ya no es capaz de crecer o causar enfermedad alguna. (Christman, 2001).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2.2. Mecanismo de acción del cloro (modificado de Denyer, 1991).

PLATA

Generalidades.

Elemento químico, símbolo Ag, número atómico 47 y masa atómica 107.870. Es un metal lustroso de color blanco-grisáceo. Desde el punto de vista químico, es uno de los metales pesados y nobles; desde el punto de vista comercial, es un metal precioso. Hay 25 isótopos de la plata. Sus masas atómicas fluctúan entre 102 y 117 densidad 10,5 (g/mL) punto de ebullición 2210 °C, punto de fusión 960 °C.

La plata coloidal es uno de los compuestos de plata utilizados para la desinfección del agua potable. Ésta es una suspensión de partículas de plata metálica submicroscópicas en una base coloidal, que no pueden verse a simple vista y permanecen suspendidas ya que están cargadas eléctricamente. También los iones plata son utilizados, los cuales son generados mediante un proceso electrolítico, que se utiliza como tratamiento secundario para la eliminación de bacterias y virus, lográndose así, mantener el agua libre de nuevas contaminaciones por varios meses.

La plata elimina bacterias no esporuladas y virus a concentraciones alrededor de 1000 veces menores que los niveles a los que resulta tóxica para los mamíferos (alrededor de 1 mg/día para los humanos o 0.05 mg/L en el agua para beber). Esta extrema diferencia de toxicidad entre mamíferos y bacterias es la definición de un material oligodinámico (Warrington, 1996).

El proceso oligodinámico de desinfección, requiere que la plata se encuentre en estado iónico. Se le llama "oligodinámica" o "fuerza de cantidades diminutas", a la acción desinfectante de ciertos metales como la plata (Cáceres, 1990). Estudios realizados muestran que se puede combinar la plata y el peróxido de hidrogeno, para obtener una mayor eficiencia en la desinfección de agua, obtener un mayor efecto residual, ser poco tóxico para el ser humano, formar pocos o ningún subproducto secundario, además de mejorar las propiedades organolépticas del agua tratada (Pedahzur *et al.*, 1997).

La plata es muy poco tóxica para los animales vertebrados cuando se encuentra en concentraciones menores a 0.05 mg/L es eliminada rápidamente cuando es ingerida oralmente. La plata se combina con las proteínas del plasma, y es removida por el hígado, y alrededor del 90% es eliminada en la bilis; mucha de ésta en las heces y una pequeña cantidad en la orina. La que no es excretada se deposita en la piel y las mucosas (MRI, 1975). La argiria es el único padecimiento que se conoce provocado por la plata, ésta se origina por la deposición de la plata, en todos los órganos. Los sitios comunes de deposición para gente quien no tiene una historia de uso terapéutico son el hígado, la piel, páncreas, adrenales, glomérulos del riñón, cerebro, medula espinal, paredes de los vasos sanguíneos, tiroides, glándulas mesentéricas, plexos coroidales y bazo. Generalmente la argiria se diagnostica por la apariencia gris de la piel y los ojos, la coloración plateada de las uñas de los dedos, un halo azul alrededor de la córnea y en la conjuntiva de los ojos, disturbios en la adaptación a la oscuridad y turbiedad en la cápsula del lente anterior del ojo.

Experimentos realizados con radioplatina indican que está asociada principalmente con el sistema retículo endotelial. La plata es concentrada en la membrana basal de la piel, en las fibras elásticas alrededor de las glándulas sudoríparas y en los ojos; generalmente en áreas expuestas al Sol. La coloración oscura de la piel en pacientes con argiria expuestos a radiación ultravioleta es causada probablemente por la fotoreducción del cloruro de plata a plata metálica, ésta es entonces oxidada a sulfuro de plata que tiene una coloración oscura, que finalmente se enlaza con los tejidos. Si la dieta es alta en selenio, el sulfuro de plata es convertido en selenuro de plata que puede resultar en altas deposiciones de plata contribuyendo así con el sulfuro de plata. (Berry y Galle, 1982).

La USEPA 1987 sugiere que los niveles de plata en agua para beber no deben ser mayores a 0.05 mg/L para proteger a la gente de posibles efectos adversos a la salud a largo plazo. Health and Welfare de Canadá y la US Public Health Service recomiendan una concentración máxima aceptable de 0.05 mg/L de plata en agua para beber (HWC 1978). A esta concentración le tomaría al humano 27 años de ingestión para acumular la dosis tóxica de 1 gramo de plata, asumiendo que no hay eliminación y que el consumo de agua es de 2 litros por día. En la práctica, la eliminación es del 90% de la dosis de ingesta. El criterio Australiano para el abastecimiento de agua cruda doméstica es de 0.05 mg/L (Hart, 1974; Anon y Aust, 1992) y en 1980 la IWD, Water Quality Branch también recomienda este nivel de plata para el abastecimiento de agua que es utilizada sin ningún tratamiento o con una simple filtración (ver Tabla 2.6). Cuando el agua ha recibido un tratamiento químico, la concentración recomendada es de 0.2 mg/L (Taylor, 1980).

Tabla 2.6. Criterios de la literatura para la protección del agua potable (Warrington, 1996)

Criterios (mg/L)	Jurisdicción	Referencias
0.05	EPA-regulación	USEPA 1987
0.09	EPA-propuesta de regulación	USEPA 1989
0.05	FDA-regulación permitida en agua embotellada	USFDA 1988
0.05	EPA pauta recomendada del límite	USEPA 1985
0.05	EPA- pauta de los criterios ambientales para el agua	USEPA 1980b
0.05 (máximo)	E.E.U.U. regulaciones individuales de los Estados	CELDS 1989
0.05	Australia	1992 ANÓN

Reacciones de la plata con los componentes del agua residual

La plata elemental, tiene al 0 como estado de oxidación más común, seguido por el ión +1 monovalente. La mayoría de los estudios han sido conducidos hacia estas dos formas. La plata en estado de oxidación +2 y el raro +3 no han sido bien estudiados. El estado de oxidación +2 es generado por la oxidación ácida de la solución de iones +1 con persulfato,

flúor u ozono. Una vez formados los estados +2 y +3 son más estables en soluciones ácidas especialmente en ácido fosfórico, ocurriendo la reducción del estado +1 muy lentamente.

En soluciones ácidas el estado +1 es soluble y puede precipitar en soluciones alcalinas, a pH entre 7.5 y 8 la plata se hidroliza como óxido o como una sal básica. La precipitación de la plata en soluciones alcalinas también depende de la presencia de otros iones como Cl^- , Br^- , o I^- para formar haluros, también como Ag_2O si está presente como H_2S o S^{2-} , y como tiosulfato, fosfato, cromato o arsenato en presencia de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, PO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , o AsO_4^{3-} , respectivamente (Anon, 1990; Thompson, 1973).

La plata no reacciona con ácidos diluidos no oxidantes (ácidos clorhídrico o sulfúrico) ni con bases fuertes (hidróxido de sodio). Sin embargo, los ácidos oxidantes (ácido nítrico o ácido sulfúrico concentrado) la disuelven al reaccionar para formar el ión positivo de la plata, Ag^+ . Este ión, que está presente en todas las soluciones simples de compuestos de plata solubles, se reduce fácilmente a metal libre, como sucede en la deposición de espejos de plata por agentes reductores orgánicos. La plata casi siempre es monovalente en sus compuestos, pero se conocen óxidos, fluoruro y sulfuro divalentes. Algunos compuestos de coordinación de la plata contienen plata divalente y trivalente. Aunque la plata no se oxida cuando se calienta, puede ser oxidada química o electrolíticamente para formar óxido o peróxido de plata, un agente oxidante poderoso (Jenne, 1978).

El oxígeno en el aire es adsorbido en la superficie de la plata como oxígeno atómico, y éste se acomoda dentro de los huecos de la estructura octaédrica de la plata formando el óxido de plata. Este almacenamiento de oxígeno, contribuye significativamente al poder oxidativo de la plata, que cataliza la oxidación de bacterias y virus, resultando en su completa desintegración. También contribuye a la oxidación de otros compuestos orgánicos e inorgánicos, formando peróxidos relativamente estables que continúan con la sanitización del agua.

Análisis con espectroscopía de rayos-X y difracción de neutrones revelaron que la unidad celular de peróxido de plata, mucho tiempo conocida como AgO , actualmente consiste de 2 Ag(I) , 2 Ag(III) y 4 átomos de oxígeno (Ag_4O_4), (Davies y Etris, 1997).

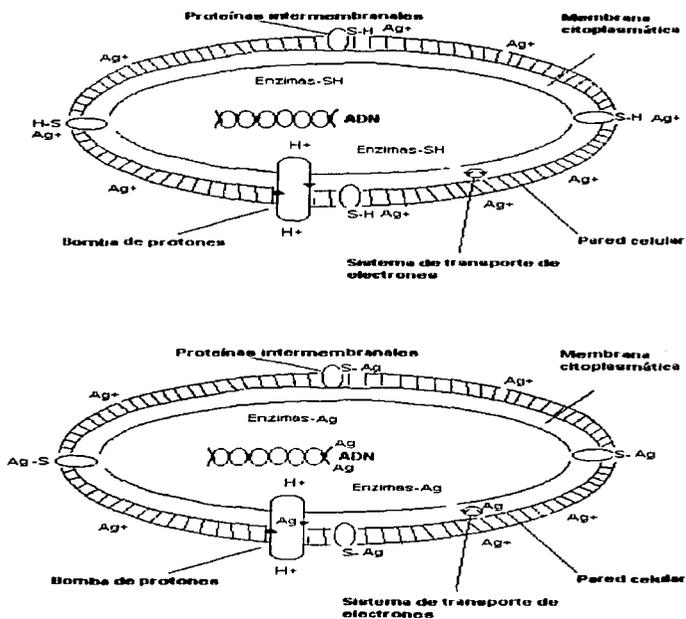
Los complejos sulfuros o los iones polisulfuros o hidrosulfuros pueden formarse en agua con altos niveles de H_2S o S^{2-} . La plata puede también ser disuelta como un complejo de azufre, arsénico, antimonio, telurio y selenio. Puede existir en forma coloidal como una parte integral o adsorbida, dentro de varios complejos húmicos como AgCl , Ag_2S , Ag_2Se y Ag_3AsS_3 , o disolverse como acetatos, tartratos y otros compuestos orgánicos. También puede ser adsorbida dentro del plancton o en el interior de los microorganismos (Taylor, 1980). No hay evidencia que la plata sea transformada en compuestos potencialmente tóxicos para los seres vivos (como el mercurio en metil mercurio). La plata iónica es más tóxica para los organismos acuáticos que los compuestos de plata. Los complejos de tiosulfato de plata se fragmentan para formar sulfuro de plata, que es menos tóxico que el ión plata.

Mecanismo de acción

Los iones de plata actúan como venenos protoplasmáticos al combinarse con las proteínas de las células bacterianas. Los efectos biológicos de la plata son aparentemente debidos a enlaces reversibles con enzimas y otras moléculas activas en la superficie de las células, debido a la afinidad de la plata por los grupos sulfhidrilos (-SH) ésta destruye las membranas

de los microorganismos, inhabilita las proteínas e inhibe las enzimas. Los sitios activos de las enzimas que son afectados por la plata son aparentemente los grupos funcionales ricos en electrones tales como los grupos -SH (Warrington, 1996), llevándose a cabo la desinfección cuando la plata se une a los pares de grupos sulfhidrilos (SH) en la superficie de las bacterias, en las enzimas y en las proteínas que contengan estos grupos, reemplazando los átomos de hidrógeno en un medio acuoso; resultando en la unión de los átomos de azufre como estructuras R-S-S-R, lo cual bloquea completamente la respiración y la transferencia electrónica. Este hecho provoca la muerte bacteriana (figura 2.3). La acción de la plata se lleva a cabo a través de la liberación de iones plata. La plata reacciona con los microorganismos por uno o por los tres mecanismos siguientes:

- I) Destrucción de los microorganismos por oxidación catalizada por la plata.
- II) Rompimiento de la transferencia electrónica en bacterias y previniendo el desdoblamiento del DNA por enlaces con las bases, las ribosas y los grupos fosfato (Klein, 1978) en las bacterias y los virus al sustituirse los iones hidrógeno por plata monovalente.
- III) Los grupos S-Ag son muy estables e inhiben la transferencia de hidrógeno, es decir, su sistema de transferencia de energía (Davies y Etris, 1997).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2.3. Mecanismo de acción de los iones de plata (modificado de Denyer, 1991).

c) Métodos biológicos

Otra alternativa de desinfección podría ser la utilización de agentes biológicos, como lo es la utilización de protozoarios. Los protozoarios representan un eslabón muy importante dentro de la cadena o trama alimentaria presente a lo largo del proceso de biodegradación de la materia orgánica existente tanto en cuerpos de agua natural como aquéllos sometidos a tratamientos biológicos en plantas. Estos microorganismos son los responsables de disminuir de manera considerable la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundaría en la disminución del grado de turbiedad, debido al efecto depredador y de aglomeración que los protozoarios ejercen sobre las bacterias.

De manera particular, los protozoarios ciliados son responsables de una considerable proporción de la purificación de aguas residuales. Resultados experimentales a nivel de laboratorio, empleando agua residual doméstica, tratada en presencia y en ausencia de ciliados, evidenciaron que cuando los ciliados están presentes existe mayor remoción de contaminantes. Los porcentajes de remoción logrados son superiores en 40% para el material orgánico disuelto (medido como demanda química de oxígeno), 50% en contenido de nitrógeno orgánico y de 70%, tanto en sólidos suspendidos como en bacterias (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

La familia de los paramecios ha sido la más estudiada de todos los ciliados, además de ser ampliamente empleada en experimentos biológicos. Leeuwenhoek los describió con sus primitivos lentes en el siglo XVII; fue repetidamente observado en el siglo XVIII y fue uno de los objetos favoritos de estudio en la edad de oro de la citología a finales de 1800s. En 1937 T. M. Sonneborn descubrió diferentes tipos de *Paramecium*, y fue el más hábil para inducir el proceso sexual bajo control. El *Paramecium* es el ciliado más fácilmente domesticado, en este sentido ha sido puesto bajo estricta disciplina en el laboratorio como un instrumento más para la investigación científica.

Las razones de la gran popularidad del *Paramecium* son muy fáciles de entender. Los paramecium son organismos grandes, que miden desde 80 a 350 μm de largo y de 40 a 80 μm de ancho, dependiendo de la especie. Este gran tamaño permite realizar microcirugías y mediciones electrofisiológicas en células individuales. Las exploraciones visuales del *Paramecium* pueden realizarse con un poder óptico bajo. Su cultivo es simple y barato, puede ser recolectado en agua dulce estancada alrededor del mundo (Nanney, 1980).

Paramecium caudatum

De manera particular nos referiremos al *Paramecium caudatum* ya que es el protozoo que se eligió para realizar el estudio comparativo del presente trabajo. Se eligió debido a que es el protozoo ciliado libre nadador, más conocido y más abundante en la naturaleza ya que está ampliamente distribuido en agua dulce estancada con materia orgánica en descomposición (Kudo, 1985).

El *Paramecium caudatum* es un ciliado que mide de 180 a 300 μm de largo; Tiene un cuerpo alargado cuya forma recuerda la huella de una suela o un puro; el extremo anterior es ligeramente agudo y el posterior redondeado, con varios cilios "caudales" más largos. La ciliatura somática es uniforme, formada por 116 a 120 cinetias contadas a partir del lado

derecho del cistosoma que se presenta ventralmente (Luna-Pabello *et al.*, 1994). Con un macronúcleo central ovoide y un micronúcleo compacto cercano a éste. Presenta dos vacuolas contráctiles localizadas dorsalmente y el extremo posterior es punteado obtusamente (Kudo, 1985).

Los Paramecium tienen alrededor de 10,000-14,000 cilios en la superficie de la célula y se mueven alrededor de 1000 μm por segundo. En el Paramecium la dirección del movimiento: ciliar eficaz es oblicuo respecto al eje longitudinal del cuerpo, esto hace que el ciliado nade en espiral al mismo tiempo que gira sobre su eje longitudinal, este movimiento puede invertirse y con ello el Paramecium retrocede como una reacción de evasión ante alguna sustancia u objeto indeseable. Los Paramecium se reproducen por fisión binaria y en intervalos se someten a dos tipos de reorganización nuclear que son la conjugación y la autogamia. Esta reorganización nuclear parece que tiene un efecto rejuvenecedor y resulta necesaria para la fisión asexual, se ha demostrado que el Paramecium sólo puede pasar unas 350 generaciones asexuales continuas. Si no ocurriese la reorganización nuclear, la línea asexual (o clon) se muere, aparentemente debido a la disminución de la función del macronúcleo (Ruppert y Barnes, 1996).

Los ciliados libres nadadores exhiben varios tipos de hábitos alimenticios, el *Paramecium caudatum* es considerado como microbívoro, ya que se alimenta de bacterias (aproximadamente 5000 bacterias al día), materia orgánica en descomposición, pequeños protozoos, algas y levaduras, mediante la intercepción directa de los mismos por su cavidad bucal. El proceso de alimentación se lleva a cabo mediante la retención de las partículas que son introducidas a través de la cavidad bucal hacia la vacuola alimenticia en formación que cuando alcanza un determinado tamaño se desprende de la citofaringe y en su lugar se forma una nueva vacuola. La vacuola digestiva formada se fusiona con vesículas ácidas (acidomas), y se suprime alguna membrana celular, por lo que la vacuola disminuye su tamaño hasta un 50%, y el pH baja de 7 a 3. En este momento se unen lisosomas a la vacuola, pero los contenidos son demasiado ácidos para la acción enzimática, por lo que por razones todavía desconocidas el pH aumenta a un valor de 4.5 a 5 iniciando la digestión. Al término de la digestión la vacuola se dirige hacia una abertura fija, o citoprocto, en la superficie del cuerpo y expulsa su contenido (figura 2.7). El ciclo de digestión en el *Paramecium caudatum* es bastante corto, después de 40 minutos alrededor del 90% de las células han completado la digestión y defecado (Ruppert y Barnes, 1996).

La capacidad de limpiar el agua y concentrar la comida disponible en ellos es considerable en este tipo de ciliados. Estudios realizados muestran que los microbívoros pueden generalmente limpiar de 3×10^3 a 3×10^4 veces su propio volumen de agua en una hora. Para ciliados del tamaño del Paramecium, que se alimentan con grandes bacterias, levaduras y microflagelados, esto representa limpiar entre 2×10^{-4} y 2×10^{-3} mL h^{-1} (Lagbourn, 1984).

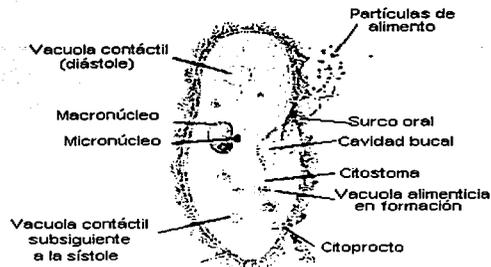


Figura 2.4. Esquema de los componentes de un *Paramecium caudatum* (Ruppert y Barnes, 1996).



Figura 2.5. Microfotografía de *Paramecium caudatum* 20 X, contraste de fases.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

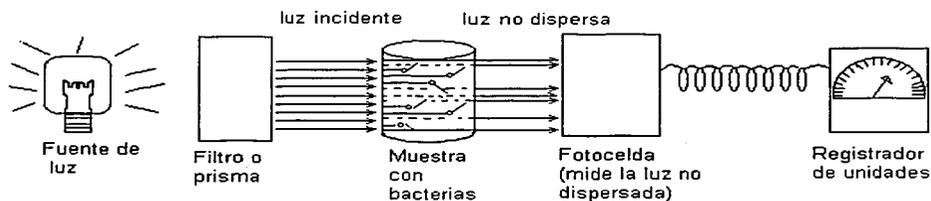
Existen numerosos métodos que permiten establecer el número de microorganismos en una muestra dada, en general éstos se dividen en: métodos directos con los que se determina la cantidad total de microorganismos (vivos y muertos) y los métodos indirectos o culturales los que cuantifican únicamente a los microorganismos vivos (viables).

2.3.1. Métodos directos

Mediante éstos, se establece la población total de microorganismos existentes en una muestra. Tienen la ventaja de ser rápidos; sin embargo, a través de ellos es imposible diferenciar a las células vivas de las muertas. La estimación del número total de microorganismos se realiza por espectrofotometría, microscópicamente (frotis) o con contadores electrónicos.

a) Espectroscopia

En una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la densidad óptica de ésta, e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma. De este modo, se puede precisar con bastante exactitud el número de microorganismos presentes en una suspensión mediante la determinación de la absorbancia, para ello se emplean espectrofotómetros (figura 2.6).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.6. Esquema básico del funcionamiento de un espectrofotómetro (Ramírez-Gama *et al.*, 2000)

La suspensión microbiana se deposita en una cámara o tubo claro, con una fuente se hace incidir un haz de luz sobre la suspensión y mediante una celda fotoeléctrica se registra la intensidad de luz transmitida que sale de la cubeta. Los resultados se comparan con una curva estándar como la escala de McFarland, que se basa en la mezcla de concentraciones crecientes de cloruro de bario con concentraciones decrecientes de ácido sulfúrico, obteniéndose un precipitado de sulfato de bario en cantidades diferentes. La turbidez producida por cada mezcla ha sido calibrada para aproximar un cierto número de bacterias en suspensión.

Esta metodología es útil con suspensiones de densidad microbiana baja y con cultivos, en donde los microorganismos son unicelulares y con un tamaño de unos cuantos μm , características que les permiten mantenerse suspendidos y homogéneamente distribuidos. Con microorganismos de mayor tamaño, así como con aquellos productores de polisacáridos y los que forman conglomerados, este tipo de método no es adecuado (Ramírez-Gama *et al.*, 2000).

b) Recuento microscópico en frotis (método de Breed)

Un volumen conocido de la muestra (generalmente 0.01 mL), se distribuye uniformemente en una superficie conocida (por ejemplo 2.0 cm^2), la preparación se tiñe y se examina con el microscopio que ha sido calibrado de tal forma que se conoce el diámetro del campo microscópico; se cuentan los microorganismos en diversos campos microscópicos, se obtiene el valor medio de células por campo, éste se multiplica por el número de campos microscópicos comprendidos en la preparación con lo que se obtiene el número de microorganismos existentes en el volumen extendido (0.01 mL), el que al multiplicarse por 100 indica el total de microorganismos/mililitro. Este método es bastante exacto cuando se trabaja con muestras que contienen poblaciones abundantes, en cambio cuando las poblaciones son pequeñas, el margen de error es más grande (Ramírez-Gama *et al.*, 2000).

2.3.2. Métodos indirectos o culturales

El postulado básico en que se fundamentan indica que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo, se multiplica y produce datos de fácil identificación tales como: la formación de colonias en placas de agar o la producción de turbiedad, gas o cambios del pH en los cultivos líquidos. Los métodos indirectos no ofrecen confiabilidad para efectuar la estimación de todos los grupos microbianos existentes en una muestra, esto debido a que no existe un medio de cultivo o grupo de condiciones ambientales que permitan el desarrollo de todos los grupos microbianos presentes (Ramírez-Gama *et al.*, 2000).

Lo anterior puede lograrse parcialmente a partir del uso de medios específicos para cada grupo microbiano que se desee estudiar según sus características nutrimentales. En este sentido, los métodos indirectos para la cuenta de bacterias son importantes, siendo los más empleados el de cuenta en placa, filtración por membrana y el número más probable, comúnmente conocido como NMP (Armendáriz *et al.*, 1998).

a) Métodos de cuenta en placa

Éstos involucran la dispersión de la muestra que se estudia, en un medio con agar. Se basan en el supuesto de que cada célula bacteriana incluida en un medio con agar o en la superficie, al multiplicarse dará origen a un cúmulo de células que producen una colonia (Pelczar, 1977). En esta técnica la muestra líquida se diluye progresivamente y de cada dilución se inoculan cajas de Petri; sobre éstas se adiciona un medio de cultivo solidificable que se mueve de manera circular en varios sentidos, para homogeneizar la muestra con el medio y obtener colonias separadas y fácilmente cuantificables, se incuban y se observa el efecto de la dilución para seleccionar las cajas que tengan entre 30 y 300 colonias; el recuento se realiza a simple vista o colocando las placas sobre una pantalla iluminada que tiene una lente de aumento que es llamada cámara cuenta colonias (figura 2.7), reportándose los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

Los errores más frecuentes son los siguientes: falta de destreza del operador; temperatura inadecuada de los medios de cultivo al vaciarlos en las cajas de Petri; desigual distribución de los microorganismos en la muestra; tamaño de la alícuota; pureza de los medios utilizados y aparición ocasional de colonias mal definidas (Armendáriz *et al.*, 1998).

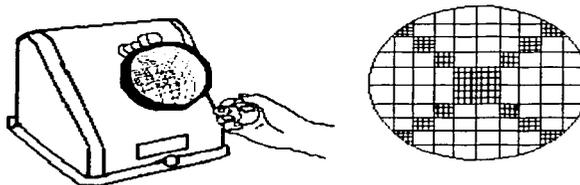


Figura 2.7. Cámara cuenta colonias (Ramírez-Gama *et al.*, 2000)

b) Método por filtro de membrana

Este procedimiento es muy útil para establecer el número de microorganismos en muestras que contienen una población muy reducida de microorganismos como son aguas potables renovadas, de balnearios, depósitos naturales, etc., pero su uso en aguas residuales no es recomendable debido a que se necesitan altas diluciones de la muestra (Fernández, 1981).

La técnica de filtración de membrana es rápida y sencilla para estimar la población de bacterias en agua. El primer paso es hacer pasar un volumen apropiado de la muestra a través de una membrana con poros pequeños de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro para retener las bacterias. La membrana con los microorganismos retenidos, se coloca en una placa sobre una almohadilla saturada con medio de cultivo selectivo junto con la muestra, se invierte la caja y se incuba a temperatura adecuada (figura 2.8). Las colonias desarrolladas después de la incubación son contadas bajo un microscopio estereoscópico, reportándose los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/100 mL).

Este tipo de técnica es la más utilizada para llevar a cabo el control sanitario de diferentes tipos de aguas pero generalmente se utiliza para aguas potables. Uno de los inconvenientes de esta técnica es que no es recomendable cuando la muestra presenta microorganismos "estresados" o bajo tensión, como los procedentes de efluentes clorados, aguas salinas y en aguas contaminadas con metales pesados o residuos orgánicos tóxicos ya que se obtienen resultados falsos negativos (Armendáriz *et al.*, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

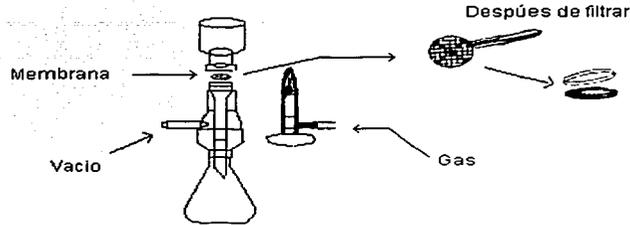


Figura 2.8. Equipo milipore (Ramírez-Gama *et al.*, 2000)

c) Método de Número Más Probable (NMP)

Ésta es una técnica estadística, que se fundamenta en la teoría de la probabilidad. Para su realización se preparan múltiples series de diluciones decrecientes, con cada dilución se inoculan varios tubos que contienen el medio de cultivo adecuado. Posteriormente los tubos se incuban y se observan, con la finalidad de registrar los tubos donde hubo desarrollo de microorganismos. En cada caso, una lectura positiva significa únicamente, que al menos un microorganismo estaba presente en la alícuota usada para la inoculación. Con base en la teoría de la probabilidad y resolviendo una ecuación matemática, es posible calcular a partir del número de tubos positivos y negativos que recibieron cierta cantidad de inóculo, el NMP de microorganismos por volumen de muestra, para ello se utilizan patrones con resultados conocidos y las tablas de probabilidad estadística (Ramírez-Gama *et al.*, 2000).

La técnica de NMP es ideal para aplicaciones en aguas residuales y lodos, pues los analistas pueden utilizar muestras muy turbias diluyéndolas antes del análisis, además, es una técnica aprobada por USEPA como prueba presuntiva para coliformes totales y fecales. Uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es que requiere de mayor cantidad de material a preparar, mayor tiempo para la obtención de resultados, además de presentar errores estadísticos dando como resultado una menor exactitud y precisión del total de microorganismos presentes en la muestra. Esta técnica se sugiere únicamente cuando las muestras a analizar son muy turbias o cuando se desee conocer de manera aproximada la cantidad total de microorganismos presentes en grandes volúmenes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien la desinfección de los sistemas de abastecimiento de agua potable, se lleva a cabo casi universalmente mediante el uso del cloro, debido a su capacidad para eliminar microorganismos patógenos, mantener una concentración remanente en el sistema de distribución, su amplia disponibilidad y costo moderado. Presenta como su principal desventaja que es un agente químico muy activo en el agua, reaccionando con gran cantidad de sustancias disueltas, formando compuestos que pueden ser mutagénicos cancerígenos como los trihalometanos y los haloácidos entre otros.

Debido a lo anterior se plantea la posibilidad de utilizar métodos alternos de desinfección de aguas residuales como compuestos de plata, los cuales poseen, al igual que el cloro, un efecto desinfectante remanente, pero sin la formación de productos secundarios tóxicos.

Asimismo, se tiene otra alternativa que es el uso de agentes biológicos, como el ciliado libre nadador *Paramecium caudatum* que es un predador natural de bacterias presentes en ambientes acuáticos, sin el inconveniente de generar productos cancerígenos como el cloro y la relativa dependencia y mayor costo económico que implica el manejo de la plata.

Es por ello que se quiere conocer la eficiencia de desinfección de la plata coloidal y la capacidad predatora del *Paramecium caudatum* con respecto a la del cloro mediante la realización de un estudio comparativo.

Para realizar una evaluación veraz y confiable del poder germicida de los desinfectantes, y la capacidad predatora del *Paramecium caudatum* es necesario la selección del método de cuantificación de bacterias más adecuado, tomando en cuenta para ello las diferentes técnicas disponibles en el laboratorio. Para ello, se realizó de manera previa un estudio comparativo de esas técnicas procediendo a elegir la más adecuada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Establecer y comparar la eficiencia de hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum* para eliminar *Escherichia coli* en muestras de agua residual pretratada biológicamente.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar de entre las técnicas: cuenta en placa, número más probable, filtro de membrana, absorbancia y frotis, cual es la más adecuada para cuantificar *Escherichia coli* en muestras de agua residual pretratada biológicamente.

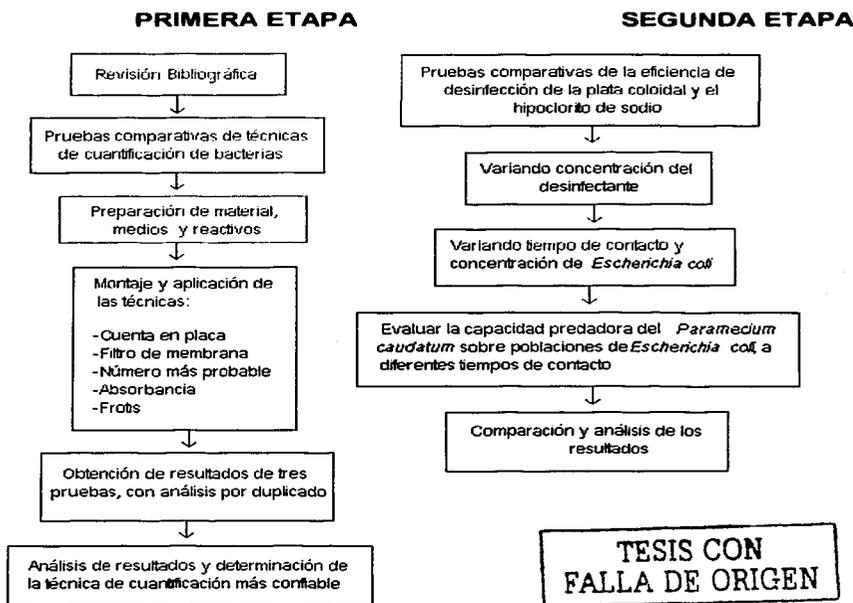
- Establecer la eficiencia de desinfección de la plata coloidal y del hipoclorito de sodio en muestras de agua residual pretratada biológicamente y estéril modificando la concentración de *Escherichia coli* inoculada, el tiempo de contacto y la concentración del agente desinfectante empleado.
- Cuantificar la capacidad predatora del *Paramecium caudatum* sobre poblaciones de *Escherichia coli*, en suspensión y analizar estos resultados con los obtenidos usando plata coloidal e hipoclorito de sodio.

5. HIPÓTESIS

Es posible que concentraciones equivalentes de plata coloidal, hipoclorito de sodio y *Paramecium caudatum* presenten la misma eficiencia de eliminación de *Escherichia coli* en suspensión.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

6.1 Diagrama de flujo



2. Tipo de estudio

El estudio realizado es prospectivo, longitudinal, experimental, comparativo.

6.3. Población:

- *Escherichia coli* ATCC 25922. Preceptol culture. FDA strain seattle 1946, F. Schoenknecht. (DSM 1103; NCIB 12210) aislada clínicamente. Organismos control como testigos de sensibilidad de bacterias para cefalotin sodico, cefaloridina, cefaloglicin dihidratado y cefaloxin monohidratado (Literatura utilizada Diciembre 22 1970 en discos de cefalotin por Eli Lilly on Co., Indianápolis, Indiana); Pruebas estandarizadas, incluyen discos testigos para susceptibilidad de antibióticos y MIC de ampicilina, bacitracin, cefalotin, carbenicilina, cloranfenicol, clindamicina, colistin, eritromicina, gentamicina, kanamicina, oleandomicina, penicilina G, polimixina B, estreptomocina, tetraciclina, (Código Federal de Regulación, Título 21 parte 460, 1987); recomendado como referencia internacional estándar strain for antibiotic disc-susceptibility-testing de amikacina, ampicilina, carbenicilina, kanamicina, neomicina, polimixin B, estreptomocina, tetraciclina y tobramicina (WHO expert committee on Biological standardization, 28th report, WHO Tech. Rep. Ser 610: 122, 1977. Modificado de Kirby-Bauer testigos de susceptibilidad de cloranfenicol, colimicina, kanamicina, tetraciclina, neomicina, gentamicina y ácido nalidixico (Antimicrob, Agents Chemother. 3: 418-424, 1973). Comentario: cita incorrecta en previas ediciones de este catalogo es identico a NCTC 10418 , Medio recomendado No. 18 (Agar soya tripticasa a 37°C) (Gherna *et al.*, 1989)
- *Paramecium caudatum*, ciliado libre nadador de vida libre en agua dulce, cultivado en medio de infusión de lechuga a temperatura ambiente (Galtsoff, 1989).

6.4. Criterios:

i) Inclusión

- Se utilizó agua residual, proveniente del efluente del tanque sedimentador del sistema de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de ciudad universitaria.
- Se utilizó exclusivamente una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Se utilizó un ciliado libre nadador (*Paramecium caudatum*) proveniente de una sola fuente de agua estancada.

ii) Exclusión

No se utilizó agua residual proveniente de otro sistema de tratamiento ni otro tipo de agentes desinfectantes.

6.5. Variables:

Independientes:

- Tiempo de contacto.
- Concentración de hipoclorito de sodio.
- Concentración de Plata coloidal.
- Presencia/ausencia de *Paramecium caudatum*.
- Concentración de *Escherichia coli* inoculada.

Dependientes:

- Concentración de *Escherichia coli* remanente.

6.6. Diseño estadístico.

Con los resultados obtenidos se llevaron a cabo los casos de análisis para su comparación estadística. Para realizar dicha comparación se deben cumplir los requisitos siguientes:

- Independencia de los datos
- Poblaciones con distribución normal
- Varianzas iguales de las poblaciones

1. Prueba de independencia

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó la distribución ji-cuadrada, que es la prueba de hipótesis de que dos criterios de clasificación, cuando son aplicados a las mismas unidades elementales, son independientes (Mendenhall, 1997; Montgomery y Hines, 1993).

2. Prueba de normalidad

Para la ejecución de la prueba de la normal se contrastaron los datos con la ji-cuadrada. La hipótesis nula que se estableció fue *los datos se comportan de acuerdo a una distribución normal* (Walpole y Myers, 1992).

3. Prueba de igualdad de varianzas

Se decidió emplear la prueba de Bartlett para probar la condición de que las varianzas de las poblaciones a comparar sean iguales. Esta prueba es menos sensible a la condición de independencia que la prueba F convencional de igualdad de varianzas, aunque también es un requisito a cumplir (Mendenhall, 1997; Montgomery y Hines, 1993):

4. Prueba de la diferencia significativa mínima (DSM).

Esta prueba se define como la diferencia mínima que podría existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes. Se basa en la prueba t de Student para la diferencia entre dos medias cuando las varianzas son iguales. El estadígrafo utilizado para esta prueba es:

$$DSM = (t_{1-\alpha, 2, g/erro}) \cdot (2s^2/n)$$

La información que se muestra aquí, es descrita más ampliamente en el anexo D.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. MATERIALES.

7.1.1. Medios de cultivo, soluciones y reactivos.

- Medio MFC (medio para coliformes fecales):
- Caldo nutritivo:
- Agar nutritivo o gelosa:
- Caldo Lauril-triptosa
- Agar Endo:
- Solución salina isotónica:
- Agua peptonada al 1%
- Ácido sulfúrico al 1%
- Cloruro de bario al 1%
- Azul de Evans (0.75 mg/mL)
- Solución neutralizante
- Cristal violeta con oxalato de amonio
- Lugol (solución de yodo yodurado)
- Alcohol-acetona
- Safranina

7.1.2. Equipo

- Espectrofotómetro UV/Visible de la marca *Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000*, Modelo 80-2106-20
- Microscopio bifocal
- Incubadora con agitación orbital
- Incubadora con camisa de agua
- Microscopio de contraste de fases
- Microscopio estereoscópico
- Autoclave

7.1.3. Cristalería

- Tubos de ensayo de 16 x 150'
- Cajas de petri estériles
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Vasos de precipitado de 250 y 50 mL
- Probeta de 100 mL
- Pipetas graduada de 1, 5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Pipetas pasteur
- Frascos de dilución 150 mL
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Campanas de Durham
- Buretas de 10 y 25 mL

7.2. PRUEBAS COMPARATIVAS DE LAS TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

La comparación entre las diferentes técnicas de cuantificación de bacterias, se realizará de acuerdo con lo establecido en los métodos normalizados americanos (APHA, 1998). Las muestras se evaluarán simultáneamente por duplicado para efecto de análisis estadístico. Los resultados obtenidos permitirán fundamentar la selección de la técnica más adecuada para el seguimiento de los experimentos relacionados con la evaluación del poder germicida de la plata coloidal y el hipoclorito de sodio.

7.2.1 Preparación del inóculo

- Para la preparación del inóculo empleado, se utilizó una asada de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual se activó primero en 100 mL de caldo nutritivo de 18 a 24 horas en una incubadora con agitación orbital a 250 rpm y 37°C (Miranda, 2002).
- Transcurrido el tiempo, se realizó la medición de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro UV/Visible, ajustando el inóculo a 1.2 con caldo nutritivo estéril.
- Posteriormente se transfirió 1 mL del inóculo ajustado, a un frasco de dilución con 99 mL de agua peptonada estéril, para obtener una dilución decimal 10^{-2} , de la cual se tomó 1 mL y se depositó en 100 mL de caldo nutritivo, incubándose bajo las mismas condiciones antes mencionadas.
- Del mismo frasco de dilución se realizó la cuenta en placa de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} , por duplicado, para tener un valor de referencia de la cantidad de bacterias contenidas en el primer inóculo como control de calidad.
- Transcurrido el tiempo se realizó el ajuste del inóculo a 1.2 de absorbancia de la misma forma que se había hecho anteriormente.

7.2.2. Método por absorbancia

- Se realizó una escala de Macfarlan de la siguiente manera:
- Se identificaron 10 tubos de ensaye con números del 1 al 10.
- Con una bureta de 1.0 mL, se agregó a cada tubo el volumen de cloruro de bario al 1% indicado en la tabla 7.1.
- Con una bureta de 10.0 mL, se agregó a cada tubo los volúmenes correspondientes de ácido sulfúrico al 1% de acuerdo a la tabla 7.1.
- Con el espectrofotómetro se midieron las absorbancias a 600 nm, de las diferentes mezclas; para ello se puso a cero la absorbancia con agua destilada.
- Se graficaron las lecturas de absorbancia vs. número aproximado de bacterias representado en la tabla 7.1.
- Se llevó a cabo la lectura de la absorbancia del inóculo ajustado a 1.2 de absorbancia a 600 nm, y se interpolaron los resultados en la gráfica obtenida con la escala de McFarland.
- Se reportaron los resultados como número de bacterias $\times 10^6/\text{mL}$.

TRIPIS CON FALLA DE ORIGEN

Tabla 7.1. Escala de McFarland

Clave del tubo	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Número aproximado de bacterias representadas x 10 ⁶ / mL	D.O
1	0.1	9.9	300	0.171
2	0.2	9.8	600	0.293
3	0.3	9.7	900	0.461
4	0.4	9.6	1,200	0.583
5	0.5	9.5	1,500	0.713
6	0.6	9.4	1,800	0.769
7	0.7	9.3	2,100	0.867
8	0.8	9.2	2,400	0.980
9	0.9	9.1	2,700	1.344
10	1.0	9.0	3,000	1.417

7.2.3. Método por frotis

- En un portaobjetos limpio y desengrasado se marcaron 2 áreas de 2 cm², invirtiendo el portaobjetos se colocó la muestra ajustada a 1.4 de absorbancia con un asa calibrada, por duplicado.
- Se secó al aire y se fijó a la flama del mechero para teñirla con la tinción de Gram.
- Con el objetivo micrométrico se midió el diámetro del campo microscópico, recordando que cada división del objetivo micrométrico, mide 10 μm (0.01 mm ó 0.001 cm).
- Se determinó la superficie del campo microscópico, aplicando la siguiente fórmula:

$$r^2 \text{ en cm} \times 3.1416 = \text{superficie del campo del microscopio en cm}$$

- Se determinó el número de campos microscópicos que existen en la preparación con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Superficie de la preparación}}{\text{Superficie del campo microscópico}} = \text{Número de campos microscópicos}$$

- Se colocó en la platina del microscopio la preparación teñida, y se contó el número de microorganismos en 10 campos seleccionando campos continuos en forma de Z, obteniendo el valor medio de microorganismos por campo microscópico.
- Se calculó el número de microorganismos que hay en la preparación (0.01 mL) y en 1.0 mL del cultivo, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de Microorganismos por campo} \times \text{Número de campos microscópicos} = \text{Número de microorganismos en la preparación} \times 100 \text{ Número de M.O por mL de muestra}$$

- Se reportó como número de microorganismos/ mL de muestra.

7.2.4. Método por cuenta en placa

- Se realizaron a partir de la muestra ajustada, diluciones asépticas de 10^{-1} a 10^{-4} .
- De las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se tomó 1 mL de cada una y se colocó en el centro de la caja de Petri estéril marcada con la dilución correspondiente.
- En condiciones de asepsia, se adicionó a cada una de las cajas inoculadas, 15 a 20 mL de medio mFc (medio para coliformes fecales) derretido y mantenido a una temperatura de 45°C en baño María.
- Se homogeneizó completamente el medio con la muestra con movimientos rotatorios hacia un lado y hacia otro, adelante y hacia atrás, lateralmente izquierda y derecha.
- Se dejó solidificar el medio, se invirtieron las cajas y se incubaron a 44.5 °C durante 24 horas.
- Después de la incubación, se seleccionaron las cajas que mostraron entre 30 y 300 colonias.
- Se realizó la cuantificación mediante una cámara cuenta colonias eligiendo las colonias de color azul.
- Se calculó la cantidad de microorganismos por mL, multiplicando el promedio de las colonias contadas por el recíproco de la dilución, expresando el resultado como unidades formadoras de colonias/ mL (UFC/ mL).

7.2.5. Método por número más probable (NMP)

- Se realizaron a partir de la muestra ajustada diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} en condiciones de asepsia.
- Para las diluciones de la 10^{-3} a la 10^{-7} se emplearon 5 tubos con caldo lauril-triptosa con indicador púrpura de bromocresol.
- Se inocularon cada uno de los tubos con 1 mL de la respectiva dilución.
- Se incubaron los tubos a 37°C durante 48 horas.
- Se realizó la lectura de los tubos positivos (con vire color amarillo y producción de gas), determinando el número característico, para ello se seleccionó la dilución más baja en la que todos o el mayor número de los tubos resultaron positivos y posteriormente el número de tubos positivos en las dos siguientes diluciones.
- El número característico se localizó en las tablas reportadas en el APHA (1998) y se determinó el número más probable.
- El NMP obtenido se multiplicó por el recíproco de la dilución intermedia de las tres consideradas y se reportó como NMP de microorganismos/mL de muestra.

7.2.6. Método por filtro de membrana

- En condiciones de asepsia se realizaron a partir de la muestra ajustada diluciones de 10^1 a 10^{-5} .
- Se tomó 1 mL de la dilución 10^{-3} y se vertió en el filtro con la membrana de 0.45 μm colocada previamente con una pinza flameada.
- Se agregó agua peptonada estéril hasta la marca de 100, y se aplicó el vacío para filtrar la muestra.

- Se retiró la membrana bajo las mismas condiciones asépticas anteriores y se colocó en una placa de agar Endo.
- Lo anterior se realizó con cada una de las diluciones, realizando enjuagues con agua peptonada estéril entre cada dilución.
- Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas.
- Se realizó la lectura de las placas que tuvieran entre 20 y 200 colonias seleccionando las colonias rojas o rosas con brillo metálico.
- Se calculó el número de bacterias multiplicando la cantidad de colonias contadas por él recíproco de la dilución, expresándolo como UFC/mL.

7.3. PRUEBAS COMPARATIVAS DE LA EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN DE *Escherichia coli* DE LA PLATA COLOIDAL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO

Se siguió el mismo procedimiento simultáneamente para la plata coloidal, hipoclorito de sodio y un testigo realizándose cada prueba por duplicado.

7.3.1. Preparación del inóculo

- Para la preparación del inóculo empleado, se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual primero se activó en 100 mL de caldo nutritivo de 18 a 24 horas en una incubadora con agitación orbital a 250 rpm y 37°C.
- Transcurrido el tiempo, se realizó la medición de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Ultrospec, ajustando el inóculo a 1.4 con caldo nutritivo estéril (Miranda, 2002).
- Posteriormente se transfirió 1 mL del inóculo ajustado a un frasco de dilución con 99 mL de agua peptonada estéril, para obtener una dilución decimal 10^{-2} , de la cual se tomó 1 mL y se depositó en 100 mL de agua residual parcialmente tratada previamente esterilizada, incubándose durante 24 horas bajo las mismas condiciones ya mencionadas, para la adaptación de la cepa.
- Antes de incubar el matraz de agua residual inoculado se realizó la cuantificación de bacterias mediante la técnica de cuenta en placa, tomando las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

7.3.2. Evaluación de la eficiencia variando la concentración del desinfectante

- Del inóculo obtenido se tomaron 8 mL, y se vertieron a un matraz de 1000 mL conteniendo 692 mL de agua residual estéril realizando una cuenta inicial mediante la técnica de cuenta en placa.
- De este matraz se transfirieron a 8 matraces, volúmenes de 100 mL para el testigo y 99.95, 99.90, 99.84, 99, 98.5, 97 y 94 mL a cada matraz de prueba.
- Previamente se prepararon 2 soluciones estándar tanto de hipoclorito de sodio como de plata coloidal con concentraciones de 50 y 300 mg/L.
- De la solución estándar de 50 mg/L se adicionaron 0.1, 0.2 y 1.0 mL a los primeros 3 matraces de prueba de cada desinfectante para tener una concentración final de 0.05, 0.1 y 0.5 mg/L respectivamente.

- De la solución estándar de 300 mg/L se adicionaron volúmenes de 1.0, 1.5, 3.0 y 6 mL para los matraces restantes de cada desinfectante, para que las concentraciones finales de desinfectante fueran de 3, 6, 12, y 24 mg/L respectivamente.
- Se realizó la cuenta de bacterias sobrevivientes al tiempo 0 y al tiempo 30 mediante la técnica de cuenta en placa, elegida en la primera etapa del trabajo utilizando el medio mFc (medio para coliformes fecales) de acuerdo con los métodos normalizados americanos (APHA, 1998).
- Como solución neutralizante se utilizó para ambos desinfectantes Tween 80 con lecitina de soya solamente en las diluciones 10^{-1} .
- Se realizó la gráfica de logaritmo de bacterias sobrevivientes vs. concentración de desinfectante, y se determinó la concentración mínima a la cual se llevó a cabo el 100% de desinfección para ambos desinfectantes.
- El agua residual utilizada, se obtuvo del efluente del sistema de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, UNAM, México DF., sometiéndose a esterilización en autoclave, durante 20 minutos y a 1.5 atmósferas de presión.
- Las concentraciones de plata coloidal de las soluciones estándar se cuantificaron mediante el método de espectroscopia de absorción atómica (APHA, 1998).
- Las concentraciones de hipoclorito de sodio de las soluciones estándar se cuantificaron mediante el método de titulación argentométrica (APHA, 1998).

7.3.3. Evaluación de la eficiencia variando el tiempo de contacto y la concentración de *Escherichia coli*

- Del inóculo obtenido en agua residual conteniendo *E. coli*, se realizó una cuenta inicial mediante la técnica de cuenta en placa.
- Posteriormente en tres matraces de 250 mL se colocaron volúmenes de 100 mL para el testigo y 99 mL para los dos matraces de prueba del inóculo obtenido.
- En un matraz se adicionó 1.0 mL de una solución que contiene 50 mg/L de hipoclorito de sodio, en otro se adicionaron 1.0 mL de una solución que contiene 50 mg/L de plata coloidal para que al final la concentración fuera de 0.5 mg/L de desinfectante.
- A cuatro tiempos de contacto (0, 15, 30 y 45 minutos), se cuantificaron el número de bacterias sobrevivientes mediante la técnica ya mencionada.
- El mismo procedimiento se realizó con 3 diferentes concentraciones de *E. coli* 10^2 , 10^4 y 10^6 UFC/mL.
- Se utilizó la misma solución neutralizante mencionada en la prueba anterior.
- Al final se realizaron las gráficas de logaritmo bacterias sobrevivientes vs. tiempo de contacto con cada una de las concentraciones de *E. coli*.

7.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDADORA DEL *Paramecium caudatum* SOBRE POBLACIONES DE *Escherichia coli*

- A 4 cajas de Petri estériles marcadas con 10^{-3} y 10^{-4} por duplicado, se les colocó un *Paramecium caudatum* (que equivale a 0.5 mg/L peso húmedo), el cual fue cultivado en un medio de infusión de lechuga a temperatura ambiente (25°C) (Galtsoff, 1989), antes de colocarlos en las cajas petri se les realizó 3 lavados con agua peptonada estéril para eliminar los restos de materia orgánica y bacterias.
- Posteriormente se les adicionó 1 mL del inóculo de agua residual con *E. coli* a cada caja en el lugar donde se colocó el *Paramecium* procurando no extender el inóculo.
- Se dejó transcurrir un tiempo de contacto de 15 minutos, y se virió medio mFc (medio de coliformes fecales) para realizar la cuenta en placa.
- Este mismo procedimiento se realizó para los tiempos de contacto 30 y 45 minutos.
- El testigo se realizó tomando de las mismas diluciones al inicio y al final de la prueba.
- Por último se realizaron las gráficas correspondientes de logaritmo de bacterias sobrevivientes vs. tiempo de contacto.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPARATIVAS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CUENTA DE BACTERIAS

Los resultados obtenidos experimentalmente se presentan en la tabla 8.1, donde se muestran las absorbancias obtenidas de las tres pruebas realizadas y su equivalencia en concentración de bacterias por mL de muestra, obtenidas con base en la curva estándar realizada con la escala de McFarland de acuerdo a la tabla 7.1. Los valores obtenidos mediante el método de absorbancia no presentan desviación estándar debido a que fue realizada una sola medición por ensayo.

Se muestran también los resultados de las concentraciones promedio de bacterias de cada uno de los métodos de cuenta, presentándose en orden decreciente de la siguiente manera: Absorbancia (A) > Frotis (F) > Cuenta en Placa (CP) > Filtro de Membrana (FM) > Número Más Probable (NMP).

De la misma manera se obtuvieron las desviaciones estándar para cada ensayo observándose la mayor desviación estándar en F seguida por NMP y FM siendo menor en CP.

Tabla 8.1. Resultado obtenidos de la aplicación de las diferentes técnicas de cuenta de bacterias en muestras de agua

Prueba de cuantificación Número de prueba	Absorbancia (bacterias/mL)	Muestras	Cuenta en placa (UFC/mL)	Filtro de membrana (UFC/mL)	NMP (bacterias/mL)	Frotis (bacterias/mL)
1	Abs.= 1.204 2648000 × 10 ³	*P1M1	940 × 10 ³	320 × 10 ³	350 × 10 ³	36480 × 10 ³
		*P1M2	950 × 10 ³	300 × 10 ³	240 × 10 ³	47530 × 10 ³
		X	945 × 10 ³	310 × 10 ³	295 × 10 ³	42005 × 10 ³
		σ	6.36	14.14	77.78	7813
2	Abs.= 1.209 2659000 × 10 ³	*P2M1	157 × 10 ³	110 × 10 ³	330 × 10 ³	45480 × 10 ³
		*P2M2	161 × 10 ³	130 × 10 ³	790 × 10 ³	0650 × 10 ³
		X	159 × 10 ³	120 × 10 ³	560 × 10 ³	53065 × 10 ³
		σ	2.8	14.14	325	10726
3	Abs.= 1.220 2659000 × 10 ³	*P3M1	87 × 10 ³	140 × 10 ³	700 × 10 ³	69520 × 10 ³
		*P3M2	80 × 10 ³	170 × 10 ³	490 × 10 ³	64800 × 10 ³
		X	83.5 × 10 ³	155 × 10 ³	595 × 10 ³	67160 × 10 ³
		σ	4.9	21.21	145	3337

*P_xM_x = Indica el número de prueba y el número de muestra

Los resultados para las pruebas comparativas de las técnicas de cuenta de bacterias (tabla 8.1) muestran una mayor concentración de bacterias en las técnicas de absorbancia y frotis, debido a que estas dos técnicas son directas y establecen la población total de bacterias, siendo imposible diferenciar a las bacterias vivas de las muertas, aunque tienen la ventaja de obtener resultados rápidamente, pero para los fines que requiere el estudio comparativo del poder germicida entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio en donde se requiere saber el número de bacterias sobrevivientes estas técnicas no son útiles.

A diferencia de las técnicas anteriores, la cuenta en placa, filtro de membrana y número más probable presentan una concentración mucho menor, ya que estas técnicas indirectas sólo cuantifican bacterias viables. Estas técnicas producen datos de fácil identificación tales como: la formación de colonias en placas de agar (CP y FM) o la producción de turbiedad, gas o cambios en el pH de los cultivos líquidos (NMP). Sin embargo la desventaja que tienen estas técnicas es el tiempo requerido para la incubación de los medios de cultivo y la aparición de colonias bacterianas cuantificables.

De los métodos indirectos el NMP presentó la mayor desviación estándar, ya que ésta es una técnica estadística que se fundamenta en la teoría de la probabilidad. Los inconvenientes que presenta esta técnica son que requiere de mayor cantidad de material a preparar, mayor tiempo para la obtención de resultados, 48 horas en comparación con las 24 horas requeridas para CP y FM, además de presentar errores estadísticos dando como resultado una menor exactitud y precisión del total de bacterias presentes en la muestra. Esta técnica se sugiere sólo cuando las muestras a analizar son muy turbias o cuando se desee conocer de manera aproximada la cantidad de bacterias presentes en una muestra.

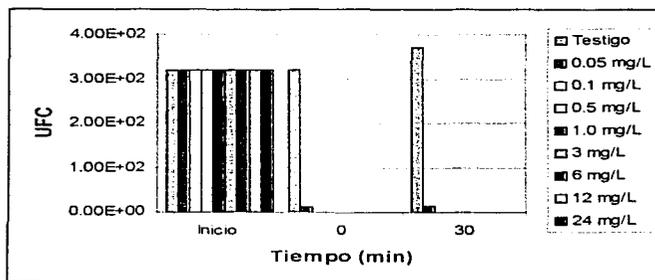
De las técnicas FM y CP, esta última presenta la menor desviación estándar, y aunque para las dos técnicas el tiempo requerido para la preparación de los medios, inoculación y lectura de los cultivos es reducido, las desventajas que presenta FM con respecto a CP, es que requiere de mayor material y equipo, oficialmente no se utiliza para ser empleada en la evaluación de aguas residuales debido a que se necesitan altas diluciones de la muestra, por lo que generalmente se utiliza para agua potable, además de que no es recomendable cuando la muestra presenta bacterias "estresadas" o bajo tensión como los procedentes de efluentes clorados, aguas salinas y en aguas contaminadas con metales pesados o residuos tóxicos ya que se obtienen falsos negativos (Armendáriz *et al.*, 1998), por lo que no sería útil en las pruebas comparativas del poder germicida con hipoclorito de sodio y plata coloidal. Finalmente puede decirse que la cuenta en placa resulta, para la realización del presente estudio, la más adecuada para cuantificar de manera más certera y sencilla la concentración de *E. coli* en muestras de agua (Dávila y Luna-Pabello, 1997).

8.2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPARATIVAS DE LA EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN DE *Escherichia coli*, ENTRE LA PLATA COLOIDAL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO

En la gráfica 8.1 puede observarse una drástica reducción del número de bacterias inmediatamente después de entrar en contacto con la plata coloidal, pero sólo a partir de concentraciones de 0.5 mg/L en adelante, la eliminación de *E. coli* es total en ambos tiempos de contacto para una concentración de *E. coli* de 3.3×10^2 UFC/mL. En el caso de la gráfica 8.2 con hipoclorito de sodio el efecto desinfectante es menor para concentraciones equivalentes a las de plata coloidal, lográndose únicamente la eliminación total de *E. coli* a concentraciones de 1 mg/L en adelante, para una concentración de *E. coli* de 3.3×10^2 UFC/mL.

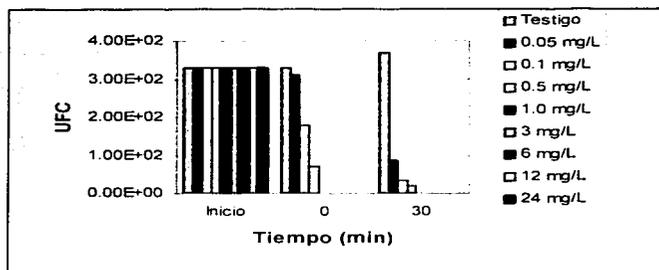
Cabe mencionar que las pruebas de desinfección se realizaron primero utilizando diferentes concentraciones de desinfectante para establecer la concentración mínima necesaria para la eliminación total de las bacterias, la cual fue de 0.1 mg/L para la plata coloidal y de 1.0 mg/L para hipoclorito de sodio, 10 veces más que para la plata. Con base en esto se tomó la concentración de 0.5 mg/L, que es la que se encuentra en un punto medio entre estas dos concentraciones, para realizar las siguientes pruebas a diferentes tiempos de contacto y con diferentes concentraciones de *E. coli*.

En la tabla 8.2 se muestra la eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y la plata coloidal obtenida con base en el número de bacterias eliminadas por cada mg de desinfectante para cada una de las concentraciones de desinfectante a un tiempo de contacto de 30 minutos, en donde se observa que la plata coloidal presenta una eficiencia 8 veces mayor que el hipoclorito de sodio para la concentración más baja de desinfectante (0.05 mg/L), mientras que para la concentración de 0.1 mg/L es de 1.2 veces más eficiente.



TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 8.1 Eficiencia de desinfección de la plata coloidal con diferentes concentraciones de desinfectante a tiempos de contacto de 0 y 30 minutos.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Gráfica 8.2. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio con diferentes Concentraciones de desinfectante a tiempos de contacto de 0 y 30 minutos.

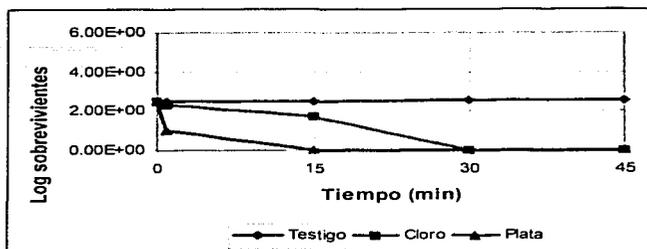
Tabla 8.2. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y la plata coloidal con diferentes concentraciones de desinfectante y un tiempo de contacto de 30 minutos

Concentración de desinfectante (mg/L)	Eficiencia del hipoclorito de sodio (UFC/mg)	Eficiencia de la plata coloidal (UFC/mg)
0.05	800	6340
0.1	2970	*3300
0.5	620	*660
1.0	*330	*330
3.0	*110	*110
6.0	*55	*55
12	*27.5	*27.5
24	*13.75	*13.75

* Indica la eliminación total de la *Escherichia coli*.

En la gráfica 8.3, se puede apreciar que a una concentración de 0.5 mg/L de plata coloidal el tiempo requerido para la desinfección total es casi inmediato, mientras que para el hipoclorito de sodio es de 30 minutos, 15 minutos más que la plata coloidal.

En la tabla 8.3, se aprecia que la eficiencia de eliminación de la plata coloidal para el tiempo 0 es 2 veces mayor que para el hipoclorito con la concentración más baja de *E. coli*, mientras que para el tiempo de 15 minutos es de 1.2 veces más eficiente, alcanzando la plata coloidal la total eliminación en este tiempo y el hipoclorito de sodio al tiempo 30.



Gráfica 8.3. Comparación de la eficiencia de desinfección de *E. coli*, entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 3.3×10^2 UFC/mL de *E. coli*

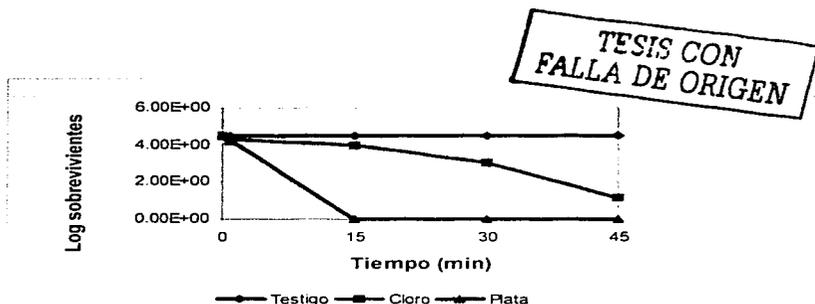
Tabla 8.3. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 3.3×10^2 UFC/mL de *E. coli*

Tiempo de contacto (min.)	Eficiencia del Hipoclorito de sodio (UFC/mg)	Eficiencia de la plata coloidal (UFC/mg)
0	2.8×10^2	6.4×10^2
15	5.6×10^2	* 6.6×10^2
30	* 6.6×10^2	* 6.6×10^2
45	* 6.6×10^2	* 6.6×10^2

* Indica la total eliminación de *Escherichia coli*.

En la gráfica 8.4, se puede apreciar que para la eliminación de una concentración de 2.87×10^4 UFC/mL de *E. coli* que es dos logaritmos más que la primera concentración, el tiempo requerido para la desinfección total con una concentración de 0.5 mg/L de plata coloidal es de 15 minutos, mientras que para el hipoclorito de sodio es después de los 45 minutos.

En la tabla 8.4, se observa que la eficiencia de eliminación de *E. coli* para la plata coloidal es 1.6 veces mayor que para el hipoclorito de sodio al tiempo 0 y de 1.4 veces más eficiente, para el tiempo 15, alcanzando la plata coloidal la eliminación total de *E. coli* a este tiempo, mientras que el hipoclorito de sodio aunque se observa una disminución considerable de la cantidad de bacterias no logra alcanzar la total eliminación en los tiempos establecidos.



Gráfica 8.4. Comparación de la eficiencia de desinfección de *E. coli* entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 2.87×10^4 UFC/mL de *E. coli*

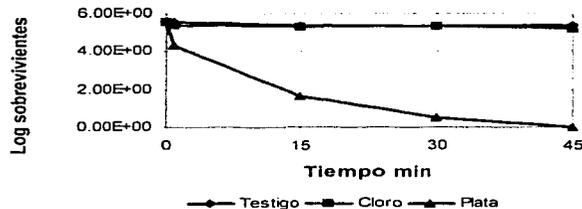
Tabla 8.4. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 2.87×10^4 UFC/mL de *E. coli*

Tiempo de contacto (min.)	Eficiencia del Hipoclorito de sodio (UFC/mg)	Eficiencia de la plata coloidal (UFC/mg)
0	1.54×10^4	2.50×10^4
15	3.86×10^4	* 5.74×10^4
30	5.53×10^4	* 5.74×10^4
45	5.73×10^4	* 5.74×10^4

* Indica la total eliminación de *Escherichia coli*.

En la gráfica 8.5, se observa que al incrementar la concentración de *E. coli* a 3.5×10^5 UFC/mL en la muestra de agua a desinfectar, la plata coloidal logra la total desinfección hasta los 45 minutos de contacto (15 minutos más que el tiempo requerido para las dos primeras concentraciones evaluadas), mientras que el hipoclorito de sodio después de 45 minutos de contacto, presenta un efecto desinfectante casi nulo.

En la tabla 8.5, podemos ver que la eficiencia de eliminación de la plata coloidal es 3 veces mayor que la del hipoclorito de sodio, encontrando una eficiencia casi nula para éste.



Gráfica 8.5. Comparación de la eficiencia de desinfección de *E. coli* entre la plata coloidal y el hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto con 0.5 mg/L de desinfectante y concentración 3.5×10^5 UFC/mL de *E. coli*

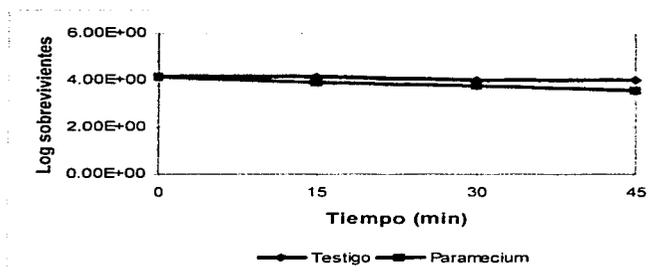
Tabla 8.5. Eficiencia de desinfección del hipoclorito de sodio y plata coloidal con concentración 3.5×10^5 UFC/mL de *E. coli*

Tiempo de contacto (min.)	Eficiencia del Hipoclorito de sodio (UFC/mg)	Eficiencia de la plata coloidal (UFC/mg)
0	2.14×10^5	6.56×10^5
15	2.54×10^5	6.99×10^5
30	2.78×10^5	$*7.0 \times 10^5$
45	3.72×10^5	$*7.0 \times 10^5$

* Indica la total eliminación de *Escherichia coli*.

8.3. RESULTADOS DE LA CAPACIDAD PREDADORA DEL *Paramecium caudatum* SOBRE POBLACIONES DE *Escherichia coli*.

En las gráficas 8.6, se observa sólo una pequeña disminución en la población de *Escherichia coli*, transcurrido el tiempo máximo de contacto que es de 45 minutos, lo mismo que se observa en la tabla 8.6 sobre la eficiencia de eliminación donde se presenta una eficiencia 3 veces menor que el hipoclorito de sodio y 5 veces menor a la que presenta la plata coloidal con la misma concentración de *E. coli* y de desinfectante (0.5 mg/L de *Paramecium* calculado en peso húmedo).



Gráfica 8.6. Capacidad predatora del *Paramecium caudatum* sobre poblaciones de *E. coli* con diferentes tiempos de contacto

Tabla 8.6. Eficiencia de desinfección del *Paramecium caudatum* con concentración de 2.03×10^4 UFC/mL

Tiempo de contacto (min.)	Eficiencia de desinfección del <i>Paramecium caudatum</i> (UFC/mg)
0	0
15	1.22×10^4
30	1.78×10^4
45	2.22×10^4

Con respecto a las pruebas realizadas con diferentes concentraciones de desinfectante (plata coloidal e hipoclorito de sodio), la eficiencia de eliminación de la plata coloidal resultó hasta 8 veces mayor que la del hipoclorito de sodio para una concentración de 0.05 mg/L alcanzando la plata coloidal la eliminación total de *E. coli* con 0.1 mg/L a un tiempo de 30 minutos de contacto, y el hipoclorito de sodio hasta 1.0 mg/L con el mismo tiempo de contacto, por lo que se necesita 10 veces más concentración de hipoclorito de sodio para eliminar la misma concentración de *E. coli* al mismo tiempo de contacto.

Para las pruebas con diferentes concentraciones de *E. coli* y diferentes tiempos de contacto la plata presentó una eficiencia de 1.2, 1.6 y 3 veces mayor respectivamente con las diferentes concentraciones de *E. coli*, con respecto al hipoclorito de sodio. Esto puede explicarse debido a que el hipoclorito de sodio al reaccionar con el agua forma el ácido hipocloroso (HClO) e ión hipoclorito (ClO^-) a los que se denomina como el cloro libre disponible. Debido a que la deficiencia de electrones de estas dos formas los hace agentes muy activos y por lo tanto muy buenos oxidantes de la materia orgánica como el amoníaco que da lugar a la formación de las cloraminas y diferentes compuestos libres de cloro conteniendo nitrógeno, además de reaccionar con compuestos como los ácidos húmicos y

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

conteniendo nitrógeno, además de reaccionar con compuestos como los ácidos húmicos y fúlvicos que dan origen a compuestos halogenados como los trihalometanos y los haloácidos que tienen un efecto dañino para los seres vivos. El cloro también puede reaccionar con compuestos inorgánicos reducidos, por ejemplo, Mn(II), Fe(II), NO₂⁻, S(II) oxidándolos transformando el HOCl en Cl⁻ y agua. Por consiguiente, no todo el cloro que se agrega al agua da por resultado la producción de cloro libre disponible. La cantidad de cloro que reacciona con todas las impurezas que contiene el agua residual se le conoce como demanda de cloro (D.S.E.N.Y., 1996 y Schulz y Okun, 1998), y es necesario satisfacerla para obtener el efecto desinfectante que se desea, en este caso al ir adicionando cantidades cada vez mayores de *E. coli* que sumada a la materia orgánica e inorgánica contenida en el agua residual de prueba, la cantidad de cloro libre disponible se fue agotando considerablemente disminuyendo así su eficiencia, como se observa en las gráficas 5.3 y 5.4 hasta llegar aun punto en que la demanda de cloro fue superior consumiendo por completo el cloro libre disponible, sin dejar un remanente de cloro activo libre para llevar a cabo la eliminación de la *E. coli*, como se observa en la gráfica 5.5.

En el caso de la plata coloidal esto no sucede debido a que la plata no reacciona con todos los compuestos que están presentes en el agua residual, ésta reacciona principalmente con los compuestos que contienen azufre, entre ellos los puentes disulfuro (-S-S-) que contienen las proteínas, formando proteinatos, quedando por consiguiente una mayor concentración de plata remanente para llevar a cabo la desinfección. En el caso de la adición de las diferentes concentraciones de desinfectante se puede confirmar este fenómeno, ya que al ir adicionando mayores concentraciones de desinfectante la cantidad remanente es mayor para la eliminación de la *E. coli* llevándose a cabo la desinfección en menor tiempo.

Con respecto a las pruebas realizadas con *Paramecium caudatum*, éste presentó una menor eficiencia de eliminación de *E. coli* en comparación de la plata coloidal y el hipoclorito de sodio, pero debe tomarse en cuenta que la cantidad utilizada de *Paramecium* fue de 0.5 mg/L equivalente a la utilizada para cloro y plata y que es aproximadamente un *Paramecium*. Un *Paramecium* teóricamente consume aproximadamente 5000 bacterias por día según Broward, es por esto que la eficiencia resulte tan baja para los tiempos utilizados en la prueba, pero calculando el número de bacterias eliminadas experimentalmente por cada minuto se obtuvo un consumo promedio de un solo *Paramecium* de 5.8×10^5 bacterias por día, resultando 117 veces más a lo reportado por la literatura. La ventaja que tiene el *Paramecium* con respecto a los desinfectantes químicos es que éste aumenta su concentración, en cuanto hay más alimento (materia orgánica y bacterias) y conforme pasa el tiempo, pero ésta disminuye cuando el alimento se agota, otra ventaja es que no se corre el riesgo de que se formen subproductos que resulten dañinos para la salud, como sucede con el cloro. La desventaja que tiene con respecto a los desinfectantes químicos es que se necesitan concentraciones mucho mayores y tiempos de contacto más prolongados, para tener una eficiencia equivalente ya que comparando las eficiencias de desinfección del hipoclorito de sodio y la plata coloidal con respecto a la del *Paramecium* se necesitaría 5 veces más concentración de *Paramecium* para igualar la eficiencia de la plata coloidal para el mismo tiempo de contacto y 3 veces más para igualar al hipoclorito de sodio bajo las mismas circunstancias., además de que no se garantiza la eliminación total de bacterias y materia orgánica por lo que no puede utilizarse para el consumo humano, pero si puede utilizarse en el tratamiento de aguas residuales domésticas para el riego agrícola, en lugar de utilizar el agua residual sin ningún tratamiento, que hace mayor el problema de propagación de enfermedades gastrointestinales por los agentes patógenos transportados en ella.

En cuanto a la plata coloidal, ésta presenta mayores ventajas con respecto al hipoclorito de sodio y el *Paramecium caudatum* ya que no forma subproductos cancerígenos y mutagénicos como el hipoclorito y sólo se necesitan concentraciones muy pequeñas para la eliminación de grandes concentraciones de bacterias, con tiempos de contacto muy cortos, lo que hace más rápido el proceso de desinfección. Esto es muy importante debido a que el agua tratada con plata, para que pueda ser utilizada para el consumo humano debe estar en una concentración igual o menor a 0.05 mg/L según los límites establecidos por la USEPA y otros organismos internacionales. A esta concentración le tomaría al humano 27 años de ingestión para acumular la dosis tóxica de 1 gramo de plata, asumiendo que no hay eliminación y que el consumo de agua es de 2 litros por día. En la práctica, la eliminación es del 90% de la dosis de ingesta así que tomaría varias vidas para poder acumular una dosis tóxica (Warrington, 1996).

Estadísticamente, las pruebas comparativas de la eficiencia de desinfección con hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum*, con respecto a la eliminación de *E. coli* en muestras de agua cumple con los requisitos siguientes: a) independencia de los datos, b) poblaciones con distribución normal y c) varianzas de las poblaciones iguales (Anexo D). Asimismo, para determinar las diferencias significativas entre cada media de uno o más tratamientos con un testigo o *control* específico, se utilizó la prueba de la diferencia significativa mínima (DSM). Existe diferencia significativa entre las medias de los tres desinfectantes y el testigo, en cuanto a la eliminación de *E. coli* en muestras de agua, siendo la de mayor diferencia la plata coloidal, seguida del hipoclorito de sodio y por último el *Paramecium caudatum* (20820.00, 17775.20 y 15400.00 respectivamente), confirmando que la plata coloidal es la que tiene la mayor eficiencia de eliminación de *E. coli* en muestras de agua.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. CONCLUSIONES

- De acuerdo con el estudio comparativo de las diferentes técnicas de cuenta de microorganismos, el procedimiento de cuenta en placa resultó, para la realización del presente estudio, el más adecuado para cuantificar de manera más certera y sencilla la concentración de *Escherichia coli* en las muestras de agua estudiadas.
- Se comparó la eficiencia de desinfección de la plata coloidal y del hipoclorito de sodio para la desinfección de agua residual pretratada biológicamente estéril y posteriormente inoculada con diferentes concentraciones de *E. coli*, a diferentes tiempos de contacto y concentración del agente desinfectante, resultando la plata coloidal hasta 8 veces más eficiente que el hipoclorito de sodio.
- Se cuantificó la capacidad predadora del *Paramecium caudatum* sobre poblaciones de *E. coli* en suspensión, presentando una eficiencia 3 veces menor que el hipoclorito de sodio y 5 veces menor que la plata coloidal.
- Por lo anterior se puede afirmar que iguales concentraciones de plata coloidal, hipoclorito de sodio y *Paramecium caudatum* no eliminan la misma concentración de *Escherichia coli* en suspensión.

9.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas con el *Paramecium caudatum* utilizando tiempos de contacto más prolongados, para evaluar la eficiencia del *P. caudatum* a largo plazo.
- Es conveniente también hacer una evaluación aumentando la concentración de *P. caudatum*, para establecer cual es la cantidad que se necesita para que la eficiencia sea equivalente a la de la plata coloidal, bajo las mismas condiciones de tiempo de contacto y de concentración de *Escherichia coli*.
- De igual forma se recomendaría continuar este estudio variando la concentración de *Escherichia coli*, para observar el efecto que ocasionaría sobre *Paramecium caudatum* su presencia en altas concentraciones.
- El agua residual desinfectada, mediante la utilización de compuestos de plata y *Paramecium caudatum*, podría ser utilizada principalmente para riego agrícola, no obstante deberán realizarse estudios complementarios asociados con el cumplimiento de lo establecido en la NOM-003-ECOL 1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.

ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS Y REACTIVOS

Medio MFC (medio para coliformes fecales):

- ◆ Digerido pancreático de caseína.....6.0 g
- ◆ Peptona de proteosa No. 3.....9.0 g
- ◆ Extracto de levadura.....3.0 g
- ◆ Lactosa.....2.5 g
- ◆ Sales biliares No. 3.....1.50 g
- ◆ Cloruro de sodio5.0 g
- ◆ Agar.....15.0 g
- ◆ Azul de anilina.....0.1 g

Se suspende 5.2 g de polvo en 1 L de agua purificada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente, se hierve durante un minuto para disolver completamente el polvo. Se agregan 10 mL de una solución al 1% de ácido Rosólico en 0.2 N de NaOH, se sigue calentando durante 1 minuto. No se utiliza autoclave, y de ser necesario se ajusta el pH a 7.4 con 1N de HCl.

Caldo nutritivo:

- ◆ Extracto de carne.....3.0 g.
- ◆ Peptona de carne.....5.0 g.
- ◆ Agua destilada.....1000 mL
- ◆ PH.....7.0 ± 0.2

Se pesan las cantidades adecuadas y se disuelven, el medio queda ligeramente amarillo. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb. de presión, durante 20 minutos.

Agar nutritivo o gelosa:

Caldo nutritivo adicionado de 15 a 20 g de agar/litro. Se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb. de presión, durante 20 minutos.

Caldo Lauril-triptosa:

- ◆ Triptosa20 g
- ◆ Lactosa.....5.0 g
- ◆ Fosfato hidrógeno dipotásico K_2HPO_42.75 g
- ◆ Fosfato dihidrógeno de potasio KH_2PO_42.75 g
- ◆ Cloruro de sodio.....5.0 g
- ◆ Laurilsulfato de sodio.....1.0 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL
- ◆ Púrpura de bromocresol.....0.01 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se disuelven los componentes, se ajusta a un pH de 7.2, se distribuye en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y se esteriliza en autoclave a 115°C por 20 minutos.

Solución salina isotónica:

- ◆ Cloruro de sodio.....8.5 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL
- ◆ Se esteriliza bajo las mismas condiciones ya mencionadas.

Agua peptonada al 1%:

Se disuelve a temperatura ambiente y se esteriliza en autoclave a 115°C, 15 lb. de presión, durante 20 minutos.

Agar Endo:

- ◆ Triptosa.....10.0 g
- ◆ Peptona de carne.....5.0 g
- ◆ Peptona de caseína.....5.0 g
- ◆ Extracto de levadura.....1.5 g
- ◆ Cloruro de sodio.....5.0 g
- ◆ Fosfato de potasio monobásico.....1.375 g
- ◆ Lactosa.....12.5 g
- ◆ Desoxicolato de sodio.....0.1 g
- ◆ Laurilsulfato de sodio.....0.05 g
- ◆ Fucsina básica.....1.05 g
- ◆ Sulfito de sodio.....2.1 g
- ◆ Agar.....15.0 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Se disuelve el medio y se hierve hasta disolución completa. Se esteriliza en autoclave a 121°C a 15 lb. de presión, durante 20 minutos. Se enfría el medio a 45 °C y se vierte en cada una de las cajas de Petri de (10 x 50), éstas se utilizan inmediatamente o se envuelven y se guardan en refrigeración (duran en buenas condiciones aproximadamente 1 semana).

Ácido sulfúrico al 1%

Cloruro de bario al 1%

Azul de Evans (0.75 mg/mL)

- ◆ Azul de Evans.....0.075 g
- ◆ Agua destilada.....100 mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Solución neutralizante

- ◆ Lecitina de sodio.....40 g
- ◆ Polisorbato 80 (Tween).....280 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Se disuelven los componentes, se esteriliza en autoclave a 121°C a 15 lb. de presión, durante 20 minutos.

Tinción de Gram:

Cristal violeta con oxalato de amonio

- ◆ **Solución A**
 - Cristal violeta.....2.0 g
 - Etanol 95%.....20 mL
- ◆ **Solución B**
 - Oxalato de amonio.....0.8 g
 - Agua destilada.....80 mL

Se deja la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o se calienta débilmente hasta que se solubilice. Después, se mezcla con la solución de cristal violeta y se filtra.

Lugol (solución de yodo yodurado)

- ◆ Iodo metálico.....1.0 g
- ◆ Yoduro de potasio.....2.0 g
- ◆ Agua destilada.....300 mL

En un mortero mezclar el I₂ y el KI y molerlo finamente, agregar una pequeña cantidad de agua para lavar el material, aforar y agitar vigorosamente.

Alcohol-acetona

- ◆ Etanol 95%.....800 mL
- ◆ Acetona.....200 mL

Safranina

- ◆ Safranina.....0.25 g
- ◆ Etanol 95%.....10 mL
- ◆ Agua.....100 mL

Se disuelve la safranina en el alcohol, se agrega el agua destilada y se filtra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Procedimiento:

1. Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
2. Se fija el material en el portaobjetos pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción.
3. Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta.
4. Después de 1 minuto de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada.
5. Se cubre el frotis con solución de yodo de Gram durante 1 minuto y se lava nuevamente con agua.
6. Se sostiene el frotis entre el dedo pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona hasta que no se desprenda color violeta.
7. Se lava con agua corriente y se coloca otra vez sobre el soporte. Se cubre la superficie con contratinción de safranina durante 1 minuto. Se lava con agua corriente.
8. Se coloca el frotis en posición vertical dejando que drene el exceso de agua.
9. Se examina el frotis en el microscopio.

ANEXO B. PROPIEDADES DE ALGUNOS DESINFECTANTES PARA EL AGUA

Tabla 1b. Principales propiedades de los principales desinfectantes de agua (Netfirms,2002)

Desinfectante	Descripción	Ventajas	Limitación
<u>Cloro</u>	Usado en un estado gaseoso, requiere medidas de seguridad más estrictas.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxidante eficaz y desinfectante. ▪ Elimina eficazmente sabores y olores. ▪ Provoca efectos secundarios. ▪ Capaz de controlar el crecimiento de algas, limos biológicos y microorganismos. ▪ Descompone contaminantes orgánico (fenoles...). ▪ Oxidante del hierro y magnesio. ▪ Descompone sulfuro de hidrógeno, cianuros, amonio y otros compuestos de nitrógeno. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requisitos estrictos para el transporte y almacenamiento. ▪ Peligro potencial para la salud en caso de pérdidas. ▪ La formación de subproductos de la desinfección, como cloroformo, (la última investigación indica que ese riesgo para salud se exagera por lo menos 2,000 veces).
Cloro – sustancias contenidas			
<u>Hipoclorito</u>	Usado en líquido y las formas granuladas (concentración de comercio - 10-20%), puede obtenerse en el sitio, electroquímicamente.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eficaz contra la mayoría de microorganismos patógenos. ▪ Relativamente seguro durante el almacenamiento y uso. ▪ Cuando se genera en el sitio, no requiere transporte y almacenamiento de químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ineficaces contra quistes (Giardia, Cryptosporidium). ▪ Pierde su actividad durante el almacenamiento a largo plazo. ▪ Peligro potencial de emisión de cloro durante el almacenamiento gaseoso. ▪ Forma trihalometanos. ▪ Cuando se genera en el sitio, requiere uso inmediato o, en caso del almacenamiento, medidas especiales para purificar el agua inicial y evitar los iones de metales pesados. ▪ Cuando se genera en el sitio, la solución de NaClO con la concentración del cloro activa menos de 450 mg/l no forma clorato durante el almacenamiento.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Continuación.....Tabla 1b. Principales propiedades de los principales desinfectantes de agua

Desinfectante	Descripción	Ventajas	Limitación
<p><u>Dióxido de cloro</u></p>	<p>Sólo generación en el sitio. El desinfectante más eficaz y el agente de la oxidación más fuerte entre todos los compuestos del cloro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Opera en dosis bajas. • No forma cloraminas. • No facilita la formación de trihalometanos. • Destruye fenoles y la fuente de sabores y olores, desagradables • Oxidante eficaz y desinfectante para todos los tipos de microorganismos, incluso los quistes, (Giardia, Cryptosporidium) y virus. • No forma bromuros de los bromatos. • Facilita la eliminación del hierro y magnesio del agua por medio de su oxidación rápida y precipitación de óxidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo, generación en el sitio. • Requiere el transporte y almacenamiento de químicos. • Reacciona con las impurezas orgánicas y forma subproductos no orgánicos. • Forma cloratos e iones de clorito.
<p>Cloramina</p>	<p>Formado durante la reacción de amonio con cloro activo. Se usa como un desinfectante de una actividad prolongada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rasgos estables y efectos secundarios a largo tiempo. • Facilita la reducción de sabor extraño y olor. • Reduce el nivel de trihalometanos y la generación de cloro orgánico ácido. • Previene formación de limos biológicos en sistemas de distribución. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es un desinfectante y agente de oxidación débil comparado con el cloro. • No eficaz contra los virus y quistes (Giardia, Cryptosporidium). • Se requieren dosificaciones considerables y tiempo de contacto prolongado para la desinfección. • Peligroso para pacientes que usan diálisis, porque es capaz de penetrar en la membrana del dializador con efecto en el eritrocito. • Forma subproductos que contienen nitrógeno.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Continuación.....Tabla 1b. Principales propiedades de los principales desinfectantes de agua

Substancias alternativas			
Desinfectante	Descripción	Ventajas	Limitación
<u>Ozono</u>	Se ha usado durante varias décadas en algunos países europeos con el propósito de la desinfección, la eliminación de color, para el sabor y mando de olor.	<ul style="list-style-type: none"> • Un fuerte desinfectante y agente de oxidación. Muy eficaz contra Giardia, Cryptosporidium y cualquier otra microflora patógena. • Facilita la reducción de la turbiedad del agua. • Facilita la reducción de sabor extraño y olor. • No forma el cloro que contiene trihalometanos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Forma subproductos, incluyendo: los aldehídos, acetonas, los ácidos orgánicos, contenidos de bromo, trihalometanos, (inclusive bromoformo), bromatos (en presencia de bromuros); los peróxidos, ácido bromo-acético. • Hacen necesario el uso de filtros biológicamente activos para quitar los subproductos. • No asegura el efecto de la desinfección residual. • Requiere gastos iniciales importantes para el equipamiento. • Gastos considerables para operadores, mantenimiento y soporte de la instalación. • Al reaccionar con compuestos orgánicos, el ozono los desintegra en componentes más pequeños que podrían volverse un medio de alimento para los microorganismos favoreciendo el crecimiento en los sistemas de distribución de agua.
<u>Luz Ultravioleta</u>	Exposición del agua a los rayos UV, capaz de matar varios tipos de microorganismos.	<ul style="list-style-type: none"> • No requiera el almacenamiento y transporte de químicos. • No forma subproductos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ningún efecto residual. • No eficaz contra los quistes (Giardia, Cryptosporidium). • Requiere gastos considerables para el equipo y el mantenimiento técnico. • Requiere considerable gastos operacionales (potencia de consumos). • La actividad de la desinfección depende de la turbiedad del agua, su dureza (los sedimentos aparecen en la bombilla), la precipitación de impurezas orgánicas en la bombilla aparece, y provoca desviaciones en el suministro de potencia que afecta a la variación de la longitud de onda.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Continuación.....Tabla 1b. Principales propiedades de los principales desinfectantes de agua

Activación Electroquímica			
Desinfectante	Descripción	Ventajas	Limitación
Anolyte	Activación electroquímica de una solución de salmuera en un electrolizador de membrana.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desinfectante fuerte y agente de la oxidación. ▪ Muy eficaz contra todos los tipos de bacterias y virus. ▪ Muy eficaz como agente fungicida. ▪ Elimina efectivamente tanto los malos olores como los sabores. ▪ Quita biofilms. ▪ Insignificante formación de compuestos del cloro, halógenos y TMT. ▪ Ningún subproducto producido por cloritos (ClO₂) y cloratos (ClO₃). ▪ Según ensayos no se ha detectado ninguna toxicidad aguda o crónica cuando es diluida en el agua. ▪ Bajo costo. ▪ Ningún transporte o problema de almacenamiento. ▪ Almacenamiento fácil y manejo seguro. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitado residual. ▪ Periodo de almacenamiento limitado. ▪ Podría requerirse ventilación en el cuarto de la instalación para quitar humos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO C. CONDENSADO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Calibración de asas:

Curva de calibración:

- ◆ A partir de una solución concentrada de azul de Evans (0.75 mg/mL), se prepararon disoluciones indicadas en la tabla 1c. Para ello con una bureta de 50 mL se colocaron los volúmenes indicados de agua, en una serie de matraces volumétricos. Se agregó a cada uno el volumen correspondiente del colorante con una segunda bureta.
- ◆ Se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a 600 nm.
- ◆ Se graficaron las lecturas obtenidas (gráfica 1c), colocando en la abscisa los valores de concentración y en la ordenada las lecturas de absorbancia.
- ◆ Con base en la gráfica se calculó la concentración de las soluciones problema.

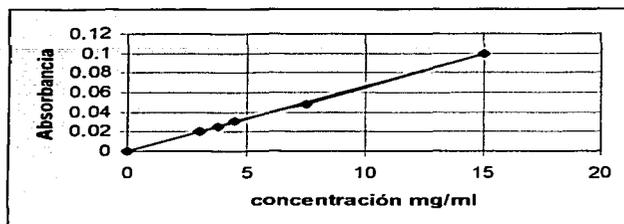
Tabla 1c. Resultados obtenidos para la curva de calibración de asas

Agua destilada mL	Solución de concentrada azul de Evans (0.75 mg/mL).	Dilución	Concentración final (mg/mL).	Absorbancia 600 nm
49.0	1.0	1:50	15.0	0.1
49.5	0.5	1:100	7.5	0.047
49.7	0.3	1:166	4.5	0.034
49.75	0.25	1:200	3.75	0.003
49.8	0.2	1:250	3.0	0.001

Calibración de asas:

- ◆ De la solución concentrada (0.75 mg/mL) del colorante, se tomó una asada y se descargó en un matraz volumétrico de 10 mL, el cual contenía 5 mL de agua destilada aproximadamente. Se enjuagó el asa en agua destilada, se flameo y se enfrió.
- ◆ Se repitió el procedimiento 20 veces más (se descargaron 20 asadas en el matraz volumétrico).
- ◆ Se aforo a 10 mL con agua destilada.
- ◆ Se leyó en el espectrofotómetro y obtener la concentración correspondiente a la lectura en la curva de calibración.
- ◆ Se calculó el volumen de asa con la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen (asa)} = \frac{\text{Concentración [g/mL (asa problema)]} \times \text{Volumen total (10 mL)}}{\text{Número de asadas (20)} \times \text{Concentración del colorante (750 [g/ mL])}}$$



Gráfica 1c. Curva de calibración para asas.

Tabla 2c. Resultados de la calibración de las asas

Concentración del problema (g/mL)	volumen del asa (mL)
1	7.34
2	6.48
Promedio	0.0092

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPARATIVAS DE LA EFICIENCIA DE DESINFECCIÓN ENTRE EL HIPOCLORITO DE SODIO, LA PLATA COLOIDAL Y EL *Paramecium caudatum*

Tabla 3c. Resultados de la eficiencia de desinfección del hipoclorito a diferentes concentraciones, expresado en UFC/mL.

Tiempo (min.)	Testigo	0.05 mg/L	0.1 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	3.0 mg/L	6.0 mg/L	12 mg/L	24 mg/L
Inicio	3.3×10^2	3.30×10^2	3.3×10^2						
0	3.3×10^2	3.1×10^2	1.8×10^2	70	0	0	0	0	0
30	3.7×10^2	2.86×10^2	3.3×10^2	20	0	0	0	0	0

Tabla 4c. Resultados de la eficiencia de desinfección de la plata coloidal a diferentes concentraciones, expresado en UFC/mL.

Tiempo (min.)	Testigo	0.05 mg/L	0.1 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	3.0 mg/L	6.0 mg/L	12 mg/L	24 mg/L
Inicio	3.3×10^2								
0	3.3×10^2	20	1	0	0	0	0	0	0
30	2.7×10^2	13	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 5c. Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 3.3×10^2 de *Escherichia coli*, a diferentes tiempos de contacto.

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata
inicial	3.3×10^2	3.3×10^2	3.3×10^2
0	3.3×10^2	2.01×10^2	10
15	3.3×10^2	50	0
30	3.7×10^2	0	0
45	3.7×10^2	0	0

Tabla 6c. Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 2.87×10^4 de *Escherichia coli*, a diferentes tiempos de contacto.

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata
0	2.87×10^4	2.87×10^4	2.87×10^4
1	2.87×10^4	2.10×10^4	1.62×10^4
15	3.20×10^4	9.40×10^3	0
30	2.90×10^4	1.01×10^3	0
45	3.06×10^4	14	0

Tabla 7c. Resultados de la eficiencia de desinfección entre el hipoclorito de sodio y la plata coloidal con concentración 3.5×10^5 de *Escherichia coli*, a diferentes tiempos de contacto.

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata
0	3.5×10^5	3.5×10^5	3.5×10^5
1	3.5×10^5	2.43×10^5	2.20×10^4
15	2.30×10^5	2.23×10^5	49
30	1.98×10^5	2.11×10^5	0
45	2.40×10^5	1.64×10^5	0

Tabla 8c. Resultados de la eficiencia de desinfección del *Paramecium caudatum* con una concentración de 2.05×10^4 UFC/mL, a diferentes tiempos de contacto.

Tiempo (min.)	Testigo	Paramecium
Inicio	2.05×10^4	2.05×10^4
0	2.05×10^4	2.05×10^4
15	2.05×10^4	1.82×10^4
30	1.90×10^4	9.80×10^3
45	1.90×10^4	9.10×10^3

CÁLCULOS PARA OBTENER LA CONCENTRACIÓN DE *Paramecium caudatum*

Dimensiones del *Paramecium caudatum*: 50 μm ancho x 250 μm largo.

Para obtener el volumen se utilizó la formula: $V = \pi r^2 h$.

$$V = (3.1415) \frac{(50 \mu\text{m})^2}{2} (250 \mu\text{m}) = 490873 \mu\text{m}^3$$

El volumen obtenido se transformo de μm^3 a cm^3 .

$$\begin{array}{l} 1 \text{ cm} \text{ ----- } 10\,000 \mu\text{m} \\ 1 \text{ cm}^3 \text{ ----- } (10\,000 \mu\text{m})^3 \\ X = 1 \times 10^{12} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ cm}^3 \text{ ----- } 1 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 \\ X \text{ ----- } 490873 \mu\text{m}^3 \\ X = 4.9 \times 10^{-7} \text{ cm}^3 = \text{mL} \end{array}$$

El volumen se transformo en masa mediante la formula de la densidad ($D = \frac{m}{V}$), tomando como 1g/ mL la densidad del *Paramecium*.

$$m = D \times V$$

$$m = (1 \text{ g/ mL}) (4.9 \times 10^{-7} \text{ mL})$$

$$m = 4.9 \times 10^{-7} \text{ g}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \text{ ----- } 10^6 \mu\text{g/ mL} \\ 4.9 \times 10^{-7} \text{ g} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X = 0.49 \mu\text{g/ mL (concentración de un Paramecium)}.$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los resultados obtenidos se llevaron a cabo los casos de análisis para su comparación estadística. Para realizar dicha comparación se deben cumplir los requisitos siguientes:

- a) Independencia de los datos
- b) Poblaciones con distribución normal
- c) Varianzas iguales de las poblaciones

1. PRUEBA DE INDEPENDENCIA

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó la distribución ji-cuadrada, que es la prueba de hipótesis de que dos criterios de clasificación, cuando son aplicados a las mismas unidades elementales, son independientes (Mendenhall, 1997; Montgomery y Hines, 1993).

1.1. Prueba de independencia en las pruebas de eficiencia de eliminación de *E. coli* con hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum* con respecto al tiempo.

Con los resultados obtenidos se hizo un muestreo aleatorio que se presenta en la tabla 1d, para la prueba de eficiencia de eliminación de *E. coli*. La hipótesis nula que se establece es que existe independencia entre los 3 tipos de desinfectante (hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum*) y el tiempo de contacto.

Tabla 1d. Datos seleccionados al azar para los diferentes tipos de desinfectantes

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata	Paramecium	Total
Inicial	28700	28700	28700		86100
0	28700	21000	16200	20500	86400
15	32000	9400	0	18200	59600
30	29000	1010	0	9800	39810
45	30600	14	0	9100	39714
Total	149000	60124	44900	57600	311624

Tabla 2d. Tabla de contingencia de 5x4 para los diferentes tipos de desinfectantes.

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata	Paramecium
Inicial	41167.88	16611.93	12405.62	15914.56
0	41311.32	16669.81	12448.85	15970.02
15	28497.16	11499.08	8587.40	11016.35
30	19034.77	7680.85	5735.98	7358.41
45	18988.86	7662.33	5722.15	7340.66

Las frecuencias observadas (datos de la tabla 1d) se designan por O_{ij} y las esperadas como E_{ij} (datos de la tabla 2d). Estas últimas se calcularon a su vez, a partir de la relación:

$$E_{ij} = \left(\frac{n_{i.}}{n} \right) \left(\frac{n_{.j}}{n} \right) * n$$

El estadígrafo de prueba viene dado por:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^r \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad \text{con (columnas-1)(filas-1) grados de libertad}$$

El valor de la ji-cuadrada, obtenida de las tablas 1d y 2d, fue: $\chi^2 = 109799.24$. El valor teórico para $\alpha = 0.05$ y $(5-1)(4-1) = 12$ grados de libertad, es de 21.026, por lo que se rechaza H_0 . En conclusión, el tipo de desinfectante utilizado está relacionado con su tiempo de contacto.

2. PRUEBA DE NORMALIDAD

Para la ejecución de la prueba de la normal se contrastaron los datos con la ji-cuadrada. La hipótesis nula que se estableció fue: *los datos se comportan de acuerdo a una distribución normal* (Walpole y Myers, 1992).

2.1. Prueba de normalidad para la eficiencia de eliminación de *E. coli* con tres desinfectantes.

Para el cálculo se conformó una distribución de frecuencia, siguiendo el procedimiento que se sugiere para el ordenamiento de datos agrupados en la estadística descriptiva (Márquez de Cantú, 1998). De acuerdo con la tabla 1d, se tienen 19 datos (N), de ellos se calculó la diferencia entre los valores máximo y mínimo para obtener la amplitud (R). Se propusieron 5 clases o agrupamientos (C), las cuales se ordenaron de manera que quedara incluido el total de los N (tabla 3d) (Mendenhall, 1997).

Tabla 3d. Análisis de resultados para la prueba de normalidad para la eficiencia de eliminación de *E. coli* con tres desinfectantes.

Límite de clase	Clases	fi = Oi	Mi	z	Pi	Ei
<6200]	≤ 6200	6	3100	-1.15	0.1247	12.47
<6200 , 12400]	6200 , 12400	3	9300	-0.59	0.1524	15.24
<12200 , 18600]	12200 , 18600	1	15500	-0.03	0.2102	21.02
<18600, 24800]	18600, 24800	2	21700	0.53	0.2137	21.37
<24800]	> 24800	7	27900	-	0.2990	29.90
		N = 19			1.00	100.00

Luego, se calcularon los puntos medios de cada clase (m_i) y se obtuvieron la media (\bar{x}) y la desviación estándar (s) muestrales utilizando las siguientes relaciones:

$$\bar{x} = \frac{\sum f_i m_i}{N}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum f_i m_i^2 - n \bar{x}^2}{N-1}}$$

Con las ecuaciones anteriores, se obtuvieron los valores $\bar{x} = 15826.32$ y $s = 11027.89$. En el siguiente paso se calcularon los valores de z para cada clase con la ecuación siguiente: $z = (x - \bar{x})/s$.

Para determinar las probabilidades (P_i) de cada clase se utilizaron las tablas de distribución normal (Márquez de Cantú, 1988). Con estos datos se determinó el valor del estadígrafo de prueba:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{O_i^2}{E_i} - N = -13.6490$$

El valor teórico para 2 grados (5 clases - 3 restricciones) fue $\chi_{0.95, 2}^2 = 5.991$

De tal manera que se concluye que los valores obtenidos por los tres desinfectantes se comportan acorde con una distribución normal.

3. PRUEBA DE IGUALDAD DE VARIANZAS

Se decidió emplear la prueba de Bartlett para probar la condición de que las varianzas de las poblaciones a comparar sean iguales. Esta prueba es menos sensible a la condición de independencia que la prueba F convencional de igualdad de varianzas, aunque también es un requisito a cumplir. Consiste en calcular un estadístico cuya distribución muestral es, aproximadamente, ji-cuadrada, con $a - 1$ grados de libertad (a representa los tratamientos a comparar) (Mendenhall, 1997; Montgomery y Hines, 1993). El estadístico de prueba es:

$$\chi^2 = 2.3026 \frac{q}{c}$$

donde:

$$q = (N-a) \log S_p^2 - \sum_{i=1}^a (n_i - 1) \log S_i^2$$

$$c = 1 + \frac{1}{3(a-1)} \left(\sum_{i=1}^a (n_i - 1)^{-1} - (N-a)^{-1} \right)$$

$$S_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^a (n_i - 1) S_i^2}{N - a}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

N es el número total de datos y n_i es el número de datos por tratamiento. La hipótesis nula que se establece es *igualdad de varianzas entre las varianzas de cada población*. Esta hipótesis se rechaza sólo si

$$\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{teor}}$$

3.1. Prueba de igualdad de varianzas para la eficiencia de eliminación de *E. coli* con tres desinfectantes.

Tomando como base a la tabla 1d, los resultados estadísticos obtenidos para la presente prueba se resumen en la tabla 4d.

Tabla 4d. Resultados estadísticos para la prueba de igualdad de varianzas

Tiempo (min)	Testigo	Cloro	Plata	<i>Paramecium</i>
Inicial	28700	28700	28700	
0	28700	21000	16200	20500
15	32000	9400	0	18200
30	29000	1010	0	9800
45	30600	14	0	9100
n	5.00	5.00	5.00	4.00
s ²	2135000.00	157772805.20	170732000.00	33633333.33

Tabla 5d. Resultados estadísticos para la prueba de igualdad de varianzas

Variable	N	A	S _p ²	q	C	X ² _{calc}	Grados de libertad (a-1)	X ² _{teor}
Desinfectantes	19	4	94897281.39	6.0395	1.1130	5.4265	3	7.815

De acuerdo con los datos resumidos en la tabla 5d, la conclusión a la que se llega es: se acepta H₀; las varianzas de los tres tratamientos son iguales.

4. PRUEBA DE LA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA MÍNIMA (DSM).

Esta prueba se define como la diferencia mínima que podría existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes. Se basa en la prueba *t* de Student para la diferencia entre dos medias cuando las varianzas son iguales. El estadígrafo utilizado para esta prueba es:

$$DSM = (t_{\alpha/2, n-2, \beta error}) \cdot \sqrt{2s^2 / n}$$

Tomando como base a la tabla 6d, los resultados estadísticos obtenidos para la presente prueba se muestran en las tablas 7d y 8d.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 6d. Resultados estadísticos para la prueba de la diferencia significativa mínima, para la eficiencia de eliminación de *E. coli* con tres desinfectantes

Tiempo (min.)	Testigo	Cloro	Plata	Paramecium	
Inicial	28700	28700	28700		
0	28700	21000	16200	20500	
15	32000	9400	0	18200	
30	29000	1010	0	9800	
45	30600	14	0	9100	
N	5.00	5.00	5.00	4.00	N = 19.00
Varianzas (S_i^2)	2135000.00	157772805.20	170732000.00	33633333.33	a = 4
Sumas (X_i)	149000.00	60124.00	44900.00	57600.00	$\bar{X} = 311624.00$
Medias (\bar{x}_i)	29800.00	12024.80	8980.00	14400.00	$\bar{x} = 16301.20$

Tabla 7d. Resultados estadísticos obtenidos para la prueba de DSM

Variable	SSE	s^2	$\sqrt{(2s^2/n)}$	t(0.95, gl error)	DSM
Desinfectante	769129920.80	51275328.05	4528.81	1.75	7939.01

Tabla 8d. Diferencias absolutas entre pares de medias para la prueba de la DSM, para la eficiencia de eliminación de *E. coli* con tres desinfectantes

	Testigo	Cloro	Plata	Paramecium
Testigo	-	17775.20	20820.00	15400.00
Cloro	-	-	3044.80	2375.20
Plata	-	-	-	5420.00

De acuerdo con la tabla 8d, existe diferencia significativa entre las medias de los tres desinfectantes y el testigo, siendo la de mayor diferencia la de plata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

1. Acher A, Fischer E, Turnheim R, Manor Y. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. *Wat Res* 1997; 6: 1398-1404.
2. Anon. Toxicological profile for silver. Prepared by Clement International Corp. under contract No. 205-88-0608. For: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U. S. Pub. Health Serv. TP-90-24. 1990.
3. Anon, Aust. Australian Water Quality Guidelines for Fresh and Marine Waters. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council. Canberra. ISBN 0-642-18297-3. 1992.
4. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater analysis. American Public Health Association. AWWA and WPCF, Washington D.C., US; 1998.
5. Armendáriz GJ, Ambriz RK, Dávila CM, Luna PV. Algunos comentarios y recomendaciones técnicas sobre los principales procedimientos para la cuantificación de bacterias. *Anuario Latinoamericano de Educación Química* 1998-1999. Argentina (San Luis), ISSN 0328-087X. Año XI, Núm., XI. 1998: 254-258.
6. Ausland G, Stevik TK, Hanssen JF, Kohler JC, Jenssen PD. Intermittent filtration of wastewater removal of fecal coliforms and fecal streptococci. *Wat Res* 2002; 36: 3507-3516.
7. Baker FJ. Manual de técnicas de microbiología médica. España (Zaragoza): Acribia, 1990.
8. Beaver PCH, Jung RC, Cupp EW. Parasitología clínica. 2a ed. México: Salvat editores, 1992.
9. Berry JP, Galle P. Selenium and kidney deposits in experimental argyria. *Electron microscopy and microanalysis. Pathol Biol* 1982; 30: 136-140.
10. Bitton G. Wastewater microbiology. US: John Wiley and Sons. Inc, 1994.
11. Cáceres LO. Desinfección del agua. Peru (Lima): Ministerio de salud OPS/OMS, 1990.
12. Castro EM, Benavides LM. Aspectos químicos en la cloración de aguas residuales. Hojas de divulgación técnica, CEPIS. 1987.
13. CELDS. Computer-Environment Legislative Data Systems. The Environmental Technical Information System (ETIS). Dept. Urban and Regional Planning, Planning Information Program, University of Illinois, Urbana-Champaign, Il. Jan. 6. 1989.
14. Chermisinoff PN. Handbook of water and wastewater treatment technology. NY, US: Marcel Dekker Inc, 1995.
15. Christman KA. Calidad del agua: desinfección efectiva. Arlington US: Consejo de química del cloro. 2001 <http://www.clorosur.com/espanhol/publicaciones/desinfección.html>.
16. Davies RL, Etris SF. The development and functions of silver industria water purification and disease control. *Catalysis Today* 1997; 36: 107-14.
17. Dávila CM, Luna PV. Cuantificación de la abundancia bacteriana y del efecto germicida del cloro. *Anuario Latinoamericano de Educación Química*. San Luis, Argentina. Año IX, Núm., IX Vol. II. 1997: 50- 56 pp.
18. Denyer SP, Hugo WB. Mechanisms of action of chemical biocides, their study and exploitation. NY, US: Blackwell Scientific Publications. Society for applied bacteriology, 1991.
19. Droste RL. Theory and practice of water and wastewater treatment. US: John Wiley and sons, 1997.
20. D.S.E.N.Y. Manual de tratamiento de aguas. NY,US: Limusa, 1996.

21. Etris S. Silver ions from "oxides" kill bacteria faster, more affectively in pools: clinical trials also show promise as medicine. Silver News Desk. The silver institute. <http://www.silverinstitute.org/silvernews/1997/4d1997.htm>.
22. Franceschi M, Girou A, Carro DM, Maurette MT, Puech CE. Optimization of coagulation-flocculation process of raw water by optimal design method. *Wat Res* 2002; 36: 3561-3572.
23. Galtsoff PS, Lutz EF, Welch PS. Culture methods for invertebrate animals. NY,US: Dover Publications, Inc, 1989.
24. Glaze WH, Henderson JE, Smith G. Analysis of new chlorinated organic compounds formed by chlorination of municipal wastewater. Water chlorination, environmental impact and health effects. Robert L. Jolley Ed., Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor Michigan, 1975: vol. 1.
25. Hart B. A compilation of Australian water quality criteria. Aust Water Res Canberra Coun. Tech. Paper No. 7; 1974.
26. Huffman ED, Gennaccaro A, Rose JB, Dussert BW. Low- and medium-pressure UV inactivation of microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*. *Wat Res* 2002; 36: 3161-3164.
27. HWC. Guidelines for Canadian drinking water quality. Health and Welfare Canada, Ottawa, 1978.
28. Jenne EA, Girvin DC, Ball JW, Bruchard J M. Inorganic speciation of silver in natural waters-fresh to marine. *In: Environmental impacts of artificial ice nucleating agents Pennsylvania: Hutchinson and Ross, Inc, 1978.*
29. Kampioti AA, Stephanou EG. The impact of bromide on the formation of neutral and acidic disinfection by-products (DBPs) in Mediterranean chlorinated drinking water. *Wat Res* 2002; 36: 2596-2606.
30. Klein DA. Biochemical effects of silver; Effects on microorganisms; Plant effects; Silver effects: other terrestrial organisms; Effects on humans. *In: Environmental impacts of artificial ice nucleating agents. Pennsylvania: Hutchinson and Ross, Inc, 1978*
31. Kudo R. Protozoología. México: Continental Inc, 1985.
32. Lagbourn PJ. A functional biology of free-living protozoa. London and Sidney: CROOM HELM, 1984.
33. Lazarova V, Janex ML, Fisksdal L, Oberg C, Barcina I, Pommepeuy M. Advanced wastewater disinfection technologies: short and long term efficiency. *Wat Sci Tech* 1998; 12: 109-117.
34. Lazarova V, Savoye P, Janex ML, Blatchley ER III, Pommepeuy M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Wat Sci Tech* 1999; 40: 203-13.
35. Luna PV, Aladro LM, Durán BC. Efecto del sustrato sobre las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos Casos tipo: Nejayote, vinazas y aguas blancas de papel. Vol 3, serie: Química ambiental del Agua. México (D.F.): Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA) UNAM, 1994.
36. Marijan A, Conrad T, Giger W. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3. Determinations of nonylphenoxy carboxylic acids by high resolution gas chromatography/mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Envl Sci and Tech* 1987; 21: 697-703.
37. Mazarí MM, Hernández EC, Rojo CF, Rivera PC. Trihalometanos y haloácidos en agua de la zona sur de la ciudad de México. Instituto de Ecología y Facultad de Química. UNAM, 2000.
38. McJunkin EF. Agua y salud humana. México: OPS, OMS, Limusa, 1988.

39. Mendenhall W. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. México (D. F): Prentice Hall, 1997.
40. Metcalf y Eddy. Wastewater engineering treatment, disposal, and reuse. US: McGraw-Hill Publishing Company, 1991.
41. Miranda RM. Estudio y evaluación del poder germicida de los compuestos de plata en aguas residuales parcialmente tratadas. Tesis de maestría en Química Ambiental, Facultad de Química, UNAM. 2002 (en proceso).
42. Montgomery DC, Hines W. Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. México (D. F): Prentice Hall, 1993.
43. MRI. Silver. An appraisal of environmental exposure. Midwest Research Institute, Tech. Report #3, 1975.
44. Myllykangas T, Nissinen TK, RantaKokko P, Martikainen PJ. Wat Res 2002; 36: 3045-3053.
45. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, celular and molecular biology. Washington, D.C. US: American Society for Microbiology; 1987.
46. Netfirms. El agua potable. [http:// Agua potable.netfirms.com/](http://Agua_potable.netfirms.com/) subproductos de la desinfección.htm. 2002.
47. Norma Oficial Mexicana. NOM-003-ECOL 1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. Diario Oficial de la Federación, 21 de Septiembre de 19998.
48. Norma Oficial Mexicana NOM-127-ECOL-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 18 de Enero de 1996.
49. Norwood DL, Christman RT, y Hatcher PG. Structural characterization of aquatic humic material. 2. Phenolic content and its relationship to chlorination mechanisms in an isolated aquatic fulvic acid. Env Sci and Tech 1987; 21: 791-798.
50. Pedahzur R, Lev O, Fattal B, Shuval HI. The interaction of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli* : a preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant. Wat Sci Tech 1995; 31: 123-129.
51. Pedahzur R, Shuval HI, Ulitzur S. Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: their bactericidal effects and possible modes of action. Wat Sci Tech. 1997; 35: 87-93.
52. Pelczar J, Michael J. Microbiología. 2a ed. México: McGraw-Hill, 1977.
53. Ramírez- Gama R M, Luna MB, Velázquez MO, Vierna GL, Mejía CA, Tsuzuki RG, Hernández GL, Muggenburg L. Manual de prácticas de microbiología general. México (D.F.): Facultad de Química UNAM, 2000.
54. Ruppert EE, Barnes RD. Zoología de los invertebrados. 6a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996
55. Schmidt W, Hamsch B, Petzoldt. Classification of algogenic organic matter concerning its contribution to the bacterial regrowth potential and by-products formation. Wat Sci Tech 1998; 37: 91-96.
56. Schoenen D. Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens whit drinking water : possibilities and limitations. Wat Res 2002; 36: 3874-3888.
57. Schulz CR, Okun DA. Tratamiento de aguas superficiales para países en desarrollo. México: Limusa, 1998.
58. Sechoing L, Liukkonen RJ, Thom RE, Bastian JG, Lukasewycz MT, y Carlson RM. Increased chloroform production from model components of aquatic humus and mixtures of chlorine dioxide/chlorine. Env Sci and Tech 1984; 18: 932-935.

59. Taylor M, Demayo A. and Reeder S. Guidelines for Surface Water Quality. Vol. 1. Inorganic Chemical Substances. Silver. IWD, Water Quality Branch, Ottawa; 1980.
60. Thompson NR. Silver. *In: Comprehensive Inorganic Chemistry*. Oxford, NY. & Toronto: Trotman-Dickenson (Editors). Pergamon Press; 1973.
61. USEPA. Ambient water quality criteria for silver. EPA-440/5-80-071. Office of Water Regulations and standards, Washington, D.C. 1980.
62. USEPA. USEPA. Federal Register. 45: 79318-79319. 1980b.
63. USEPA. USEPA. Drinking Water criteria document for silver. Cinn. Ohio. USEPA; Envir. Crit. Assess. Off. PB86-118288. 1985.
64. USEPA. USEPA. Code of Federal Regulations. 40 CFR 116.4. 1987.
65. USEPA. USEPA. Code of Federal Regulations. 40 CFR 302.4. 1989.
66. USEPA. Toxicological Profile for Silver. Clement International Corp. Contract No. 205-88-0608. For US Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TP-90-24. 1990.
67. USFDA. USFDA. Code of Federal Regulations. 21 CFR 103.35. 1988.
68. Villanueva CM, Kogenivas M, Grimalt JO. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. *Gac.Sanit* 2001;1: 48-53.
69. Walpole R, Myers R. Probabilidad y estadística. México (D. F): McGraw-Hill, 1992.
70. Warrington. Ambient water quality criteria for silver. The Ministry of Environment, Lands and Parks. British Columbia. 1996. <http://wtapwww.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/silver>
71. Xu P, Janex LM, Savoye P, Cockx A, Lazarova V. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. *Wat Res* 2002; 36: 1043-1055.
72. Zhang X, Minear RA. Descomposition of trihaloacetic acids and formation of the corresponding trihalomethanes in drinking water. *Wat Res* 2002; 36: 3665-3673.