

10524
4



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

U. N. A. M.

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES



**"EL OZONO COMO UN METODO DE DESINFECCION DEL
AGUA EN EL HOGAR"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ,

RICARDO ALONSO HERNANDEZ

ASESORES:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

M. en C. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

El ozono como un método de desinfección del agua en el hogar.

que presenta el pasante: Ricardo Alonso Hernández
con número de cuenta: 9122551-3 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

AT E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Marzo de 2003

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

SECRETARIO Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

PRIMER SUPLENTE M. en C. Sofía González Gallardo

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Héctor Coss Garduño

[Handwritten signatures and initials]
H. Coss

B

Agradecimientos

Doy gracias a mis padres *Luisa Hernández* y *Guadalupe Alonso* por ser mi ejemplo, mi motivación, mi apoyo, y gracias por el sacrificio que hicieron para que alcanzara uno de mis objetivos, y principalmente gracias por haberme dado la vida.

A mi hermano *Daniel*, gracias por darme motivación, apoyo y por todos esos momentos de alegría que hemos pasado juntos.

A toda mi familia, abuelitos, tíos y primos porque de alguna manera me alentaron para terminar uno de mis objetivos en la vida.

A mi novia *Hazel*, porque estuviste a mi lado todo este tiempo dándome tu apoyo incondicional y porque gracias a ti todo fue y será más fácil, ya que siempre esperaba encontrar una persona como tú, que me brindara su amor sin esperar nada a cambio. Y gracias por ese gran regalo que nos dará la vida, ese regalo que es nuestro bebé.

Gracias flaquita...

Por todo este tiempo que has estado junto a mí

Por toda la alegría que trajiste a mi vida

Por cada sueño que hiciste verdadero

Por todo el amor que encontré en ti

Por eso estaré por siempre agradecido

Por ser mi fuerza cuando yo era débil

Por ser mi voz cuando no podía hablar

Por ser mis ojos cuando no podía ver

Porque me diste fe cuando yo no creía

Y porque me amas, gracias amor.

A mi gran amiga Mariana, porque jamás pense encontrar una verdadera amistad en alguien que a pesar de la distancia fuera tan similar a mí, una persona en quien puedo contar con su amistad incondicional para cualquier cosa. Gracias por todos tus consejos y apoyo que me diste para terminar este trabajo.

Gracias a la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme dado la formación profesional, y agradezco también a todos los profesores que formaron parte de esta.

Gracias a mis asesores:

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara

Dr. Abel Ciprián Carrasco

Por su apoyo y orientación durante el transcurso de esta tesis y por haberme transmitido sus conocimientos, para hacer de este un buen trabajo.

También agradezco a mis sinodales por darme su apoyo y orientación para que esta tesis se concluyera, gracias por el tiempo que invirtieron en este trabajo.

Gracias al Laboratorio de Virología y principalmente a la *Dra. Susy*, porque su amistad es algo muy valioso para mí, ya que siempre esperé encontrarme una persona en quien confiar y nadie mejor que usted, gracias por todo su apoyo, comprensión y consejos.

D

INDICE

RESUMEN.....	i
1. INTRODUCCION.....	4
1.1 El agua	4
1.2 Desinfección	6
1.3 Factores que influyen en la desinfección	7
1.4 Patógenos bacterianos y enfermedades relacionadas con el agua	8
1.5 Modo de transmisión	10
1.6 Aislamiento e identificación de patógenos	12
1.7 Determinación del numero de bacterias en una muestra de agua	14
1.8 Normas Oficiales Mexicanas	18
1.9 Estándares revisados por la organización mundial de la salud (OMS)	18
1.10 Características del agua potable	19
1.11 Tipos de agentes infecciosos	20
1.12 Ozono	21
1.13 Ozono VS Cloro	24
1.14 Efectos del ozono en microorganismos indicadores y patogénicos	25
1.15 Mecanismo de acción del ozono	26
1.16 Usos del ozono	27
1.17 Importancia de la salud publica de los productos del ozono	28
1.18 HIPOTESIS	31
2. OBJETIVOS	32
3. METODOLOGIA	33
3.1 Identificación de la bacteria	33
3.2 Preparación del cultivo de referencia	33
3.3 Preparación del subcultivo	33
3.4 Preparación de la suspensión de <i>Escherichia coli</i>	34

F

3.5	Preparación del agua de prueba	34
3.6	Desarrollo de la prueba	35
3.7	Toma de muestra	35
3.8	Procedimiento para el recuento en placa	36
3.9	Procedimiento para la determinación del NMP	38
3.10	Cálculos para determinar el porcentaje de reducción bacteriana.....	39
3.11	Determinación de subproductos de la desinfección con ozono	40
3.12	Preparación de la curva de calibración	41
3.13	Preparación de la muestra	41
3.14	Extracción y desarrollo de color	42
3.15	Estandarización del método	42
3.16	Cálculos para determinar la concentración de subproductos del ozono.....	43
3.17	Expresión de resultados	43
4.	RESULTADOS	44
4.1	Identificación de la bacteria	44
4.2	Método de prueba para evaluar la eficacia en reducción bacteriana....	44
4.3	Método de prueba para determinar el NMP de coliformes totales en el agua de prueba	49
4.4	Método de prueba para evaluar la eficacia en reducción bacteriana y determinación del NMP de coliformes totales en el agua en condiciones reales de contaminación	50
4.5	Determinación de subproductos de la desinfección con ozono	51
5.	DISCUSION	54
6.	CONCLUSION	58
7.	APENDICES.....	59
8.	BIBLIOGRAFIA.....	68

RESUMEN

Los resultados de este trabajo presentaron que el ozono es una alternativa para la desinfección del agua. En la prueba de conteo en placa, cuando se utilizaron 3×10^4 UFC/ml de *Escherichia coli* se comprobó la capacidad desinfectante del ozono porque con el tratamiento la cantidad de coliformes en el agua se redujo a cero es decir, una reducción bacteriana del 100%, produciendo agua potable, cuando se utilizaron 1.5×10^5 UFC/ml y 3×10^5 UFC/ml, de la segunda y tercera prueba respectivamente, el porcentaje de reducción bacteriana fue menor al 99.99%, por lo que decimos que una carga demasiado grande de bacteria en el agua no se elimina totalmente con el ozono, dejando agua de potabilidad no aceptable, ya que se considera potable si el porcentaje es igual o mayor a 99.99%, de acuerdo a las especificaciones de la NOM-180-SSA1-1998.

Lo anterior se comprobó porque al mismo tiempo se hizo la determinación del Número Más Probable (NMP) y los resultados obtenidos coincidieron con el conteo en placa, porque cuando se utilizó la cantidad inicial de 3×10^4 UFC/ml el NMP de coliformes antes del tratamiento fue $\geq 2400/100\text{ml}$, y después de éste el NMP de coliformes fue $< 2/100\text{ml}$. En cambio cuando se utilizó más cantidad de bacteria (1.5×10^5 y 3×10^5 UFC/ml) el NMP antes del tratamiento fue ≥ 2400 NMP/100ml en ambos casos y después del tratamiento esta cantidad permaneció igual, de decir el agua no poseía una potabilidad aceptable.

En cuanto a los posibles subproductos de la desinfección del agua tratada con el ozono, vemos que se encontró una cantidad muy por debajo del límite máximo permisible de sustancias activas al azul de metileno ya que este límite es de 0.5 mg/l, de acuerdo a la NOM-180-SSA1-1998, y como resultado obtuvimos una concentración de 1.0×10^{-2} mg/l de sustancias activas al azul de metileno, es decir, solamente el 2% del límite permisible de subproductos de la desinfección.

1. INTRODUCCION

1.1 EL AGUA

El volumen total de agua en el mundo permanece constante, lo que cambia es la calidad y la disponibilidad. El agua está constantemente reciclándose, este es un proceso conocido como el ciclo del agua. Los hidrólogos estudian la naturaleza física y química del agua y sus movimientos tanto debajo como en la superficie. En términos de volumen total, el 97.5% del agua del mundo es salina con un 99.99% de ella encontrándose en los océanos, el resto forma los lagos salinos. Esto significa que solamente el 2.5% del volumen del agua en el mundo es actualmente agua no salina. Sin embargo, no toda esta agua dulce está disponible para el consumo humano. Alrededor del 75% de esta se encuentra inmovilizada en los casquetes polares y en los glaciares, además un 24% está localizada en el subsuelo, lo que significa que menos de un 1% del total se encuentra en lagos, ríos y en el suelo. Por lo tanto, solamente se cuenta con el 0.01% del agua del mundo en lagos y ríos, con otro 0.01% presente como humedad en el suelo pero sin disponibilidad para los humanos.

El ciclo es continuo y así el agua es una fuente renovable. En esencia, cuanto más llueva mayor será el caudal de los ríos y más altos los niveles alcanzados en las capas freáticas en las zonas de almacenamiento de aguas subterráneas llenados con el agua que se filtra a través de la tierra. Las disponibilidades de agua dependen de las lluvias caídas, así, cuando la cantidad de lluvia decrece el volumen de agua disponible para el suministro decrece, y en caso de sequía severa disminuirá a cero. Para proveer suficiente agua para el abastecimiento de todo el año se requiere de una administración cuidadosa de los recursos.

El agua absorbe rápidamente tanto las sustancias naturales como las producidas por el hombre, generalmente convirtiendo el agua en inadecuada para

su consumo, sin algún tipo de tratamiento. Los grupos importantes de sustancias que pueden considerarse indeseables en exceso son: color, materia suspendida, turbidez, patógenos (virus, bacterias, protozoos u otro tipo de organismos patógenos), dureza, sabor y olor y además de productos químicos nocivos.^{1,5}

El objetivo del tratamiento del agua es producir un adecuado y continuo suministro de agua que es química, bacteriológica y estéticamente agradable. Así, la potabilización del agua debe producir agua que sea grata, (sin sabores desagradables), saludable (sin ningún organismo patógeno o producto químico nocivo para el consumidor), limpia (libre de materia suspendida y turbidez), sin color y sin olor, razonablemente blanda, no corrosiva y con bajo contenido de materia orgánica.^{1,9}

Los consumidores esperan tener en sus grifos agua limpia y saludable las 24 horas del día. Aunque el agua que es antiestética, por ejemplo debido al color o la turbidez, puede ser perfectamente sana para beber, los consumidores considerarán que no es apta para beber y probablemente peligrosa para la salud. Los problemas no se originan solamente en los propios recursos, sino también durante el tratamiento, distribución y en los hogares de los consumidores.

Las plantas de tratamiento de agua deben ser capaces de tener una producción final de alta calidad independientemente de cual sea la demanda. Con la excepción de aguas subterráneas puras, todas las aguas suministradas requieren una purificación. Aunque en teoría el agua más sucia se puede purificar hasta calidad de agua potable, en la práctica incluso el tratamiento de agua relativamente pura para producir un agua final de una calidad estable, y en suficiente volumen, es técnicamente más difícil. El tratamiento del agua consiste en una serie de pasos los cuales operan generalmente en serie. Cuanto más limpia sea el agua bruta menores son los pasos o los procesos que se requieren, y por lo tanto el costo total del agua es menor.¹

1.2 DESINFECCIÓN

Debido a lo pequeño de muchos microorganismos, no es posible garantizar que su remoción sea completa con los tratamientos previos a la desinfección. Por esta razón es necesario desinfectar el agua, ya que la desinfección es la destrucción de microorganismos capaces de causar enfermedades, así esta es una esencial y final barrera contra la exposición humana ante microorganismos patógenos que causan enfermedades (virus, bacterias y parásitos protozoarios). La cloración fue y ha sido usada por siglos para proveer una seguridad adicional contra dichos microorganismos. La destrucción de patógenos y parásitos por desinfección ayuda considerablemente en la reducción de enfermedades. Pero, en años recientes, se ha encontrado que la cloración del agua puede causar la formación de productos o subproductos que pueden ser tóxicos o genotóxicos para humanos y animales.

Por esto algunos otros desinfectantes usados para la destrucción de patógenos y parásitos, por ejemplo el ozono, son también utilizados para la desinfección del agua, además de que este presenta características oxidativas y que sirve para la oxidación de materia orgánica, hierro y manganeso y para controlar los problemas de sabor, olor y crecimiento de algas. ^{2, 3, 25}

Uno de los procesos de la purificación del agua comprende la filtración, y aunque los filtros lentos de arena son muy eficaces para eliminar bacterias, y el proceso de coagulación es bueno para eliminar virus, no es posible garantizar que su remoción sea completa por dichos tratamientos debido a lo pequeño de muchos microorganismos, así el agua final contiene patógenos y bacterias que necesitan ser eliminados o destruidos. En la práctica es imposible esterilizar el agua para matar todos los microorganismos presentes, y debido a la alta concentración de productos químicos requeridos para su esterilización, harían el agua muy desagradable y posiblemente peligrosa para beber. Por lo tanto el agua

se desinfecta, en lugar de esterilizarla, utilizando uno de los métodos de desinfección como son la cloración, ozono o la radicación ultravioleta para asegurar que los patógenos potencialmente dañinos se mantengan en un nivel de seguridad en las aguas potables.²

Es importante observar la diferencia entre la esterilización (la muerte de todos los organismos), que rara vez se necesita, y la desinfección (la muerte de organismos potencialmente dañinos), que es el requerimiento normal.^{2, 15}

La eficacia del tratamiento del agua en eliminar microorganismos patógenos varía de mes a mes, e incluso cuando la planta de tratamiento está logrando un 99.9% de eliminación habrá siempre algunos patógenos residuales en el agua. Esto significa que la desinfección es absolutamente vital para asegurar que todos los microorganismos provenientes de una contaminación fecal del agua bruta sean destruidos.¹

1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DESINFECCIÓN

Se pueden considerar dos puntos importantes dentro de los factores que influyen en la desinfección:

- **Tipo de desinfectante:** La eficacia de la desinfección depende del tipo de químico utilizado. Algunos desinfectantes (por ejemplo ozono, dióxido de cloro) son fuertes oxidantes, en comparación con otros.
- **Tipo de microorganismo:** Existe una exagerada variación en la resistencia de microorganismos patógenos a la desinfección. Las bacterias formadoras de esporas son generalmente más resistentes a los desinfectantes que las bacterias vegetativas. La resistencia a los desinfectantes varía de acuerdo a la cantidad de bacterias y a la cepa perteneciente. En general, la resistencia a la desinfección lleva el siguiente orden: bacteria vegetativa < virus entéricos < bacterias formadoras de esporas < quistes de protozoarios.³

1.4 PATOGENOS BACTERIANOS Y ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL AGUA

La materia fecal contiene arriba de 10^9 bacterias/gramo. El contenido bacteriano de las heces representa aproximadamente 9% del peso húmedo. Las bacterias se han caracterizado y pertenecen a los siguientes grupos:

1. Bacterias Gram negativas anaerobias facultativas (por ejemplo *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*)
2. Bacterias Gram negativas aerobias (por ejemplo *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*)
3. Bacterias Gram positivas formadoras de esporas (por ejemplo *Bacillus* spp)
4. Bacterias Gram positivas no formadoras de esporas (por ejemplo *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*)³

Las enfermedades transmitidas por el agua son aquellas que se propagan por el agua contaminada con heces u orina humana; la infección ocurre cuando el microorganismo patógeno llega al agua que consume una persona que no es inmune a la enfermedad. La mayoría de las enfermedades en esta categoría, el cólera, la tifoidea, la disentería bacilar, etc., siguen una ruta clásica de transmisión fecal-oral y los brotes se caracterizan porque enferman simultáneamente varias personas que toman de la misma fuente de agua.

El agua es muy importante en la vida del hombre, si está contaminada, se convierte en un medio con gran potencial para transmitir una amplia variedad de enfermedades. En el mundo desarrollado las enfermedades hídricas son raras, lo que se debe a la presencia de sistemas eficientes de abastecimiento de agua y eliminación del agua residual. Sin embargo en el mundo en vías de desarrollo, tal vez cerca de 2000 millones de personas no cuentan con abastecimiento de agua seguro y adecuado. Como resultado, las enfermedades hídricas en estas áreas alcanzan cifras escalofriantes.²

Hay aproximadamente dos docenas de enfermedades infecciosas, (Tabla 1), en cuya incidencia puede influir el agua. La causa de estas enfermedades puede tener su origen en bacterias, protozoarios o gusanos. Su control y detención tiene como fundamento la naturaleza del agente causante, aunque es más útil tomar en consideración los aspectos relacionados con el agua en la diseminación de la infección.²

Algunas de estas enfermedades son de gran importancia en la ciudad de México, ya que el requerimiento fisiológico básico de agua de una persona es de 2.5 l/día, aunque la carga de trabajo y las condiciones climáticas pueden aumentar bastante esta cifra, debido a la necesidad de remplazar el agua perdida por la transpiración. A medida que el nivel de vida aumenta, aumenta también el uso del agua, y si se consume agua contaminada con algún microorganismo patógeno, el consumidor está expuesto a contraer alguna enfermedad, principalmente gastrointestinal (Tabla 2).²

Así, la calidad del agua potable para uso público es lo más importante para cada uno de nosotros. Los sistemas de distribución del agua municipal y rural pueden transmitir enfermedades humanas tales como cólera (*Vibrio cholerae*), fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), shigelosis (*Shigella* spp), salmonelosis (*Salmonella* spp.), y gastroenteritis (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*), (Tabla 1 y 2). La amenaza de la transmisión de tales enfermedades es más seria cuando la densidad poblacional crece y consigo los desechos de los habitantes de las ciudades que acarrean patógenos humanos intestinales.⁴

La transmisión de todos ellos se realiza por vía fecal-oral y se producen principalmente por la contaminación, tanto directa como indirecta, de los recursos de agua por las aguas residuales o en ocasiones por desechos de animales. Es teóricamente posible, pero improbable, que otros organismos

patógenos tales como nemátodos (lombrices y anquilostoma) y céstodos (tenia) se puedan transmitir a través de agua potable.¹

Tabla 1. Principales enfermedades relacionadas con el agua.⁴

Enfermedad	Tipo de relación con el agua
Cólera Hepatitis infecciosa Leptospirosis Paratifoidea Tularemia Tifoidea	Transmitida por el agua
Disentería amibiana Disentería bacilar Gastroenteritis	Por el agua o por el agua para el aseo personal
Ascariasis Conjuntivitis Enfermedades diarréicas Lepra Sarna Sepsis y úlceras de la piel Tiña Tracoma	Por el agua para aseo
Gusano de Guinea Esquistosomiasis	Desarrolladas en el agua
Paludismo Oncoercosis Enfermedad del sueño Fiebre amarilla Dengue	Insectos vectores relacionados con el agua

1.5 MODO DE TRANSMISION

En 1546 el científico italiano Fracasoro, investigador de las muertes por plaga bubónica llega a una conclusión en el modo de transmisión de las infecciones, expresando que la transmisión involucra el transporte de un agente infeccioso de un reservorio a un hospedero, este es el más importante eslabón en la cadena de la infección. En 1850, el Dr. Snow estableció la transmisión de enfermedades microbianas a través del agua, por ejemplo el cólera.

Tabla 2. Agentes patógenos causantes de enfermedades bacterianas.^{2, 3, 15}

Agente bacterial	Enfermedad principal	Reservorio principal	Sitio afectado
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Salmonella paratyphi</i>	Fiebre paratifoidea	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Shigella</i>	Disentería bacilar	Heces humanas	Intestino delgado bajo
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	Gastroenteritis	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis	Heces humanas/animales	Tracto gastrointestinal
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	Heces humanas/animales	Tracto gastrointestinal
<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedad aguda respiratoria	Aguas termales	Pulmones
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	Exudado respiratorio humano	Pulmones
<i>Leptospira</i>	Leptospirosis (enfermedad de Weil)	Heces animales y orina	Generalizado
Bacterias oportunistas	Variable	Agua natural	Principalmente tracto gastrointestinal

Así, se llega a la conclusión de que los patógenos pueden ser transmitidos de un reservorio a un hospedero susceptible por varias rutas:

- Transmisión persona a persona (mano-mano, fecal-oral, sexual)
- Transmisión por agua
- Transmisión por alimentos
- Transmisión por aire (partículas)
- Transmisión por vectores (insectos)
- Transmisión por fomites^{3, 19}

En resumen, las bacterias son el grupo más importante en cuanto a frecuencia de detección en el agua y de epidemias de enfermedades registradas. Las enfermedades por bacterias más importantes están comúnmente asociadas con la contaminación fecal del agua. Un aspecto importante en el desarrollo de alguna enfermedad bacteriana transmitidas por el agua es el clima de la región, por ejemplo, en regiones templadas estas incluyen *Salmonella* (tifoidea y

paratifoidea), *Campylobacter*, *Shigella* (disenteria bacteriana), *Vibrio cholerae* (cólera), *Escherichia coli* (gastroenteritis) y *Mycobacterium* (tuberculosis), como se vio en la Tabla 2.¹

1.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PATÓGENOS

El aislamiento y la identificación de microorganismos patógenos individuales es complejo, siendo diferente para cada especie, y extremadamente lento. Estos microorganismos pueden no estar presentes en el agua todo el tiempo, y pueden estar presentes en un número muy pequeño. Por lo tanto, no se acostumbra examinar todas las muestras de agua de modo rutinario para determinar la presencia o ausencia de todos los patógenos. También, la selección de un patógeno en concreto puede ser engañoso ya que cada especie puede tolerar diferentes condiciones ambientales. Para examinar rutinariamente los suministros de agua se requiere una prueba rápida y sencilla. Es muy importante examinar los suministros de agua por medio de una sencilla prueba general que por una serie de prueba más complicadas, ya que la mayoría de los casos de contaminación de los suministros de agua ocurre raramente. Esto ha llevado al desarrollo de la utilización de microorganismos indicadores para determinar la probabilidad en caso de contaminación por heces. Las características de un microorganismo indicador ideal son las siguientes

1. Puede ser un miembro de la microflora intestinal de animales de sangre caliente
2. Puede estar presente cuando los patógenos están presentes o ausentes en muestras no contaminadas.
3. Puede estar presente en mucho mayor número que el patógeno.
4. Que no se multiplique en el medio ambiente
5. Que sea detectable por métodos fáciles, rápidos y baratos.

6. El organismo indicador puede ser no patógeno por sí mismo.^{1,3}

Así, la protección de la salud pública requiere un indicador de población fecal, ya que las heces son la principal causa de contaminación del agua por bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales. En el año 1890, Theobald Smith propone a *Escherichia coli* como el indicador biológico de seguridad de los tratamientos del agua ya que forma parte de la flora de mamíferos, sustituyendo a otras pruebas para detectar “coliformes” que fueron desarrolladas y formaban parte de las regulaciones del agua potable.¹⁹

Los microorganismos no patógenos que están siempre presentes en el intestino de los humanos y animales se excretan junto con los patógenos, pero en mucho mayor número. Varios de estos son fácilmente aislables y son ideales para utilizarlos como indicadores de contaminación fecal. Las más ampliamente utilizadas son las bacterias no patógenas, en particular los coliformes, estreptococos fecales y los clostridios sulfato reductores. Estos tres grupos son capaces de sobrevivir durante diferentes periodos de tiempo en el medio acuático. Los estreptococos fecales mueren bastante rápidamente fuera del hospedero y su presencia es un indicador de una contaminación reciente. *Escherichia coli* (coliforme fecal) puede sobrevivir durante 4 a 12 semanas bajo condiciones ambientales y es fácilmente detectada que la otra bacteria indicadora. Debido a esto es la prueba de microorganismos más ampliamente utilizada, aunque otras bacterias son utilizadas para confirmar la contaminación fecal si no se detecta *Escherichia coli*.^{1,19}

Entonces la bacteria que más satisface ese criterio es *Escherichia coli*. Este es un miembro del grupo de los coliformes. El grupo coliforme comprende todos los aerobios y anaerobios facultativos Gram negativo, no esporulados, forma cocobacilar que fermenta la lactosa con formación de gas a las 24 hrs de incubación a 37°C. No siempre todos los coliformes provienen de las heces

humanas, el conteo total de coliformes es usado como un índice de población. Los coliformes totales incluyen un amplio rango de microorganismos que pueden no tener su fuente primaria en el tracto intestinal. Esto es razonado si muchos coliformes están presentes en una muestra de agua dada, entonces esto puede enmascarar a los patógenos entéricos que también pueden estar presentes.^{15, 19}

1.7 DETERMINACION DEL NUMERO DE BACTERIAS EN UNA MUESTRA DE AGUA

El análisis bacteriológico del agua es vital en la prevención de epidemias como resultado de la contaminación del agua. El examen bacteriológico de abastecimientos de agua no implica la búsqueda directa de los gérmenes patógenos. El examen bacteriológico del agua usualmente involucra dos ensayos, la estimación del número de bacterias de acuerdo con el conteo total en placa y la determinación más significativa, de la presencia o ausencia de miembros del grupo coliforme. Los coliformes se cuentan en el agua potable para determinar su calidad y se realiza por dos diferentes técnicas. El primero de esos es más cualitativo en el que el Número Más Probable (NMP) de coliformes es determinado por el uso de caldo lactosado o caldo lauril triptosa en tubos de fermentación. La segunda técnica estándar para medir la densidad de coliformes en el agua es la técnica de filtración por membrana, la cual tiene un valor más cuantitativo. Ambas técnicas siguen las recomendaciones de la American Public Health Association en su *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.^{3, 15}

La cuenta de coliformes totales es una medida de todos los coliformes presentes. Las escherichias son exclusivamente fecales en origen y están presentes en las heces frescas en un número superior a 10^9 /gramo. Los otros

coliformes son normalmente habitantes del suelo y aguas aunque pueden también aparecer en las heces. La presencia de coliformes en el agua potable no implica que haya contaminación fecal, aunque en la práctica se asume que los coliformes son de origen fecal a no ser que se pruebe de otra manera. Por lo tanto es importante confirmar si *Escherichia coli* está presente. Esto se hace conjuntamente con la cuenta de coliformes. En la practica se informa de dos cuentas de coliformes: la cuenta de los coliformes totales y la cuenta de coliformes fecales (*Escherichia coli*).^{1, 19}

Se ha resumido la interpretación de los resultados de coliformes como sigue: <<Donde está presente *Escherichia coli* en gran número, la conclusión es que ha ocurrido una fuerte y reciente contaminación por aguas residuales humanas o animales. Si el número de *Escherichia coli* es bajo, esto se interpreta como que la contaminación del mismo origen es tanto reciente o menos severa. Si se observan coliformes sin *Escherichia coli* la indicación es que la contaminación es tanto reciente y de origen no fecal o remota y de origen fecal tal que los coliformes fecales no ha sobrevivido. No obstante, si se encuentra cualquier coliforme en un suministro de agua potable tratada, seguida de cloración, se debe concluir que o se está aplicando un tratamiento inadecuado o que la contaminación se ha introducido durante la distribución del agua, o en la toma y/o manejo de la muestra. Cualquier indicación de contaminación, por ligera que sea, debe ser considerada como materia grave y las circunstancias investigadas inmediatamente>>.¹

En muchas situaciones es necesario calcular la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de agua, así la estimación del número de bacterias vivas (recuento celular viable) en una muestra de agua se obtiene con un conteo de placa y con el uso de un medio nutritivo de agar. Una muestra de 1 ml del agua, diluida si es necesario, se mezcla con agar a 40°C en una caja Petri. El agar

se solidifica como gelatina y fija así las células bacterianas en posición. Entonces la placa se incuba en condiciones apropiadas a 24 horas a 37°C para bacterias que provienen del hombre o de animales. Al final del periodo de incubación las bacterias habrán producido colonias visibles a simple vista y se supone que el número de colonias es una función de las células viables en la muestra original.

Para determinar la presencia de un género particular o especie de bacteria es necesario observar como se comporta en un medio especial o en condiciones óptimas de incubación, y que sean adecuados únicamente para la bacteria que se investiga. Como se mencionó anteriormente, muchas enfermedades graves están relacionadas con la contaminación microbiológica del agua, contaminación que se debe en su mayoría a bacterias patógenas excretadas por gente que sufre o porta la enfermedad. Aún cuando es posible examinar el agua para detectar la presencia de un patógeno específico, una prueba más sensible emplea como microorganismo indicador la bacteria *Escherichia coli*, que es un habitante normal del intestino humano y que se excreta en grandes cantidades. Su presencia en el agua indica contaminación por excreta y la muestra se clasifica como potencialmente peligrosa pues también podrían estar presentes bacterias fecales patógenas. Las bacterias coliformes en general tienen la capacidad de fermentar la lactosa, fermentación que produce ácido y gas. La detección de coliformes se efectúa por medio de lactosa (caldo de MacConkey) con diluciones de diferente concentración que se inoculan con la muestra. La aparición de ácido y gas después de 24 horas de incubación a 37 °C, se toma como indicación positiva de la presencia de bacterias coliformes; con la ayuda de tablas estadísticas el resultado se expresa como el Número Más Probable/100 ml. Para comprobar positivamente la presencia de *Escherichia coli*, se subcultivan tubos positivos en un medio fresco por 24 horas a 44°C, en cuyas condiciones sólo crece *Escherichia coli* para producir ácido y gas.^{2,4,15}

El método de conteo en placa es usado en las plantas de tratamiento de agua de acuerdo a las siguientes indicaciones:

1. Medición de la eficacia de los diferentes procesos del tratamiento. Incluyendo la desinfección.
2. Monitoreo de la calidad bacteriológica del agua final durante el almacenaje y distribución.
3. Determinación del crecimiento bacteriano en la superficie de materiales usados en el tratamiento y los sistemas de distribución.
4. Determinación del potencial de desarrollo o crecimiento posterior en el agua tratada en los sistemas de distribución.³

Así los métodos para la detección de *Escherichia coli* en el agua y otras muestras ambientales, ha cambiado muy poco en muchos años, principalmente basándose en la fermentación de la lactosa y la habilidad de muchas cepas de *Escherichia coli* para crecer a 44°C. Pero existen nuevos métodos para la detección de esta bacteria que pueden ser más rápidos, por ejemplo usando la enzima B-D-glucuronidasa, que es característica de estar presente en 95% de todas la *Escherichia coli* aisladas, o el uso de la PCR para identificar *Escherichia coli* basándonos en el gen *uidA* que codifica la B-D-glucuronidasa.^{18, 19}

Para detectar la enzima B-D-glucuronidasa se utiliza el caldo de cultivo lauril sulfato con 4-metilumbeliferil-B-D-glucuronido donde se inocula dicho medio con muestra y se incuba por 24 hrs a 35°C. La apariencia, bajo luz normal, de una muestra clara es indicadora de un resultado negativo para coliformes totales; la apariencia, bajo luz normal, de una muestra de color amarillo es indicadora de un resultado positivo para coliformes totales, y la fluorescencia, color azul bajo luz ultravioleta, es indicadora de un resultado positivo para coliformes totales y coliformes fecales.¹⁵

1.8 NORMAS OFICIALES MEXICANAS

En México se han publicado en el Diario Oficial de la Federación gran número de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en donde, algunas detallan aspectos importantes que el agua debe cumplir con ciertos parámetros establecidos por medio de un sin número de pruebas de laboratorio. Dichas Normas exigen que las compañías de suministro de agua potable brinden agua para uso y consumo humano libre de microorganismos patógenos a los consumidores y definen claramente que significa este y otros términos.^{6, 7, 8, 9}

La Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-201-SSA1-2000 tiene un grupo de estándares para el agua potable, donde las especificaciones sanitarias del agua potable expresan que se considera de buena calidad cuando no se detectan coliformes totales ni fecales.^{6, 8, 9}

1.9 ESTANDARES REVISADOS POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)

Las normas de la OMS para el agua potable son quizá los estándares más importantes relacionados a la calidad del agua. Se usan universalmente. Las normas originales se publicaron en dos volúmenes en 1984. El Volumen 1 es el de las normas, mientras que el Volumen 2 contiene las evidencias científicas sobre las cuales se basan las recomendaciones del Volumen 1. Las normas existentes se basan en las evidencias toxicológicas disponibles hasta 1987, con una últimas nuevas normas añadidas en Ginebra en septiembre de 1992. Las nuevas normas incluyen parámetros microbiológicos (Tabla 3), químicos y radiológicos. Los parámetros químicos incluyen 17 inorgánicos, 27 orgánicos, 33 pesticidas y 17 desinfectantes y subproductos asociados.

Las normas microbiológicas están todavía basadas en la *Escherichia coli* o en coliformes termorresistentes como indicadores de la contaminación fecal. Se

recomienda coliformes totales solamente como indicadores de la eficiencia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución, no como indicador de la presencia o ausencia de patógenos. No se han establecido valores guía para virus, protozoos o bacterias patógenas específicas debido a la ausencia de métodos analíticos adecuados para el trabajo rutinario.¹

Tabla 3. Valores guía del agua potable por la OMS para la calidad bacteriológica del agua potable.^{12, 15}

Microorganismos	Norma
Todas las aguas destinadas para consumo <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes	No detectables en ninguna muestra de 100 ml
Agua tratada entrando en el sistema de distribución <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes	No detectables en ninguna muestra de 100 ml
Bacterias coliformes totales	No detectables en ninguna muestra de 100 ml
Agua tratada en el sistema de distribución <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes	No detectables en ninguna muestra de 100 ml
Bacterias coliformes totales	No detectables en ninguna muestra de 100 ml. En el caso de grandes suministros donde se examinan suficientes muestras, no deben estar presentes en el 95% de la muestra tomadas durante cualquier periodo de 12 meses.
Agua embotellada Bacterias coliformes fecales	No detectables en ninguna muestra de 100 ml
Bacterias coliformes	No detectables en ninguna muestra de 100 ml

1.10 CARACTERISTICAS DEL AGUA POTABLE

El análisis bacteriológico de los abastecimientos de agua es el parámetro de calidad más sensible. En el caso del agua para uso potable, es práctica común evaluar su calidad en relación con lineamientos o normas específicas.⁷

Como la formulación de tales valores guía se requiere la evaluación crítica de las propiedades de los diferentes constituyentes, y es común que se les clasifique en cinco grupos.

1. **Parámetros organolépticos:** sus características son rápidamente aparentes para el consumidor pero tiene poco significado para la salud, por ejemplo, color, turbiedad, sabor y olor.
2. **Parámetros fisicoquímicos:** son las características normales del agua, tal como pH, conductividad, sólidos totales, alcalinidad, dureza, oxígeno disuelto, etc. Algunos de estos parámetros tienen importancia para la salud, pero el objetivo es evitar el abastecimiento de agua excesivamente desbalanceada.
3. **Sustancias indeseables en cantidades excesivas:** este grupo incluye una amplia variedad de sustancias; algunas son directamente dañinas en altas concentraciones, otras causan problemas de sabor y olor y otras pueden no ser problemáticas por ellas mismas. En este grupo se incluyen: nitrato, fluoruro, fenol, hierro, manganeso, cloruro, carbono orgánico total.
4. **Sustancias tóxicas:** una amplia variedad de sustancias inorgánicas y orgánicas pueden tener efectos tóxicos sobre el hombre; la severidad de los efectos de un material particular depende de la dosis recibida, el periodo de exposición y otros factores ambientales.
5. **Parámetros microbiológicos:** en la mayor parte del mundo estos parámetros son los más importantes para determinar la calidad del agua potable. Las normas de calidad microbiológica se basan esencialmente en asegurar la ausencia de bacterias indicadoras de contaminación por desechos humanos.²

1.11 TIPOS DE AGENTES INFECCIOSOS

La evaluación del agente infeccioso se basa en su virulencia o su potencial para causar enfermedad en humanos. La virulencia es relacionada con la dosis

del agente infeccioso necesaria para infectar al hospedero y causar la enfermedad. El potencial de causar la enfermedad también depende de la estabilidad del agente infeccioso en el medio ambiente. La Dosis Mínima Infecciosa (DMI) varía dependiendo del tipo de patógeno o parásito. Por ejemplo para *Salmonella typhi* o *Escherichia coli* son necesarios de miles a millones de microorganismos para establecer la infección, mientras que la DMI de *Shigella* puede ser tan baja como 10 microorganismos. Unos pocos quistes de protozoarios o huevos de helmintos pueden ser suficiente para establecer la infección. Para algunos virus, solo unas pocas partículas virales son suficientes para infectar al individuo, por ejemplo se necesitan de 1 a 10 UFP del virus de la hepatitis A para causar la enfermedad (Tabla 4).³

Tabla 4. Dosis Mínima Infecciosa para algunos patógenos y parásitos.³

Microorganismo	Dosis Mínima Infecciosa
<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁴ a 10 ⁷
<i>Shigella</i> spp.	10 ¹ a 10 ²
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁶ a 10 ⁸
<i>Vibrio cholerae</i>	10 ³
<i>Giardia lamblia</i>	10 ¹ a 10 ² quistes
<i>Cryptosporidium</i>	10 ¹ quistes
<i>Entamoeba coli</i>	10 ¹ quistes
<i>Ascaris</i>	1-10 huevos
Hepatitis A	1-10 UFP

1.12 OZONO

El ozono se conoce desde hace más de cien años, he aquí una pequeña reseña sobre la historia del ozono:

1785 von Marum describe un olor característico en una máquina electrostática.

1801 Cruikshank percibe el mismo olor en un ánodo.

1840 Schoenbein le da el nombre de ozono por la palabra griega "ozein" que significa "heder, oler".

1857 Werner von Siemens diseña un generador de ozono, de tipo dieléctrico.

1893 Oudshoorn, se construye la primera planta de Holanda.

1906 Niza, Francia, planta Bon Voyage, "lugar de nacimiento de la planta de tratamiento de agua por ozonización".²¹

Así, el ozono (O_3) es una forma alotrópica del oxígeno que se produce al pasar oxígeno seco o aire a través de electrodos separados que producen una descarga eléctrica (5000 a 20 000 V, 50 a 500 Hz) y se forma cuando se unen tres átomos de oxígeno.

Es un gas azul inestable y con un olor picante de heno recién cortado. Es un poderoso agente oxidante así como un desinfectante. Es útil en el blanqueado del color y en la remoción de sabores y olores. Como el oxígeno, el ozono es ligeramente soluble en el agua debido a su forma inestable. A menos que se disponga de energía barata, el tratamiento con ozono es mucho más caro que la cloración. En estas circunstancias, el filtrado y la ozonización pueden producir agua similar a la producida por una planta más compleja de coagulación, sedimentación, filtración y cloración. Este hecho, junto con la insistencia de los consumidores de recibir agua potable sin sabor ni olor, apunta al uso del ozono ya que no sólo desinfecta sino que también reduce el color y olor mediante la oxidación de las sustancias orgánicas que se encuentran en el agua.^{1, 14, 15, 24, 21}

Un tipo de ozonizador es el tipo de placa con electrodos planos y dieléctricos de vidrio. El aire pasa entre los electrodos y se ozoniza por la descarga a través del espacio por donde pasa el aire. La producción de ozono es normalmente de 1% a 4% cuando se utiliza aire, cuando se utiliza oxígeno el porcentaje de producción de ozono está entre 4% y 12%, con una demanda de energía de 25 kWh/kg de ozono producido.^{2, 3, 21}

El ozono, al ser una molécula de tres átomos de oxígeno, el átomo de oxígeno extra hace que éste sea un oxidante muy energético, de aquí sus

propiedades de oxidación muy potentes y tiende a utilizarse donde el agua natural contiene materiales que podrían combinarse con el cloro para originar sabores y olores desagradables. El ozono, que frecuentemente se utiliza en combinación con el carbón activo, puede eliminar todas las bacterias en dosis de 1 ppm cada 10 minutos, y también puede reducir el color, sabor y olor. Además de ser más caro que la cloración y de que debe ser producido *in situ*, la falta de acción residual de desinfección en las tuberías de distribución son sus principales desventajas. Esto permite el desarrollo biológico que origina los problemas de sabor y olor. Por lo tanto después de la ozonización se realiza una cloración a bajo nivel para prevenir el crecimiento.^{1, 3, 10, 15, 24}

El ozono fue primero introducido como un fuerte agente oxidante para remover olor, color y sabor de la agua. La primera planta de tratamiento que uso ozono tiene sus inicios en Nice, Francia. Este oxidante es ahora usado como un desinfectante primario para inactivar microorganismos patógenos y para la oxidación de hierro y manganeso, compuestos causantes de sabor, olor, color, y precursores de trihalometanos, además de que sirve como floculante, haciendo que sólidos totalmente disueltos, se precipiten y puedan ser eliminados por el proceso de filtración.^{3, 21, 24}

En los Estados Unidos de Norteamérica más de 40 plantas de tratamiento usan ozono más como un oxidante que como un desinfectante. El ozono puede ser aplicado a varios puntos de una planta de tratamiento convencional, dependiendo del uso final del agua. Su efectividad como un desinfectante no es controlada por el pH, y no interactúa con el amoniaco.^{3, 24}

Así, después de ver los beneficios que puede tener el ozono, ¿por qué no hay más plantas que usen ozono? La sencilla razón es que la industria del agua siempre ha estado preocupada por los costos y ha tratado de proporcionar agua al costo más bajo posible y el cloro es el desinfectante menos costoso.^{15, 21, 25}

1.13 OZONO VS. CLORO

Aquí analizamos un enfrentamiento ozono/cloro, dado que es el cloro el elemento más usado como agente en la desinfección del agua potable en todo el mundo. En general, ambos elementos realizan la misma misión: tratamiento del agua por oxidación química (destrucción de microorganismos patógenos).

En esta etapa del tratamiento por oxidación se han venido utilizando como elementos desinfectantes el cloro, bromo, yodo, ozono, permanganato potásico e incluso agua oxigenada. De todos ellos, tan sólo se ha generalizado a nivel mundial el cloro y sus compuestos. Ahora bien, es evidente que el olor y sabor que permanecen después del tratamiento del agua con cloro son desagradables, e incluso puede resultar nocivo para la salud. El ozono, dado que es el mayor oxidante conocido después del flúor, es más rápido en su actuación, pero además es inodoro e insípido, además, el ozono es el oxidante más potente que puede producirse industrialmente de forma económica.

Especialmente estos últimos años se viene cuestionando la validez del cloro como desinfectante de aguas potables, no por su reconocido poder bactericida, sino debido a la formación de compuestos indeseables en las aguas cloradas:

1. Si las aguas a tratar contienen nitrógeno orgánico o amoníaco libre, se forman cloraminas que producen olores en el agua. Se analiza la posibilidad de que sean agentes cancerígenos.
2. Si las aguas contienen pequeñas cantidades de fenoles se forman, por adición de cloro los denominados clorofenoles que producen en el agua olores y sabores medicamentosos tan desagradables, que a concentración de 0.01 mg/l la hacen inaceptable para el consumo.
3. Pero sin duda, el mayor inconveniente es la formación de compuestos clorados tales como los bifenilos policlorados que tienen un probado carácter

cancerígeno, y cada vez son más frecuentes si el agua es portadora de materia orgánica adecuada.

4. Mención especial merece los trihalometanos (THM) que últimamente están preocupando a las Autoridades Sanitarias de la mayoría de los países. Se forman con algunas sustancias orgánicas, por esto son compuestos orgánicos potencialmente cancerígenos (el más importante a considerar es el cloroformo), y que aparecen en el agua potable tras ser sometida a cloración. En España, son muchas las ciudades con límites de THM tolerables pero preocupantes.^{15, 25}

El ozono, al actuar sobre los productos que originan los THM, realiza la función desinfectante sin este inconveniente y no existen THM como producto de la desinfección.

Frente a estos inconvenientes del cloro, el ozono no sólo no forma productos que pueden considerarse como cancerígenos, ni produce sabores u olores al agua, sino que elimina las posibilidades cancerígenas y elimina los sabores y olores del agua.

Durante años se han realizado numerosos trabajos para establecer el poder relativo del cloro y el ozono en la destrucción de bacterias y virus, llegando a la conclusión de que el ozono es mucho más eficaz y rápido que el cloro, ya que el poder de desinfección de éste es de 300 a 3000 veces más rápido en comparación con el cloro.²⁵

1.14 EFECTOS DEL OZONO EN MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATOGENICOS

Como se ha venido mencionado, el ozono es un oxidante más poderoso que el cloro. El umbral de la concentración de ozono que inactiva a bacterias rápidamente es solo de 0.1 mg/l, ya que Bringman observó que 0.1 mg/l de cloro

requiere 4 horas para eliminar 6×10^4 células de *Escherichia coli* en agua, mientras que 0,1 mg/l de ozono necesita únicamente 5 segundos. Kessel encontró que para desinfectar agua que contiene virus de la poliomielitis con 1 mg/l de cloro se necesitaban 2 horas, y con sólo 0,05 mg/l de ozono bastaban únicamente 2 minutos.²⁵

El ozono aparece para ser el más efectivo contra rotavirus humano, más que el cloro, monocloramina, o dióxido de cloro. La concentración de ozono requerida para inactivar el 99.9% de enterovirus en agua (25°C, pH=7.0) en 10 minutos varía entre 0.05 y 0.6 mg/l. Como sea, algunos patógenos bacterianos (por ejemplo *Mycobacterium fortuitum*) son más resistentes que los virus al ozono. La resistencia de un número de microorganismos al ozono se ha encontrado que es la siguiente: *Mycobacterium fortuitum* > poliovirus tipo 1 > *Candida parapsilosis* > *Escherichia coli* > *Salmonella typhimurium*.³

Se necesitan altas dosis de ozono (5 mg/l) para que este tenga efecto en la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y se ayuda elevando la temperatura para que las paredes de los quistes se hagan permeables y pueda tener acceso el desinfectante.¹³

1.15 MECANISMO DE ACCION DEL OZONO

El ozono reacciona por dos rutas, oxidación directa por la molécula de ozono y la oxidación indirecta por el radical libre hidroxil, el cual es un oxidante aun más fuerte que el ozono. En medio acuoso el ozono produce radicales libres que inactiva a los microorganismos. El ozono afecta la permeabilidad, actividad enzimática, ADN de la bacteria, en donde los residuos guanina y/o timina aparecen para ser los blancos más susceptibles al ozono. El tratamiento con ozono conduce a la conversión de un plasmido circular cerrado de ADN (ccADN) de *Escherichia coli* a uno abierto (ocADN), fracciona las proteínas en

los residuos triptofano y da lugar a la formación de proteínas de diferentes aminoácidos y de diferentes pesos moleculares, y la reacción con los lípidos ocurre en los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos no saturados, produciendo diferentes productos tóxicos como el peróxido de hidrogeno, y aldehídos. El ozono inactiva los virus por daño en su ácido nucleico central. Las proteínas que los cubren también son afectadas, pero el daño a las proteínas puede ser mínimo y no afectar significativamente la absorción del virus a la célula.^{3, 14, 20}

1.16 USOS DEL OZONO

El principal uso del ozono es la desinfección del agua, y actualmente ésta característica se esta utilizando para purificar el agua de piscinas.

Debido a que es un poderoso agente oxidante es útil en el blanqueado del color y en la remoción de sabores y olores ya que no sólo desinfecta sino que también reduce el color y olor mediante la oxidación de las sustancias orgánicas que se encuentran en el agua.

También sirve para la oxidación de hierro y manganeso, compuestos orgánicos, y precursores de THM, además de que sirve como floculante, haciendo que sólidos totalmente disueltos, se precipiten y puedan ser eliminados por el proceso de filtración.^{1, 3, 14, 24, 21, 25}

Actualmente se ha cuestionado mucho los efectos nocivos del ozono en el organismo de los seres vivos y por el contrario se han desarrollado aplicaciones médicas denominadas ozonoterapias, siendo sus principales promotores investigadores de Europa Oriental, Italia y principalmente Cuba.

Se le ha dado uso en el tratamiento de agua para hemodiálisis, para protección del endotelio vascular (isquemia arterial subaguda, microvarices), para restauración de la actividad cardiaca después de la muerte clínica, para el

tratamiento de hepatitis B (daño hepatocelular), la epidermofitosis, Herpes-Zoster, artritis reumatoide, hiperlipidemias, SIDA, neoplasias malignas, neuritis ciática, hernia de disco intervertebral y osteomielitis, preclampsia, entre otras aplicaciones.

Dentro de las investigaciones para la aplicación del ozono, se ha desarrollado en la Habana Cuba y gracias al apoyo de algunas universidades de Italia, un compuesto llamado Oleozon, que consiste de aceite de girasol ozonizado, y a este se le atribuyen características bactericidas, ya que sé probó contra micobacterias, estafilococos, estreptococos, enterococos, *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, y los resultados son que las Micobacterias son más susceptibles al Oleozon que las otras bacterias utilizadas, además actualmente se esta estudiando la utilización del Oleozon contra trofozoitos de Giardia y contra *Candida*.^{20, 22, 23}

1.17 IMPORTANCIA DE LA SALUD PUBLICA DE LOS PRODUCTOS DEL OZONO

El ozono existe naturalmente en el ambiente. Probablemente las concentraciones a corto plazo más grandes ocurren cuando los rayos de las tormentas producen ozono. En las oficinas, el ozono se detecta cerca de las fotocopiadoras. Los soldadores están expuestos al ozono producido por el arco durante el proceso de soldadura. Y los residentes que viven en grandes urbes como Denver, Los Angeles, Ciudad de México, Bogotá, Caracas, São Paulo, etc., están expuestos a concentraciones de ozono entre 0,5 a 1,0 ppm cuando el escape de los automóviles e industrias reacciona con la luz solar.

Como el ozono es un oxidante fuerte, produce reacciones en el tejido humano, en particular en los pulmones, lo que perjudica la respiración. Los ojos y la nariz también se ven afectados. La Occupational Safety and Health

Administration (Administración de la Seguridad y Salud Ocupacional, OSHA) ha establecido los límites para los ambientes de trabajo que se presentan en el Cuadro 1.²¹

Cuadro 1. Exposición al ozono²¹

Exposición	Límites
Olor detectable	0.01-0.05 ppm
tos/irritación en 8 min.	1 ppm
tos/irritación en 1 min.	4 ppm
Límite OSHA 8 h	0.1 ppm
Límite OSHA 15 min.	0.3 ppm
Conc. mortal en < 1 min.	10 000 ppm

Los reglamentos para los subproductos de la desinfección en Europa y Estados Unidos y las pautas de organizaciones internacionales, como las de la OMS, obligan a las empresas de agua a reducir los THM en el agua potable, lo que en muchos casos hace imposible el uso continuo del cloro.

La preocupación por los subproductos de la desinfección, como los THM, hacen que el uso del cloro ya no sea una opción. Además, la inactivación de virus y otros microorganismos como el *Cryptosporidium* requeriría altas dosis de cloro que causarían mayores concentraciones de subproductos. Por consiguiente, la elección ideal es un desinfectante potente con bajos niveles de producción de subproductos. Comparado con otros desinfectantes como el cloro, cloraminas y el dióxido de cloro, el ozono es el desinfectante más potente y también el de más rápida acción.^{21, 25}

Se ha discutido la formación de compuestos mutagénicos/carcinógenos por la cloración del agua. Se conoce menos sobre el ozono para considerar sus productos. Los aldehídos son productos de importante consideración, pero su significado en la salud es aún desconocida. Recientes estudios presentan que el agua tratada con ozono a una dosis mayor de 3 mg/l puede presentar incremento

en mutagenicidad. Los compuestos mutagénicos pueden ser removidos por un tratamiento con carbón activado granular. Uno de los elementos que se puede considerar de importancia en la formación de subproductos del ozono es el bromo, por eso en sistemas de desinfección con ozono se debe controlar la concentración de bromato, por sus efectos sobre el riñón, el oído y el intestino. La USEPA ha establecido un límite de bromato de 0.01 mg/l. Además el ozono también reacciona con el bromo para formar bromoformo.^{3, 15, 25}

Cuando las aguas contienen bromuros se oxidan a bromatos, especialmente utilizando ozono o peróxido de hidrógeno. Aunque no está incluido en la Directiva del Agua Potable, el bromato se ha incluido en la normativa revisada de la OMS (1993) como un subproducto de desinfección. La formación de bromatos ocurrirá por tanto siempre que se utilice ozono para la desinfección, o durante la eliminación de pesticidas con carbón activo. La eliminación de bromuro después de la ozonización requeriría membranas de filtración y sería extremadamente costoso.^{1, 11, 15}

1.18 HIPÓTESIS

- **Si se comprueba la capacidad desinfectante que presenta el ozono bajo condiciones de laboratorio, entonces se podrá aplicar éste como un método de desinfección y purificación del agua en el hogar.**

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar la capacidad desinfectante del ozono

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 2.2.1 Comprobar la capacidad desinfectante que presenta el ozono en el agua**
- 2.2.2 Determinar la cantidad microbiológica que es capaz de eliminar el ozono en una muestra de agua utilizando como microorganismo de referencia a *Escherichia coli***
- 2.2.3 Determinar la cantidad de subproductos de la desinfección (Sustancias Activas al Azul de Metileno) que produce el uso del equipo purificador en el agua**
- 2.2.4 Demostrar si el equipo cumple con las propiedades que le son atribuidas por el fabricante, bajo las condiciones de operación descritas por el mismo**

3. METODOLOGIA

3.1 Identificación de la bacteria

Para este trabajo se utilizó como microorganismo de prueba la bacteria *Escherichia coli* ATCC 11229, un excelente indicador de la presencia de contaminación fecal en las muestras de agua. Para obtener la cepa bacteriana, se transfirió una colonia a una caja Petri con agar MacConkey y se sembró en dilución y se incubó a 37°C por 24 hrs.

Después del periodo de incubación se obtuvo una colonia característica de *Escherichia coli* (colonia color rojo-rosada, lisa, convexa de bordes enteros) del agar MacConkey, y se sembró en un tubo con agar nutritivo inclinado, incubando a 37°C por 24 hrs. A partir de este tubo con la cepa purificada se procedió a realizar la identificación por medio de pruebas bioquímicas (Apéndice D). También se le realizó la tinción de Gram para observar su morfología.

3.2 Preparación del cultivo de referencia⁷

Después de la identificación se preparó el cultivo de referencia tomando una asada de la cepa purificada y se sembró en una caja Petri con agar nutritivo (I) y se incubó durante 24 horas a 37°C.

3.3 Preparación del subcultivo⁷

Posterior a las 24 horas de incubación, de la caja de agar nutritivo (I) se tomó una colonia del cultivo y se sembró en un tubo con agar nutritivo inclinado (II) y se incubó por 24 horas a 37°C.

3.4 Preparación de la suspensión de *Escherichia coli*⁷

La suspensión de *Escherichia coli* se preparó de la siguiente manera: al tubo con la bacteria desarrollada (II), se le adicionó con una pipeta estéril, 0.5 ml de solución salina al 0.85% estéril y se agitó suavemente en forma manual, rotando verticalmente el tubo entre las dos manos para obtener una suspensión bacteriana, la cual se transfirió a un tubo estéril.

Se ajustó la suspensión bacteriana con solución salina al 0.85% estéril igualándola al tubo No.1 del Nefelómetro (Tabla 5).

Tabla 5. Nefelómetro de McFarland ¹⁷

Tubo No.	UFC/ml
1	3×10^8
2	6×10^8
3	9×10^8
4	12×10^8
5	15×10^8
6	18×10^8
7	21×10^8
8	24×10^8
9	27×10^8
10	30×10^8

3.5 Preparación del agua de prueba⁷

Se preparó un volumen de 10 litros de agua libre de agentes bactericidas para operar el equipo purificador. Este volumen se inoculó con 1 ml de la suspensión de *Escherichia coli* preparada en el punto 3.4, cantidad requerida para alcanzar una concentración inicial de microorganismos coliformes mayor o igual a 240 NMP/100 ml, posteriormente se utilizaron cantidades mayores de bacteria para determinar la capacidad desinfectante del ozono.

Se estimó la concentración de microorganismos coliformes del agua de prueba por el método del sustrato cromogénico usando caldo lauril sulfato con 4-

metilumbeliferil-B-D-glucuronido (MUG) determinando el NMP/100 ml por el método de tubos múltiples.

3.6 Desarrollo de la prueba

Después de inocular los 10 litros de agua se agito por 30 segundos para homogeneizar el agua y la muestra. Después de esto se siguieron las instrucciones del equipo purificador que fueron colocar la manguera dosificadora de ozono que trae el equipo (previamente desinfectada) dentro del agua de prueba, se encendió el equipo y la adición del ozono al agua se hizo instantáneamente (se observa un burbujeo dentro del agua), el tiempo de operación del equipo esta programado (aproximadamente 16 minutos) y una vez transcurrido este tiempo el equipo se detiene automáticamente. Acabado el tiempo de operación del equipo se dejó reposar el agua por 10 minutos para eliminar el ozono residual que pudiese haber quedado en el agua, para posteriormente realizar las pruebas microbiológicas.

3.7 Toma de muestra

Se tomaron muestras del agua antes de poner en funcionamiento el equipo para determinar las UFC/100 ml por el método de vaciado en placa (en agar y placas Petrifilm[®]) y el NMP/100 ml por el método de tubos múltiples con el método del sustrato cromogénico.

Después del tratamiento con el equipo purificador, se volvieron a tomar muestras del agua para determinar la concentración de microorganismos por los dos métodos mencionados anteriormente y comprobar hasta que grado había reducido la cantidad de bacterias.

3.8 Procedimiento para el recuento en placa⁴

1. Se marcaron tres cajas Petri estériles y sin agar para cada una de las siguientes diluciones: 0, 10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3} . También se marcaron 3 botellas que contenían 90 ml de solución salina al 0.85% estéril con las siguientes diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3} .
2. En un área estéril se realizó la dilución inicial transfiriendo 10 ml de la muestra inicial del agua de prueba con una pipeta estéril en la primera botella marcada con la dilución 10^{-1} .
3. La botella con la dilución 10^{-1} se agitó para distribuir uniformemente la bacteria.
4. Inmediatamente de esta primera botella se transfirieron nuevamente 10 ml con otra pipeta de 10 ml limpia y estéril a la segunda botella marcada con la dilución 10^{-2} , se tapo la botella.
5. Se agitó esta segunda botella y se transfirieron nuevamente 10 ml con otra pipeta de 10 ml limpia y estéril de esta segunda botella a la tercera botella. Esta representa la dilución 10^{-3} de la muestra original. Se tapo y se agito para homogeneizar la muestra.
6. Una vez preparadas las diluciones de la muestra original se procedió a realizar la prueba de vaciado en placa para determinar la cantidad de bacterias viables presentes en la muestra. Para esto se tomo 1 ml de la muestra original y se colocaron en la caja Petri marcada con 0 (muestra sin ninguna dilución). Para las diluciones de la muestra original, se realizo el mismo procedimiento colocando 1 ml de cada una de las diluciones en su correspondiente caja marcada. Todo esto se realizó por triplicado, teniendo así, 3 cajas de la dilución 0, 3 de la dilución 10^{-1} , 3 para 10^{-2} y 3 para 10^{-3} .
7. Se prepararon 12 tubos con tapa de rosca que contenia 20 ml de agar MacConkey cada uno, previamente esterilizado de acuerdo a las indicaciones

del marbete del frasco (un tubo por cada caja inoculada). Los tubos se mantuvieron en baño maría a 40°C para conservar el agar en estado líquido. Cuidadosamente se quitó la tapa de cada una de las cajas con las diluciones de la muestra y aseptícamente se colocó el agar dentro de la misma. El agar y la muestra son inmediatamente mezclados por movimientos suaves haciendo una figura de 8 para homogeneizar la muestra y el agar en la caja. Se repitió este proceso para todas las placas restantes.

8. Una vez que ha gelificado el agar, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por 24 horas.
9. Al final del periodo de incubación, se seleccionaron las cajas que contenían entre 25 y 250 colonias. Las placas con más de 250 colonias no pueden ser contadas y son designadas como “Incontables”.
10. El conteo de las UFC/ml que se encontraban al inicio de la prueba se comparó con el número de UFC/ml contadas después del proceso de desinfección del agua con el ozono, y con ambos resultados se calculó el porcentaje de reducción bacteriana que es capaz de realizar el equipo purificador.

Un método relativamente nuevo para la enumeración de microorganismos es el uso de placas Petrifilm[®] (placas para recuento de coliformes de 3M[®]), en donde el agar seco de la placa se rehidrató con 1 ml de la muestra, como lo indica el instructivo de las mismas. El procedimiento fue el mismo que se utilizó con las cajas Petri, pues de cada dilución de la muestra y de la muestra original, se colocó 1 ml a cada placa (cada placa se realizó por triplicado). Así para la muestra original se colocó 1 ml en una placa, repitiendo este paso dos veces más y marcando las placas con 0 (como se realizó en las cajas Petri), de la dilución 10⁻¹ se tomó 1 ml y también se colocó en una placa, repitiendo este paso en dos ocasiones más y marcando las placas con la dilución correspondiente. Así se

realizo este mismo procedimiento para la dilución restante. Para transferir el mililitro de la muestra se utilizó una pipeta limpia y estéril de 1 ml para cada una de las diluciones. Después de inocular y marcar las placas, se colocaron en incubación a 37°C por 24 horas colocando un frasco con agua para evitar la deshidratación de las placas en la estufa. Para la lectura de las mismas, se tomó el mismo criterio que para las cajas Petri seleccionando las placas que contenían entre 25 y 250 colonias para estimar la cantidad de bacterias viables en el agua antes y después del tratamiento de desinfección.

La otra prueba que se realizó al agua de prueba para determinar el número de coliformes en la muestra de agua fue la determinación del NMP, esta prueba involucra una serie de múltiples tubos de fermentación con campana Durham.

En esta prueba, las mismas diluciones de la muestra de agua fueron adicionadas a caldo lauril sulfato con MUG en tubos de fermentación. Después de 24 hrs de incubación a 37°C, observamos a la bacteria capaz de fermentar la lactosa con la producción de gas además de la producción de fluorescencia por el sustrato cromogénico del medio. El caldo lauril sulfato con MUG es selectivo para bacterias Gram negativas.

Se hizo el conteo del número de tubos que presentaron gas en la campana Durham, además de los tubos que presentaban fluorescencia al ser expuestos a la luz ultravioleta, y este número de tubos es comparado con una tabla desarrollada por la American Public Health Association (Apéndice A). El número que se expresa en la tabla es el NMP de coliformes/100 ml de la muestra de agua.

3.9 Procedimiento para la determinación del NMP⁴

1. Mezclar las botellas que contienen el agua de muestra e inocular 5 tubos que contienen 9 ml de caldo lauril sulfato con 1 ml de la botella marcada con la dilución 10^{-1} , 5 tubos con 1 ml de la dilución 10^{-2} , y 5 tubos con 1 ml de la

dilución 10^{-3} . Cuidadosamente se mezcló el contenido de cada tubo sin voltear totalmente el tubo, solo colocando entre las manos y rotándolo lentamente (para evitar la entrada de aire a la campana Durham). Se marcó cada tubo con la dilución de muestra inoculada.

2. Se incubaron las tres series de tubos por 24 hrs a 37°C (5 de la dilución 10^{-1} , 5 de la dilución 10^{-2} y 5 de la dilución 10^{-3}).
3. Después de las 24 horas de incubación se realizó la lectura de todos los tubos. La formación de gas era indicativo de la presencia de *Escherichia coli*, en este caso esta técnica se utilizó solamente para enumerar la cantidad de coliformes antes y después del tratamiento del agua con el equipo purificador para determinar si el ozono es capaz de desinfectar el agua contaminada. La ausencia de gas después de 24 hrs era indicativo de una prueba negativa. Además de la formación de gas podemos detectar la presencia de la enzima B-D-glucuronidasa, que hidroliza el sustrato MUG y produce fluorescencia, que se determinó utilizando una lámpara de luz ultravioleta de onda larga (366 nm).
4. Para determinar el número de coliformes es necesario recurrir a una tabla para determinar el NMP/100 ml de microorganismos presentes en la muestra de acuerdo a los tubos positivos que presentaron formación de gas en la campana Durham y la presencia de fluorescencia en los mismos (Apéndice A).

3.10 Cálculos para determinar el porcentaje de reducción bacteriana⁷

Después de realizar el conteo de las UFC en todas las cajas, se determinó la cantidad de microorganismos coliformes (*Escherichia coli*) en el agua de prueba antes y después del tratamiento, obteniendo la media aritmética, para calcular el porcentaje de la reducción bacteriana, y así reportar si la potabilidad era aceptable de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%RBCT = \frac{(CT)_{APST} - (CT)_{APT}}{(CT)_{APST}} \times 100$$

En donde:

%RBCT.- Porcentaje en reducción bacteriana de microorganismos coliformes totales.

(CT)_{APST}.- Cuenta de microorganismos coliformes totales en UFC/ml de agua de prueba sin tratar.

(CT)_{APT}.- Cuenta de microorganismos coliformes totales en UFC/ml de agua de prueba tratada.

También se tomaron muestras de agua de la cisterna de una granja porcina y agua de riego junto a la misma para determinar la eficacia del aparato en la potabilización del agua en condiciones reales de contaminación, determinando el NMP de coliformes/100 ml y las UFC/100 ml, ambas pruebas antes y después del tratamiento con el ozono.

3.11 Determinación de subproductos de la desinfección con ozono⁶

La determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) se basa en la reacción de las sustancias aniónicas, incluyendo alquil sulfonatos, alquil sulfatos y alquil polietoxil sulfatos con el azul de metileno, que da lugar a la formación de una sal de coloración azul, soluble en cloroformo, y cuya intensidad de color es medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 650 nm.

Para la determinación de dichas sustancias se prepararon algunas soluciones (Apéndice B) para construir una curva estándar y después determinar la cantidad de SAAM del agua tratada con el equipo purificador para evaluar la cantidad de subproductos que produce el ozono durante la desinfección.

3.12 Preparación de la curva de calibración⁶

Se colocaron volúmenes de solución patrón de SDS (Tabla 6) en embudos de separación, y después se agregó agua hasta un volumen de 100 ml.

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración

Embudo	ml de solución patrón de SDS	µg de SDS
No. 1	0	Blanco
No. 2	1	10
No. 3	3	30
No. 4	5	50
No. 5	7	70
No. 6	9	90
No. 7	11	110
No. 8	13	130
No. 9	15	150
No. 10	20	200

3.13 Preparación de la muestra⁶

El volumen de la muestra de agua para ser analizada, se determinó de acuerdo con la concentración probable de SDS, según la Tabla 7. Asimismo, se efectuó una prueba testigo con 100 ml de agua destilada (blanco de muestras).

Tabla 7. Cantidad de muestra a tomar

Concentración esperada de SDS en mg/l	Muestra a tomar en ml
0.025 – 0.080	400
0.080 – 0.40	250
0.40 – 2	100
2 – 10	20
10 – 100	2

3.14 Extracción y desarrollo de color⁶

A cada uno de los embudos de separación que contienen las muestras, se adicionaron 3 gotas de solución indicadora de fenolftaleína a las soluciones estándar y muestras y se agregó suficiente solución de hidróxido de sodio 1 N para producir un color rosa. A esta solución rosa, se le adicionó solución diluida de ácido sulfúrico, en pequeñas cantidades hasta que el color rosa desapareciera.

Se agregaron 10 ml de cloroformo y 15 ml de la solución de azul de metileno. Se agitó durante 30 segundos y se dejó en reposo hasta la separación de las fases. Después se pasó la fase orgánica a un segundo embudo y se lavó el tubo de descarga del primero con un poco de cloroformo. Se repitió la extracción dos veces más, usando 10 ml de cloroformo en cada ocasión (si el color azul en la fase acuosa desaparecía, era necesario descartar la muestra y repetir la determinación utilizando un volumen menor de muestra). La transferencia de la fase orgánica al segundo embudo de separación se efectuó sólo hasta que las dos fases estaban completamente separadas.

Después se combinaron todos los extractos clorofórmicos en un segundo embudo de separación. Se agregaron 50 ml de solución de lavado y se agitó durante 30 segundos. Se dejó reposar y se transfirió la capa de cloroformo a un matraz aforado de 50 ml. Se repitió el lavado por dos veces empleando 10 ml de solución de lavado en cada ocasión. Se recogieron los lavados en el matraz aforado de 50 ml, y se aforó con cloroformo y se mezcló perfectamente.

3.15 Estandarización del método⁶

Se fijó la longitud de onda del espectrofotómetro a 650 nm de acuerdo con las instrucciones del manual de operación, y se ajustó el instrumento a 0 absorbancia con el blanco de solución estándar.

Se leyeron las soluciones estándar de menor a mayor concentración y se registraron tres lecturas de cada una de las muestras (la absorbancia debe medirse después de 15 minutos y antes de 30 minutos de haberse desarrollado el color, una vez transcurrido ese tiempo la solución ya no es estable).

Después se elaboró una curva estándar graficando el promedio de absorbancia para cada solución estándar en función de su concentración de μg de SDS, y se ajustó la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Se calculó la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen y se obtuvo la ecuación de la recta. Del mismo modo se leyeron las muestras y blanco de muestras

3.16 Cálculos para determinar la concentración de subproductos del ozono⁶

De la ecuación de la recta obtenida ($y = mx + b$), despejar x para obtener directamente los μg de SDS en la muestra, donde:

y = Absorbancia obtenida en la muestra analizada.

m = Pendiente (coeficiente de absortividad).

x = μg de SDS en la muestra obtenidos de la curva de calibración.

b = Ordenada al origen.

3.17 Expresión de resultados⁶

Se realizan los cálculos necesarios para que las unidades sean expresadas en:

mg/l de sustancias activas al azul de metileno

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de la bacteria

La tinción de Gram demostró que se trataba de un bacilo Gram negativo no esporulado, y los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria se presentan en la Tabla 8, en donde se muestran los datos obtenidos experimentalmente y el resultado que se reporta en la bibliografía, para así compararlos y confirmar que la bacteria utilizada fue *Escherichia coli*:

Tabla 8. Resultados de la identificación bacteriana

Prueba bioquímica	Resultados obtenidos	Resultados esperados ¹⁶
Catalasa	Positivo	Positivo
Indol	Positivo	Positivo
Citrato de Simmons	Negativo	Negativo
Agar Hierro Kigler	Acido/Acido	Acido/Acido
Producción de H ₂ S	Negativo	Negativo
Motilidad a 37°C	Positivo	Variable
Ureasa	Negativo	Negativo
Glucosa	Acidifica y produce gas	Acidifica
Lactosa	Acidifica y produce gas	Acidifica y produce gas
Sacarosa	Acidifica	Variable
Manitol	Acidifica	Acidifica
Ornitina	Positivo	Variable
ONPG	Positivo	Positivo
OF	Fermenta	Fermenta

4.2 Método de prueba para evaluar la eficacia en reducción bacteriana

Las UFC/ml del agua de prueba fueron contadas, antes y después de ozonizarla, se calculó el porcentaje de reducción bacteriana para determinar la potabilidad del agua y así comprobar la efectividad del ozono como desinfectante, para esto se utilizaron diferentes cantidades de bacteria. La primera prueba que se realizó fue ajustando el agua de prueba a una concentración de bacterias de aproximadamente 3×10^4 UFC/ml, y una vez que se

realizó el conteo se obtuvieron antes de ozonizar el agua una cantidad de 2.4×10^4 UFC/ml, y después de ozonizarla, la cantidad de bacterias se redujo a cero, pues no se encontró ninguna UFC en las cajas sembradas con el agua. Así se determinó el porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales (%RBCT) utilizando el número de UFC/ml encontradas antes y después del tratamiento para realizar el cálculo de acuerdo a la fórmula presentada en el punto 3.10 (Tabla A de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la primera prueba:

$$\%RBCT = \frac{24,800 - 0}{24,800} \times 100 = 100\%$$

Se utilizó un método comparativo con las placas Petrifilm[®] con agar MacConkey para realizar el mismo procedimiento anterior utilizando la misma agua de la primera prueba, y con este método se obtuvo que antes de ozonizar el agua se encontraban 2.8×10^4 UFC/ml y después del tratamiento la cuenta fue de cero bacterias en el agua.

Se determinó el %RBCT del mismo modo que se realizó anteriormente utilizando el número de UFC/ml encontradas antes y después del tratamiento (Tabla B de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la primera prueba:

$$\%RBCT = \frac{28,000 - 0}{28,000} \times 100 = 100\%$$

La segunda prueba se realizó ajustando una segunda cantidad de agua de prueba a una concentración de bacterias aproximadamente de 1.5×10^5 UFC/ml, y

una vez que se realizó el conteo se obtuvieron, antes de ozonizar el agua, una cantidad de 1.4×10^5 UFC/ml, y después de ozonizar la misma agua, la cantidad de bacterias encontradas fue de 5.8×10^2 UFC/ml. Así se determinó %RBCT utilizando el número de bacterias encontradas antes y después del tratamiento para realizar el cálculo de acuerdo a la fórmula presentada en el punto 3.10 (Tabla C de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la segunda prueba:

$$\%RBCT = \frac{140,000 - 580}{140,000} \times 100 = 99.58\%$$

Se realizó la misma técnica usando las placas Petrifilm[®] con agar MacConkey utilizando el agua de la segunda prueba, y con este método se obtuvo que antes de ozonizar el agua se encontraban 1.4×10^5 UFC/ml y después del tratamiento la cuenta fue de 6.2×10^2 UFC/ml.

Se determinó el %RBCT utilizando el número de UFC/ml encontradas antes y después del tratamiento como se ha venido haciendo (Tabla D de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la segunda prueba:

$$\%RBCT = \frac{143,000 - 620}{143,000} \times 100 = 99.56\%$$

La tercera prueba que se realizó fue ajustando una tercera cantidad de agua de prueba a una concentración de bacterias de aproximadamente 3×10^5 UFC/ml, en donde una vez que se realizó el conteo se obtuvieron, antes de ozonizar el agua, una cantidad de 2.4×10^5 UFC/ml, y después de ozonizar esa misma agua,

la cantidad de bacterias encontradas fue de 5.2×10^3 UFC/ml. Con estos resultados se determinó el %RBCT utilizando el número de bacterias encontradas antes y después del tratamiento para realizar el cálculo de acuerdo a la fórmula del punto 3.10 (Tabla E de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la tercera prueba:

$$\%RBCT = \frac{245,000 - 5,200}{245,000} \times 100 = 97.88\%$$

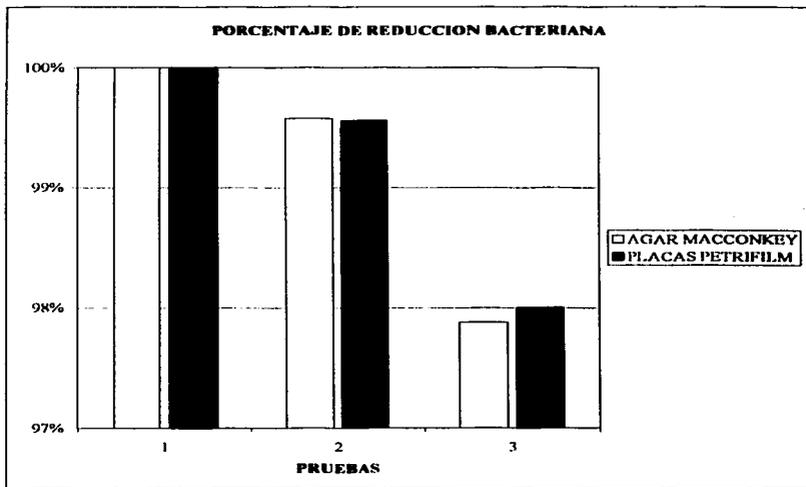
También se utilizaron las placas Petrifilm[®] con agar MacConkey para realizar el mismo procedimiento anterior utilizando el agua de la tercera prueba, y con este método se obtuvo que antes de ozonizar el agua se encontraban 2.8×10^5 UFC/ml y después del tratamiento la cuenta fue de 5.6×10^3 UFC/ml.

Con estos resultados se determinó el %RBCT utilizando la fórmula presentada en el punto 3.10 con el número de bacterias encontradas antes y después del tratamiento. Con este resultado se reporta si la potabilidad del agua es aceptable después del tratamiento con el equipo (Tabla F de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua en la tercera prueba:

$$\%RBCT = \frac{280,000 - 5,600}{280,000} \times 100 = 98.0\%$$

La Gráfica 1 representa los porcentajes de reducción bacteriana de coliformes totales (%RBCT), donde se exponen los resultados del método del conteo en placa de las UFC/ml en cajas Petri y las placas Petrifilm[®]. En esta gráfica se presentan las tres pruebas, cada una corresponde a diferentes cantidades de bacteria utilizada en la experimentación para comprobar la reducción bacteriana a diferentes concentraciones de bacterias y comprobar la capacidad desinfectante del ozono en el agua.



Gráfica 1. Porcentaje de Reducción Bacteriana de Coliformes Totales a diferentes concentraciones de *Escherichia coli*.

4.3 Método de prueba para determinar el NMP de coliformes totales en el agua de prueba

La otra prueba realizada al agua de prueba fue la determinación del NMP por el método de tubos múltiples utilizando caldo lauril sulfato con MUG para determinar la actividad enzimática de la bacteria por la formación de gas además de la producción de fluorescencia. Los resultados de la primera prueba (3×10^4 UFC/ml) que se realizó al agua de prueba sin tratar y agua de prueba tratada con el ozono (Tabla G de resultados en Apéndice E), fue que antes del tratamiento tenemos una cantidad de coliformes superior a 2400 coliformes/100 ml y después del tratamiento esta cantidad se redujo a menos de 2 coliformes/100 ml.

Los resultados de la segunda prueba (15×10^4 UFC/ml) se muestran en la Tabla H (Apéndice E de resultados), y en esta segunda prueba vemos que antes del tratamiento teníamos una cantidad de coliformes superior a 2400 coliformes/100 ml y después del tratamiento esta cantidad permaneció igual, ya que se encontró una cantidad de coliformes superior a los 2400 coliformes/100 ml. Debido a que esta es una prueba para estimar la cantidad de bacterias, el resultado máximo que se observa en la Tabla del Apéndice A, es de 2400 bacterias/100 ml, por lo tanto el resultado exacto no se puede determinar y se habla de una cantidad superior a los 2400 coliformes/100 ml.

La Tabla I (Apéndice E de resultados) muestra los resultados de la tercera prueba (3×10^5 UFC/ml). Así vemos que antes del tratamiento teníamos una cantidad de coliformes superior a 2400 coliformes/100 ml y después del tratamiento esta cantidad permaneció igual, con una cantidad de coliformes superior a los 2400/100 ml, aquí se considera el mismo criterio aplicado en la segunda prueba, por lo que no se puede determinar la cantidad real de bacterias presentes en el agua con esta prueba.

4.4 Método de prueba para evaluar la eficacia en reducción bacteriana y determinación del NMP de coliformes totales en el agua en condiciones reales de contaminación

Los resultados del agua que provenían de una cisterna y agua de riego son los siguientes: el agua de la cisterna no contenía bacterias, pues se trataba de agua potable que se utiliza para dar de beber a los animales de la granja, ya que en las placas Petri no hubo crecimiento alguno y los tubos del NMP no presentaron formación de gas en la campana ni fluorescencia, por lo que decimos que esta agua no contenía bacterias coliformes.

Ahora, el agua de riego si contenía bacterias coliformes, y los resultados de las UFC/ml antes del tratamiento fue de $1,2 \times 10^4$ UFC/ml y después del tratamiento el número de UFC/ml se redujo a cero. Así se determinó el porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales (%RBCT) utilizando el número de UFC/ml encontradas antes y después del tratamiento para realizar el cálculo de acuerdo a la fórmula presentada en el punto 3.10 (Tabla J de resultados en Apéndice E).

Porcentaje de reducción bacteriana de coliformes totales para determinar la potabilidad del agua de riego de la granja:

$$\%RBCT = \frac{11,800 - 0}{11,800} \times 100 = 100\%$$

La Tabla K del Apéndice E, muestra los resultados de la prueba de la determinación del NMP/100 ml que se le realizó al agua de riego de la granja, así vemos que antes del tratamiento el número de coliformes fue de 26/100 ml y después del tratamiento este número se redujo a menos de 2 coliformes /100 ml.

4.5 Determinación de subproductos de la desinfección con ozono

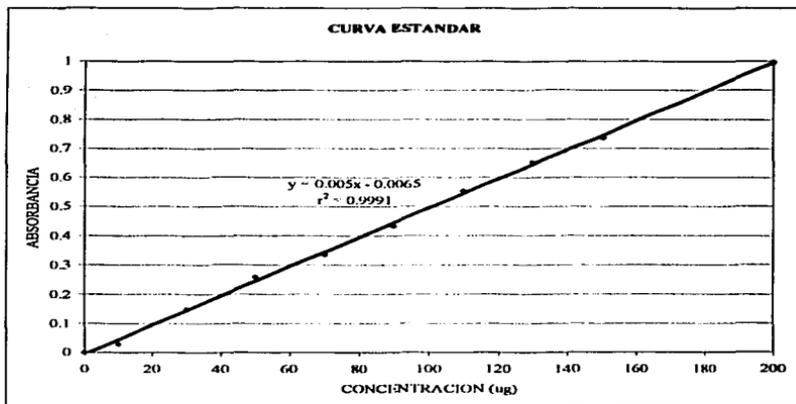
Para determinar los subproductos de la desinfección del agua con ozono (sustancias activas al azul de metileno) en la Tabla 9 se presentan las lecturas espectrofotométricas de las diferentes concentraciones de SDS en diferentes concentraciones conocidas para la construcción de una curva estándar (Gráfica 2), graficando el promedio de absorbancia para cada solución estándar en función de su concentración de μg de SDS. La curva de calibración obtenida se ajustó mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Se calculó la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen y se obtuvo la ecuación de la recta. Del mismo modo se leyeron las muestras y blanco de muestras (Tabla 10) y cada lectura se realizó por triplicado. Para determinar la concentración de subproductos que presenta el agua ozonizada se aplicó la fórmula especificada en el punto 3.16 y así se determinó la concentración de sustancias activas al azul de metileno.

Tabla 9. Lecturas de las concentraciones para la curva estándar.

Concentración de SDS en μg	Absorbancia promedio	Datos corregido
0	0	-0.0065
10	0.0294	0.0436
30	0.1479	0.1439
50	0.2593	0.2441
70	0.3360	0.3444
90	0.4328	0.4446
110	0.5530	0.5448
130	0.6517	0.6451
150	0.7380	0.7453
200	0.9972	0.9959

Tabla 10. Absorbancia de la muestra ozonizada

Muestra	Absorbancia	Promedio
1ª	0.015	0.0138
	0.011	
	0.016	
2ª	0.016	
	0.013	
	0.012	



Gráfica 2. Curva estándar para la determinación de sustancia activas al azul de metileno en el agua ozonizada para determinar la concentración de subproductos del agua.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Analizando los resultados se obtuvo la ecuación de la gráfica siendo la siguiente:

$$0.0138 = [(5.011 \times 10^{-3})(\mu\text{g de SDS en la muestra})] + (-6.487 \times 10^{-3})$$

despejando los μg de SDS tenemos:

$$\mu\text{g de SDS} = (0.0138 + 6.487 \times 10^{-3}) / 5.011 \times 10^{-3}$$

resolviendo tenemos como resultado:

4.047 μg de SDS en la muestra tratada (400 ml), ahora convirtiendo los μg a mg y los ml a un litro tenemos:

$$\frac{4.047 \mu\text{g}}{400 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ lt}} = 1.01 \times 10^{-2} \text{ mg/l}$$

Así, en el agua tratada con el ozono tenemos:

1.01×10^{-2} mg/l de sustancias activas al azul de metileno.

5. DISCUSION

El objetivo de los programas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano es asegurar que toda la población alcance o tenga una dotación adecuada de agua de buena calidad. En México no se han alcanzado estas metas, por esto gran parte de la población recurre a métodos domésticos dentro del hogar para resolver las deficiencias que puede presentar el agua suministrada en el Distrito Federal.

Los métodos en el hogar para purificar el agua de consumo humano, consisten en la utilización de equipos de tratamiento o la adición de sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud por las numerosas enfermedades gastrointestinales que estas ocasionan. Por esto, la Secretaria de Salud presenta las llamadas Normas Oficiales Mexicanas, en donde se detallan pruebas y disposiciones sanitarias y así evaluar ciertas características que deben cumplir los equipos de tratamiento para poder salir al mercado y así elevar la calidad del agua destinada al uso y consumo humano, además en estas Normas se detallan conceptos importantes y valores de referencia que deben cumplir dichos equipos cuando son evaluados.

Este trabajo presenta algunas pruebas realizadas a un nuevo equipo purificador de agua potable que actúa produciendo ozono, equipo llamado AQUAZON[®]. Ya que el ozono es un desinfectante muy poderoso y de aplicación reciente en el hogar, es necesario evaluar este nuevo equipo que puede ser de gran utilidad en los hogares para evitar enfermedades gastrointestinales transmitidas por el agua, que se presentan constantemente en la población mexicana.

Una de las principales pruebas para evaluar la eficiencia de este equipo, fue determinar el %RBCT para constatar que disminuyo el numero de bacterias en el agua tratada. Analizando los resultados obtenidos, vemos que el ozono es una buena alternativa en la desinfección del agua, además de otros usos que son de gran importancia y de reciente aplicación. En la primera prueba del AQUAZON®, cuando se utilizo la cantidad de 3×10^4 UFC/ml se comprobó la capacidad desinfectante del ozono, ya que después del tratamiento con el equipo la cantidad de microorganismos en el agua se redujo a cero es decir, una reducción bacteriana del 100%, lo que da como resultado agua potable para el consumidor.

Ahora, cuando se utilizaron las cantidades de bacteria de 1.5×10^5 UFC/ml y 3×10^5 UFC/ml, de la segunda y tercera prueba respectivamente, el %RBCT fue menor al 99.99%, con lo que se ve que una carga demasiado grande de bacteria en el agua no es eliminada totalmente por el ozono, dejando agua que no tiene una potabilidad aceptable, ya que solamente se considera de potabilidad aceptable si el %RBCT es igual o mayor a 99.99% para organismos coliformes totales, de acuerdo a las especificaciones de la NOM-180-SSA1-1998.

Lo anterior se comprobó, porque a la par se realizó la determinación del NMP, y los resultados obtenidos fueron muy similares, ya que cuando se utilizó la cantidad de bacteria inicial de 3×10^4 el NMP de coliformes antes de utilizar el equipo ozonizador fue $\geq 2400/100$ ml, y después del tratamiento el valor del NMP de microorganismos coliformes fue $< 2/100$ ml. En cambio cuando se utilizo más cantidad de bacteria (15×10^4 y 3×10^5) el NMP antes del tratamiento fue de ≥ 2400 NMP/100 ml en ambos casos y después del tratamiento esta cantidad permaneció igual; entonces vemos que el tratamiento produce agua de potabilidad aceptable cuando se utiliza una cantidad de bacteria de hasta 3×10^4 , en cambio cuando utilizamos una cantidad mayor de bacterias, el tratamiento no

es satisfactorio y el agua obtenida finalmente no sirve para consumo humano ya que contiene una cantidad de microorganismos patógenos muy por arriba del límite permitido de acuerdo a la NOM-041-SSA1-1993 y la PROY-NOM-201-SSA1-2000.

El método de identificación de coliformes con el sustrato cromogénico es una alternativa selectiva en la identificación de *Escherichia coli* utilizándose en la determinación del NMP. Anteriormente el medio utilizado para esta prueba contenía un carbohidrato y un indicador de pH, así la acidez del medio por la bacteria producía un cambio en el mismo, aunque hay muchas bacterias que llevan a cabo este proceso, por eso esta prueba se dividía en dos fases, la presuntiva y la confirmatoria, para verificar que en verdad se trataba de un coliforme fecal, sin en cambio con el método cromogénico se obtienen resultados más rápidos y precisos, ya que si el medio presenta fluorescencia, es común que se encuentra *Escherichia coli* en la muestra, porque esta bacteria es una de las únicas que tiene la enzima B-D-glucuronidasa capaz de hidrolizar el sustrato produciendo fluorescencia cuando el medio líquido es expuesto a la luz UV a una longitud de onda de 366 nm. Así la presencia de fluorescencia indica una respuesta positiva para *Escherichia coli*. Algunas *Shigella* spp también pueden producir una respuesta positiva, a pesar de que *Shigella* spp es reconocida como patógena humana, no está considerada para probar la calidad sanitaria del agua.

En cuanto a los posibles subproductos de la desinfección en el agua tratada con el ozono, vemos que se produce una cantidad muy por debajo del límite máximo permisible de SAAM ya que este límite es de 0.5 mg/l, de acuerdo a la NOM-180-SSA1-1998, y como resultado obtuvimos una concentración de 1.0×10^{-2} mg/l de SAAM, es decir, solamente el 2% del límite permisible, con lo que el equipo purificador cumple satisfactoriamente este requerimiento,

produciendo así agua libre de sustancias que puedan ser nocivas para el consumidor después del proceso de desinfección.

Ya que el ozono se consigue en forma natural y ecológica se producen resultados en el agua que no consigue ningún otro sistema, ya que mejora el sabor, color, y ataca microorganismos patógenos rápidamente. El ozono se utiliza hace mas de 100 años en Estados Unidos, y la EPA ha declarado el ozono como requisito esencial para la obtención de agua potable.

6. CONCLUSION

- 1.- Se logro comprobar la capacidad desinfectante del ozono.
- 2.- Cuando se ocupa cantidades mayores a 3×10^4 UFC/ml de *Escherichia coli* el porcentaje de reducción bacteriana disminuye y la potabilidad ya no es aceptable.
- 3.- La producción de subproductos de la desinfección por el ozono es insignificante, por lo que se considera seguro para utilizarse en el hogar para desinfectar el agua y dar así una mejor calidad al agua.
- 4.- El ozono debe ser producido *in situ*, y la falta de acción residual puede ser un inconveniente, sin embargo si el agua una vez desinfectada se encuentra en un lugar fresco y bien tapada, esta permanece purificada y libre de microorganismos patógenos por un periodo considerable.
- 5.- El AQUAZON[®] cumple con las características que le son atribuidas por el fabricante, ya que los resultados obtenidos en el laboratorio se encuentran en los límites microbiológicos requeridos, así como en la producción de subproductos de la desinfección.

7. APENDICES

APENDICE A

Indice del NMP para varias combinaciones de resultados positivos y negativos ⁴							
No. de tubos que dan reacción positiva en:				No. de tubos que dan reacción positiva en:			
5 tubos de 10 ml cada uno	5 tubos de 1 ml cada uno	5 tubos de 0.1 ml cada uno	Indice del NMP/100 ml	5 tubos de 10 ml cada uno	5 tubos de 1 ml cada uno	5 tubos de 0.1 ml cada uno	Indice del NMP/100 ml
0	0	0	<2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥2400

APENDICE B

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

1. Solución estándar de lauril sulfato (SDS, 10 mg/l): Para la preparación de la solución madre de SDS se pesa exactamente 1.0 g, se disuelve en agua y se afora a un volumen de un litro. Se mezcla suavemente para prevenir la formación de espuma. Es necesario preparar esta solución semanalmente y se almacena en refrigeración (se recomienda aforar solo cuando todo el SDS se haya disuelto y la espuma haya desaparecido). Después para preparar la solución estándar, de la solución madre se toman 10 ml y se afora a un litro con agua (10 mg/l). Esta solución se debe preparar diariamente.
2. Solución indicadora de fenolftaleína: Se disuelven 0.5 g de fenolftaleína en 50 ml de alcohol etílico, y se afora a un volumen de 100 ml con agua.
3. Solución de hidróxido de sodio 1 N: Se disuelven 40 g de NaOH en agua y se afora a un litro.
4. Solución de ácido sulfúrico 1 N: Se diluyen cuidadosamente 28 ml de H₂SO₄ concentrado en agua. Se deja enfriar y después se afora a un litro.
5. Reactivo azul de metileno (30 mg/l): Se disuelve 0.1 g de azul de metileno, en 100 ml de agua. De esta solución se transfieren 30 ml a un matraz volumétrico de un litro y se agregan 500 ml de agua, 6.8 ml de H₂SO₄ concentrado y 50 g de NaH₂PO₄·H₂O. Se agita hasta su completa disolución y se afora a un litro.
6. Solución de lavado: En un matraz volumétrico de un litro que debe tener 500 ml de agua, se agregan 6,8 ml H₂SO₄ concentrado y 50 g de NaH₂PO₄·H₂O. Se agita hasta su completa disolución y se afora a un litro.

APENDICE C

MATERIAL

- Equipo purificador. Se utilizó el equipo purificador de agua llamado AQUAZON
- Autoclave capaz de alcanzar temperatura de esterilización de $121 \pm 2^\circ\text{C}$
- Espectrofotómetro UV-Visible disponible para utilizarse a una longitud de onda de 650 nm y provisto de celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Balanza granataria
- Nefelómetro de McFarland
- Horno para esterilizar a $160 - 180^\circ\text{C}$
- Incubadora que opere a $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- Pipetas estériles de 1, 2, 5 y 10 ml de capacidad
- Tubos de cultivo con tapa de rosca
- Tubos de cultivo estériles con tapa de rosca
- Asas de platino
- Contador manual
- Cajas de Petri estériles de 100 x 15 mm
- Mecheros
- Embudos de separación de 500 ml
- Matraces aforados de 50, 100 y 1000 ml de capacidad
- Probeta de 50 y 100 ml
- Garrafón de vidrio con una capacidad de almacenamiento de 19 litros
- Campanas Durham
- Botellas de vidrio con tapa con una capacidad de 250 ml
- Baño maría
- Lámpara de luz UV con longitud de 254/366 nm

APENDICE D

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Por agua se entiende agua destilada.
- Fenolftaleina ($C_{20}H_{14}O_4$).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Alcohol etílico (C_6H_5O)
- Acido sulfúrico (H_2SO_4).
- Cloroformo grado espectrofotométrico ($CHCl_3$)
- Azul de metileno [$C_{16}H_{18}ClN_3S \times H_2O$ ($x=2-3$)].
- Fosfato monosódico dihidrogenado monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$).
- Solución salina al 0.85% estéril
- Lauril sulfato de sodio [Dodecilsulfato de sodio, SDS, ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)]

MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS

- Agar nutritivo
- Agar MacConkey
- Caldo lauril sulfato con 4-metilumbeliferil-B-D-glucuronido
- Placas Petrifilm[®] para recuento de coliformes (3M[®])
- Medio de SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad)
- Citrato de Simmons
- Agar Hierro Kigler
- Agar Urea de Christensen
- Caldo lactosado
- Glucosa
- Sacarosa
- Manitol
- Ornitina
- Medio OF (oxidación-fermentación)

APENDICE E

RESULTADOS DEL CONTEO DE LAS UFC.

Tabla A. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en agar MacConkey (Primera prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	0	0
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	0	0
10 ⁻²	248	24,800	0	0
10 ⁻³	22	22,000	0	0

Tabla B. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en placas Petrifilm[®] con agar MacConkey (Primera prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	0	0
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	0	0
10 ⁻²	Incontables	Incontables	0	0
10 ⁻³	28	28,000	0	0

Tabla C. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en agar MacConkey (Segunda prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	58	580
10 ⁻²	Incontables	Incontables	6	600
10 ⁻³	140	140,000	0	0

Tabla D. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en placas Petrifilm[®] con agar MacConkey (Segunda prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	62	620
10 ⁻²	Incontables	Incontables	9	900
10 ⁻³	143	143,000	0	0

Tabla E. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en agar MacConkey (Tercera prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻²	Incontables	Incontables	52	5,200
10 ⁻³	245	245,000	16	16,000

Tabla F. Determinación de las UFC/ml del agua de prueba antes y después del tratamiento en placas Petrifilm[®] con agar MacConkey (Tercera prueba)

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻¹	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 ⁻²	Incontables	Incontables	56	5,600
10 ⁻³	Incontables	Incontables	19	1,900
10 ⁻⁴	28	280,000		

Tabla G. Calculo del NMP/100 ml del agua de prueba antes y después del tratamiento (primera prueba)

Dilución	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 ml	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	0	5	0	≥2400	<2
10 ⁻²	5	0	5	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		

Tabla H. Calculo del NMP/100 ml del agua de prueba antes y después del tratamiento (segunda prueba)

Dilución	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 ml	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	5	5	5	≥2400	≥2400
10 ⁻²	5	5	5	5		
10 ⁻³	5	5	5	5		

Tabla I. Calculo del NMP/100 ml del agua de prueba antes y después del tratamiento (tercera prueba)

Dilución	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 ml	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	5	5	5	≥2400	≥2400
10 ⁻²	5	5	5	5		
10 ⁻³	5	5	5	5		

Tabla J. Conteo de las UFC/ml del agua de riego antes del tratamiento

Dilución	UFC/placa antes de ozonizar	UFC/ml de muestra	UFC/placa después de ozonizar	UFC/ml de muestra
Sin dilución	Incontables	Incontables	0	0
10^{-1}	Incontables	Incontables	0	0
10^{-2}	118	11,800	0	0
10^{-3}	6	6,000	0	0

Tabla K. Calculo del NMP/100 ml del agua de riego antes y después del tratamiento

Dilución	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 ml	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10^{-1}	4	0	0	0	26	<2
10^{-2}	2	0	0	0		
10^{-3}	1	0	0	0		

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gray, N. F. "Calidad del agua potable. Problemas y soluciones", Ed. Acribia, España, 1994, pp. 40, 41, 51, 99, 100, 101, 109, 110, 183, 189, 215-218, 221,222.
2. Tebbutt, T. H. "Fundamentos de control de la calidad del agua", 3ª edición, Ed. Limusa, México, 1999, pp. 50, 51, 55-58, 97, 177, 181, 182.
3. Bitton, Gabriel. "Wastewater microbiology", Ed. Wiley-Liss, USA, 1994, pp. 78-82, 101, 102, 107-110, 114, 115, 126-129.
4. Harley, John P. & Prescott, Lausing M. "Laboratory exercises in microbiology", WM. C. Brown Publishers, USA, 1990, pp. 36-38, 141-145.
5. Van der Leeden, Frits and Troise, Fred L. "The water encyclopedia", 2ª ed., Ed. Lewis Publishers, USA, 1991, pp. 29-31.
6. Secretaría de Salud. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-201-SSA1-2000. "Bienes y servicios. Agua y hielo para consumo humano, preenvasados y a granel. Especificaciones sanitarias". Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 52, 53, 81-84.
7. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-180-SSA1-1998. "Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Equipos de tratamiento de tipo domestico. Requisitos sanitarios". Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 34, 36-41.
8. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993. "Bienes y servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias". Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
9. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 "Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Limites permisibles de calidad

- y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización”. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
10. Haas, Charles N. “Benefits of using a disinfectant residual”. Journal AWWA, January, Vol. 91, No. 1, 1999, pp. 65 – 69.
 11. Westerhoff, Paul. ”NOM's role in bromine and bromate formation during ozonation”, Journal AWWA, February, Vol. 90, No. 2, 1998, pp. 82 – 94.
 12. Helmer, R.; Hespagnol, I. and Saliba, L. J. “Public health criteria for the aquatic environment: recent WHO guidelines and their application”, Water Science and Technology, Vol. 24, No. 2; 1991, pp. 34 – 42.
 13. Parker, J. F. W.; Greaves, G. F. and Smith, H. V. “The effect of ozone on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and comparison of experimental methods”, Water Science and Technology, Vol. 27, No. 3-4; 1993, pp. 93 – 96.
 14. Koch, B.; Gramith, J. T.; Dale, M. S. and Ferguson, D. W. “Control of 2-methylisoborneol and geosmin by ozone and peroxone a pilot study”, Water Science and Technology, Vol. 25, No. 2; 1992, pp. 291 – 298.
 15. Romero Rojas, Jairo Alberto. “Calidad del agua”, 2ª ed., Ed. AlfaOmega, México, 1999, pp. 154-156, 160, 162, 195, 216, 217.
 16. Mac Faddin, Jean F. “Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica”, Ed. Médica Panamericana, México, 1990, pp. 260, 266-269, 271.
 17. Alvarez Manrique, Clara Inés y Mendoza Elvira, Susana E. “Manual básico de bacteriología”, UNAM, México, 1994, pp. 140.
 18. Fricker, C. R. “Methods for the detection of *Escherichia coli* in environmental samples”, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, No. 88, 2000, pp. 10S-11S.

19. Edberg, S. C.; Rice, E. W.; Karlin, R. J. and Allen, M. J. "*Escherichia coli*: the best drinking water indicator for public health protection", *Journal of Applied Microbiology*, No. 88, 2000, pp. 106S-116S.
 20. Sechi, L. A.; Lazcano, I.; Nunez, N.; Espim, M.; Dupré, I.; Pinna, A.; Molicotti, P.; Fadda, G. and Zanetti, S. "Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone)" *Journal of Applied Microbiology*, No. 90, 2001, pp. 279-284.
 21. Deininger, Rolf A.; Skadsen, Janice; Sanford, Larry; Myers, Anthony G. "Desinfección del agua con ozono" Simposio regional sobre calidad del agua: desinfección efectiva / Lima 27-9 octubre 1998. (www.cepis.ops-oms.org)
 22. Centro de Investigaciones del Ozono, Cuba. 3^{er} SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APLICACIONES DEL OZONO: Sección: Ozono en Biología. (www.ozono.cubaweb.cu/aguarf.htm)
 23. Centro de Investigaciones del Ozono, Cuba. 3^{er} SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APLICACIONES DEL OZONO: Sección: Ozono en Medicina. (www.ozono.cubaweb.cu/aguarf.htm)
- Páginas web consultadas para este trabajo:
24. www.rilize.com
 25. www.viresi.com