



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE
HIPOCLORITO DE SODIO SOBRE BACTERIAS AISLADAS DE
AGUA TRATADA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

Lidia María Reyes Gómez

DIRECTORA: Dra. Claudia Coronel Olivares

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2010

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en los siguientes eventos académicos:

8° congreso internacional, 14° nacional de ciencias ambientales y 3er congreso de medio ambiente. Memorias Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol 25, Suplemento 1, 2009. ISSN 0188 4999. Título del cartel: "Evaluación de la resistencia a hipoclorito de sodio de coliformes totales, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Enterococcus* aislados en agua tratada". Santa Cruz Tlaxcala, Tlax. México. 1 al 5 junio 2009.

Primer foro estudiantil "Jóvenes en el desarrollo de la ciencia UAEH-2009". Título del cartel: "Comparación de la resistencia del cloro entre indicadores tradicionales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*". Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, U.A.E.H., Comité de investigación y posgrado. 26 agosto de 2009.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Ambientales, perteneciente al Área Académica de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros y tablas	2
Índice de figuras y gráficas	3
Resumen	4
I.- Antecedentes	5
1.- Calidad del agua	5
1.1.- Aguas residuales	6
1.2.- Parámetros	6
1.2.1.- Normativa en el mundo	6
1.2.2.- Normativa nacional	7
2.- Tratamiento del agua	8
2.1.- Planta de tratamiento de aguas residuales del I.T.E.S.M., campus Hidalgo	9
2.2.- Desinfección	10
2.2.1.- Procedimientos químicos	11
2.2.2.- Formación de cloraminas	11
2.2.3.- Cloro	11
2.2.4.- Dióxido de cloro	12
2.2.5.- Hipoclorito	12
2.3.- Desinfección del agua	13
3.- Microbiología del agua	14
3.1.- Microorganismos	16
3.2.- Indicadores	16
3.2.2.- Ventajas y desventajas de los indicadores de la calidad del agua	17
3.3.- Características de los géneros, <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Enterococcus</i>	18
II.- Justificación	21
III.- Objetivos	22
IV.- Método	23
V.- Resultados y discusión	27
VI.- Conclusiones	38
VII.- Perspectivas	40
VIII.- Referencias bibliográficas	41
IX.- Anexos	
1.- Composición química de agares y modo de preparación	45
2.- Datos de bacterias mesófilas aerobias	47
3.- Datos de los muestreos	48
4.- Datos de bacterias certificadas	58
5.- Equipos y aparatos utilizados en la parte experimental	59

Índice de cuadros	Página
Cuadro 1.1. Organismos potencialmente causantes de enfermedades de origen hídrico	14
Cuadro 1.2. Ventajas y desventajas de indicadores de la calidad del agua	17
Cuadro 1.3. Características del género <i>Escherichia</i>	18
Cuadro 1.4. Características del género <i>Pseudomonas</i>	19
Cuadro 1.5. Características del género <i>Enterococcus</i>	20
Cuadro 5.1. Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para cada microorganismo estudiado	27
Cuadro 5.2. Valores medios del pH y temperatura del agua de los muestreos realizados en tres puntos de la planta	32
Cuadro 5.3. Valores medios (\bar{X}), máximos (MAX), mínimos (MIN) y desviación estándar (DS) de los porcentajes de remoción de UFC coliformes totales (CT), <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> , expuestos a diferentes concentraciones de NaClO (8, 20 y 30 mg/l), por espacios de 20 y 30 minutos	35
Cuadro 5.4. Porcentaje de remoción de las cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 19433 y <i>E. faecalis</i> ATCC 10145; en diferentes concentraciones de NaClO (8, 20 y 30 mg/l) a 20 y 30 minutos de contacto	37
Índice de tablas	47
Tabla A.2. Datos obtenidos del conteo de bacterias mesófilas aerobias, del agua de entrada, secundario y tratada	48
Tablas A.3. Promedios de los triplicados de los 20 muestreos por bacterias y fechas en que fueron realizados.	58
Tabla A.4. Resultados de ensayos de desinfección de cepas certificadas	58

Índice de figuras	Página
Figura 1.1 Planta de tratamiento del I.T.E.S.M., campus Hidalgo	9
Figura 1.2 Reactor biológico	9
Figura 4.1 Preparación de medios de cultivo	23
Figura 4.2 Medición <i>in situ</i> de temperatura y pH	24
Figura 4.3 Ensayos de desinfección con agua de secundario	24
Figura 4.4 Toma de muestras a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio	25
Figura 4.5 Siembra de muestras por extensión en placa	25
Figura 4.6 Incubación de cajas Petri	25
Figura 4.7 Prueba de piocianina (a) y catalasa (b)	26
Figura 5.1 a y b Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para CT y <i>E. coli</i>	28
Figura 5.2 a y b Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i>	29
Figura 5.3 Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de acuerdo a la acción del desinfectante	31
Figura 5.4 Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de acuerdo al tiempo	32
Figura 5.5 Valores medios de bacterias mesófilas aerobias aisladas en los 20 muestreos en el agua de E, S y T de la planta de tratamiento	33
Figura 5.6 Diagrama de correspondencia	36

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la resistencia de las bacterias coliformes totales, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* al proceso de desinfección con hipoclorito de sodio. Las bacterias se aislaron de agua del tratamiento secundario (S) de la planta de tratamiento de aguas residuales del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (I.T.E.S.M.), campus Hidalgo.

Se realizaron 20 muestreos de agua de entrada (E), secundario y tratada (T), midiendo *in situ* el pH y la temperatura del agua, se añadió el desinfectante (hipoclorito de sodio) al agua de S en tres concentraciones: 8, 20 y 30 mg/l, en tres diferentes tiempos: 0, 20 y 30 minutos. Las muestras se sembraron por triplicado mediante la técnica de doble capa, en medios de cultivo selectivos para cada tipo de microorganismo. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 48 h y el crecimiento microbiano se cuantificó en unidades formadoras de colonias (UFC) /100 µl.

Los resultados obtenidos muestran que el número de UFC disminuye al incrementar la concentración de hipoclorito de sodio, pero no se eliminan en su totalidad. A 20 mg/l *E. coli* disminuye hasta un 74.82 %, en tanto que *P. aeruginosa* y coliformes el porcentaje de remoción es menor. A 30 mg/l la eliminación se presentó en el siguiente orden: *Enterococcus* > *Escherichia* > Coliformes > *Pseudomonas* con un máximo de 100% y un mínimo de 23.15%, respectivamente. También se realizaron pruebas con bacterias de cepas certificadas empleando la misma técnica para confirmar estos resultados.

Hasta el momento, las bacterias coliformes han servido como indicadores tradicionales para denotar si la contaminación es de origen fecal humano o animal, lo que contribuye a asegurar la calidad del agua. Es necesario incluir en las normativas de calidad del agua de todo el mundo, microorganismos del género *Pseudomonas* debido a su importancia en la salud como patógenos oportunistas sobre todo si el agua es reutilizada en lugares con contacto humano directo y continuar la detección de los microorganismos tradicionales.

I.- Antecedentes

1.- Calidad del agua

La calidad del agua es de gran importancia para la sociedad; ésta se ve afectada por diversos procesos naturales y actividades humanas. Definir un concepto de calidad es muy complejo, ya que este término hace referencia a las características, físicas, químicas y biológicas con las que el agua debe de contar para considerarla de calidad aceptable. Además, se debe tener en cuenta el uso al cual va a ser destinada, por ejemplo: consumo humano, riego, vertido, entre otros (Anglès d'Auriac *et al.*, 2000; Poch, 1999).

La contaminación de las aguas superficiales, que son el principal suministro de los países en vías de desarrollo, se debe principalmente al vertido de las aguas residuales, sin tratamiento (OPS-OMS, 1996; Fujioka y Yonoyama, 2001).

En las zonas rurales la contaminación fecal se produce por la defecación a campo abierto y presencia de animales domésticos y silvestres que actúan como reservorios de agentes patógenos. En cuerpos de agua expuestos a la actividad agrícola y ganadera, se reportan datos de niveles de contaminación muy superiores a lo establecido en las normas (Aurazo, 2004).

Entre los agentes patógenos destacan bacterias, virus y hongos ya que se encuentran involucrados en las enfermedades de origen hídrico que pueden ser desde padecimientos muy ligeros como diarreas e infecciones de la piel, hasta los de mayor gravedad como las parasitarias con ciclos muy complejos y vectores de transmisión que puedan causar la muerte (Craun y Calderón, 2001).

Por tanto, existen parámetros que deben ser tomados en cuenta para medir la calidad del agua como son: temperatura, oxígeno disuelto, color y la presencia de sustancias que alteran su calidad y contribuyen a su contaminación (Poch, 1999). También se han desarrollado métodos para la detección y análisis de microorganismos que sirvan como bioindicadores y garanticen el reuso de agua de calidad aceptable (Fawell, 1995).

1.1 Aguas residuales

Su composición es variada ya que provienen de diferentes fuentes como son: de uso doméstico, industriales, comercios y servicios, etc. El agua residual sufre alteración de su calidad al salir de la planta de tratamiento. Presenta variaciones como la temperatura, la cual cambia dependiendo de la estación del año, el color que va de un gris claro a negro y que cambia con el paso del tiempo o que puede presentar otros colores por el vertido de sustancias como colorantes, sangre, cromo, residuos lácteos, entre otros, ocasionando un impacto negativo al ecosistema (NMX-AA-003-1980; Poch, 1999).

1.2.- Parámetros

1.2.1.- Normativa en el mundo

En muchos países se han creado normas que indican los niveles máximos permisibles para el uso o destino final del agua. De acuerdo con Aurazo (2004), las guías de calidad del agua de consumo humano de la organización mundial de la salud (OMS) indican que no es conveniente monitorear cada agente patógeno que se encuentra en el agua, sino que es mejor detectar organismos indicadores que también se encuentren en las heces de los seres humanos y de animales de sangre caliente.

En España, por ejemplo, dentro del Real Decreto 140/2003, se describen criterios sanitarios de la calidad del agua. Entre los parámetros que ha propuesto están las bacterias del género *Enterococcus* como indicadores de contaminación fecal en agua. La normativa establece que para el agua de consumo humano y para actividades domésticas el valor de *Enterococcus* debe ser de 0 UFC/100 ml (RD 140, 2003).

El Instituto Nacional de Recursos Hídricos en conjunto con el Ministerio de Salud Pública de Cuba lleva a cabo desde el año 2005 programas de manejo integral de los recursos hídricos. Dentro de los indicadores microbiológicos se encuentra *Enterococcus* (Romero, 2005).

1.2.2.- Normativa nacional

En México la Ley Federal sobre Metrología y Normalización para la elaboración de Normas Oficiales Mexicanas y el Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Protección Ambiental aprobó tres normas oficiales de calidad del agua que establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de agua residual en: a) aguas y bienes nacionales según la NOM-001-SEMARNAT-1996 (DOF, 1997); b) sistemas de alcantarillado urbano o municipal, NOM-002-SEMARNAT-1996 (DOF a, 1998) y c) en descargas de agua residual y tratada que se reusen en servicios al público, NOM-003-SEMARNAT-1996 (DOF b, 1998).

La primer norma citada, en relación con los parámetros biológicos establece como límite para agua residual en agua y bienes nacionales 1000 como número más probable (NMP) y para descargas vertidas a suelo, es decir, de riego agrícola 2000 de coliformes fecales por cada 100 ml, para medias mensuales diarias, respectivamente (DOF, 1997). Para la última norma citada el valor de coliformes fecales es 240 NMP/100 ml para contacto directo y 1000 NMP/ 100 ml para contacto indirecto u ocasional (DOF b, 1998).

Dicha norma refiere reuso con contacto directo, cuando se destina el agua a actividades donde la gente está expuesta directamente o tiene un contacto físico por ejemplo: llenado de lagos y canales artificiales recreativos con paseos en lancha, remo, canotaje y esquí; fuentes de ornato, lavado de vehículos, riego de parques y jardines (DOF b -1998).

En tanto que el reuso con contacto indirecto u ocasional, se refiere a actividades donde la gente se expone indirectamente y que su acceso es restringido, por ejemplo: riego de jardines y camellones en autopistas, camellones en avenidas, fuentes de ornato, campos de golf, abastecimiento de hidrantes de sistemas contra incendio, lagos artificiales no recreativos, barreras hidráulicas de seguridad y panteones (DOF b -1998).

2.- Tratamiento del agua

El agua es depurada por diferentes tipos de tratamientos. Las operaciones unitarias implican procedimientos físicos, químicos y biológicos. Se designa tratamiento primario a los físicos; secundario al biológico y terciario al químico (Pérez y Espigares, 1999).

Para la eliminación de sólidos sedimentables se realiza un desbaste que mediante sistema de rejillas, mallas o cribas y tamices, separan y retienen cuerpos sólidos voluminosos flotantes y en suspensión, evitando obstrucciones en los canales y tuberías, lo que aumenta la eficiencia de los tratamientos subsecuentes (Hernández, 2002).

Posteriormente, en la etapa del desarenado se separan sólidos de partículas en suspensión de tamaño pequeño como arenas, limos y arcillas. Cuando se reduce la velocidad de paso, las partículas se depositan en el fondo y son separadas. En la etapa del desengrasado se realiza la remoción de las grasas sobre la superficie del agua a través de una rasqueta (Hernández, 2001)

Posteriormente, el agua es conducida al decantador en el cual se eliminan los sólidos sedimentables que no fueron detenidos en las etapas anteriores. El agua se somete a una inyección de aire para producir una coagulación de sustancias que no son capaces de sedimentar; una parte de estos se van al reactor biológico en forma de lodos activos y la otra parte se retira del sistema para que se estabilicen, llamados lodos en exceso (Tebbutt, 2002).

En la depuración biológica los microorganismos contenidos en las aguas residuales actúan sobre la materia orgánica. En los tratamientos convencionales cuando las aguas residuales se ponen en contacto en un sistema aireado y con agitación en el reactor biológico. En un proceso conocido como lechos bacterianos, se hace circular el aire en un medio poroso y el agua residual, la materia orgánica y otras sustancias contaminantes se degradan por una película de microorganismos (Hill, 2004).

Para finalizar los tratamientos y poder reutilizar el agua, generalmente se somete a un proceso de desinfección con la finalidad de dejarla libre de microorganismos.

Los métodos empleados pueden ser mecánicos, que utilizan filtros o membranas de celulosa; físicos, ya sea aplicando calor hasta alcanzar temperaturas de ebullición del agua o por medio de luz ultravioleta, o químicos, que son los más usados por ser económicos, de fácil manejo y de acción rápida como son el cloro, ácido hipocloroso, bromo, yodo u ozono (Pérez y Espigares, 1999).

2.1.- Planta de tratamiento de aguas residuales del I.T.E.S.M., campus Hidalgo.

Esta planta está ubicada en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, campus Hidalgo en Boulevard Felipe Ángeles no. 2003 col. Venta Prieta, en Pachuca, Hidalgo. Fue instalada en octubre de 1996 y fue la primera escuela a nivel superior en construir y operar una planta de tratamiento de agua residual (Figura 1.1). La planta trabaja con un flujo máximo de 2.5 l/seg., tiene un reactor (Figura 1.2) cuya capacidad es de 136 m³. Los lodos en exceso son deshidratados por medio de un lecho de secado agregando cal para su estabilización, control de olores y vectores. Como desinfectante se emplea hipoclorito de sodio (Engel *et al.*, 2002).



Figura 1.1 Planta de tratamiento del I.T.E.S.M., campus Hidalgo.



Figura 1.2 Reactor biológico

2.2.-Desinfección

Según Pérez y colaboradores (1996) es un proceso de inactivación de los microorganismos presentes en el agua. Principalmente, se emplean desinfectantes químicos que son sustancias oxidantes y entre los mecanismos de acción más importantes destacan:

- 1.- Destrucción o alteración de la estructura celular, componentes celulares y permeabilidad de la membrana.
- 2.- Desnaturalización de proteínas, combinación con grupos prostéticos de enzimas, competición de sustratos enzimáticos o alteración de la fosforilación oxidativa.
- 3.- Alteración de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, pared celular o coenzimas

La sensibilidad de una cepa microbiana a los desinfectantes queda reflejada en el comportamiento de su curva de supervivencia. Al representar la relación supervivencia-tiempo en escala semilogarítmica, en ordenadas, el logaritmo de la fracción de supervivientes (N/N_0) y en las abscisas el tiempo, se observa una línea recta, lo que indica que la tasa de destrucción de microorganismos es una reacción química de primer orden (Pérez y Fernández, 1999).

Los desinfectantes pueden actuar por oxidación o ruptura de la pared celular, lo que produce la desintegración del organismo, o por penetración a la célula e interferencia con su actividad. En cualquier caso, se requiere que el desinfectante tenga capacidad oxidativa y penetración celular (Pérez y Fernández, 1999).

Como ya se mencionó la desinfección del agua es fundamental cuando la disposición del agua está dirigida a actividades de contacto directo, incluso indirecto, pues se pone en juego la salud humana.

2.2.1.-Procedimientos químicos

Son los más utilizados por su eficacia y bajo costo. De acuerdo con Pérez y Fernández (1999). Las características con las que debe contar un desinfectante para ser rentable son:

- Capacidad de destruir microorganismos patógenos
- Eficaz con tiempos cortos de exposición al desinfectante
- Inocuo para la salud humana
- Ausencia de color, olor o sabor residual del agua
- De fácil manejo y almacenaje
- Detección en el agua sencilla y automatizable
- Acción residual
- Bajo costo

2.2.2.- Formación de cloraminas

Cuando se añade cloro al agua que contiene amoníaco, el ácido hipocloroso (HClO) reacciona y forma cloraminas. Si el pH del agua está entre 7 y 8.4, se forman monocloraminas: si está entre 3 y 5 se forman dicloraminas y a pH < 3 se forman tricloraminas. Estos compuestos son más estables que el cloro pero su efecto de desinfección es menor, siendo inactivas contra los virus (Hernández, 2001).

2.2.3.- Cloro

El cloro (Cl₂) en sus diferentes formas ha sido utilizado en el proceso de tratamiento de las aguas residuales como desinfectante, además de que se usa para la remoción de olor y color (Comett, *et al.*, 1996).

En bacterias se ha visto la acción del cloro a concentraciones muy bajas (0.1 a 2 mg/l); los compuestos clorados reaccionan con los grupos sulfhídricos presentes en las enzimas de las células, paralizando su proceso metabólico de oxidación de la glucosa, con lo que la capacidad energética de la célula queda dañada (Pérez y Espigares, 1999).

El ácido hipocloroso por su pequeño tamaño molecular y neutralidad eléctrica puede atravesar la membrana más fácil que otros compuestos. Su acción se realiza en dos etapas, primero la penetración de la membrana celular por el compuesto y después la reacción sobre la maquinaria enzimática.

El HClO es un desinfectante poderoso contra bacterias y virus, permanece en el agua durante largos periodos de tiempo, actuando sobre contaminaciones posteriores al tratamiento (Pérez y Espigares, 1999).

2.2.4.- Dióxido de cloro

El ClO₂ puede presentar efectos de desinfección superiores a los de la cloración tradicional. Algunos problemas que presenta es su inestabilidad, debido a que al aumentar el valor del pH del agua, la eficiencia en la inactivación de microorganismos disminuye (Pérez y Espigares, 1999).

2.2.5.- Hipoclorito

Principalmente son de calcio o sodio, se obtienen al someter cloro a la sal o a la sosa cáustica. La parte activa de los compuestos clorados es la parte de cloro cuyo estado de oxidación es superior a (-1). Su actividad se mide según el poder oxidante del compuesto de cloro. Se expresa en términos de cloro equivalente, llamado "porcentaje de cloro disponible para la desinfección" (Pérez y Espigares, 1999).

El hipoclorito de sodio (NaClO), también llamado agua de javel o lejía, es alcalino y no contiene sólidos en suspensión, lo que hace posible su aplicación de una manera más fácil en el agua. El contenido de cloro que tiene corresponde a la actividad oxidante 3.17 g por cada kilogramo de solución. La acción desinfectante se efectúa por la acidificación del hipoclorito para formar ácido hipocloroso, donde el oxígeno formado es el responsable de la acción oxidativa (Pérez y Espigares, 1999).

En el tratamiento de aguas residuales la cloración debe ser posterior a la depuración; después de los tratamientos terciarios como coagulación, floculación, decantación y filtración. La dosis de cloro que se aplique al agua, debe ser necesaria para poder destruir todos los organismos presentes en ella, antes de que sea consumida o utilizada (Pérez y Espigares, 1999).

2.3.- Desinfección del agua

La inactivación o destrucción de organismos patógenos de transmisión hídrica, incluyendo bacterias, virus, protistas y hongos, así como sus formas de resistencia son muy distintos debido a las características biológicas que poseen, que en conjunto con su mecanismo de reproducción y su ciclo de vida, condicionan la supervivencia en el medio y su capacidad de resistencia a los desinfectantes.

Tras el descubrimiento de los microorganismos, se estableció el origen microbiano de las enfermedades transmisibles y comenzaron a desarrollarse muchas técnicas de desinfección para agua, alimentos y residuos. En 1881 Robert Koch demostró que el cloro destruye a las bacterias y se aplicó por primera vez en la desinfección del agua en Londres, en el año de 1905, tras aparecer un brote de fiebre tifoidea de transmisión hídrica. La práctica de la cloración se extendió por todo el mundo con mucha rapidez y se convirtió en el procedimiento más utilizado por décadas (Pérez y Fernández, 1999).

Sin embargo, en tiempos recientes se ha utilizado con mayor difusión la ozonización, en países donde la energía eléctrica es muy barata la cual es necesaria para la producción *in situ* de este desinfectante y fue utilizada en países como: Francia, Canadá, Alemania, y la antigua URSS (Pérez y Fernández, 1999).

En Europa se está empleando el dióxido de cloro por los problemas que plantea la cloración clásica ya que permite la desinfección en presencia de fenoles, ya que no forma clorofenoles (Pérez y Fernández, 1999).

3.- Microbiología del agua

La presencia de microorganismos patógenos en el agua (Cuadro 1.1) es un riesgo que se incrementa en las áreas marginales con una alta densidad poblacional. Los brotes de enfermedades de origen hídrico implican microorganismos patógenos, la mayoría proveniente de las excretas de seres humanos y animales (Cohn y Berger, 2002; Fawell, 1995).

Cuadro 1.1 Organismos potencialmente causantes de enfermedades de origen hídrico. Tomado de Cohn y Berger, 2002.

Organismo	Enfermedad principal	Origen principal
Bacterias		
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea	Heces humanas
<i>Salmonella paratyphi</i>	Fiebre para tifoidea	Heces humanas
<i>Salmonella spp.</i>	Gastroenteritis	Heces animales y humanas
<i>Shigella</i>	Disentería bacilar	Heces humanas
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Heces humanas. Agua costera
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>Legionella pneumophila</i>	Fiebre de Pontiac	Agua y aerosoles
<i>Micobacterium avium</i>	Enfermedad pulmonar	Heces humanas y de animales, agua y suelo
<i>Pseudomonas persiginora</i>	Dermatitis	Aguas naturales
<i>Helicobacter pylori</i>	Úlceras pépticas	Saliva, heces humanas
Cianobacterias	gastroenteritis	Agua y aire
Virus		
Poliovirus	Poliomielitis	Heces humanas
Cosaeikerosus	Enfermedad respiratoria	Heces humanas
Ecovirus	Enfermedad respiratoria	Heces humanas
Rotavirus	Gastroenteritis	Heces humanas
Virus de Norwalk	Gastroenteritis	Heces humanas
Virus de la hepatitis A	Hepatitis infecciosa	Heces humanas
Virus de la hepatitis B	Hepatitis	Heces humanas
Astrovirus	Gastroenteritis	Heces humanas
Adenovirus entérico	Gastroenteritis	Heces humanas
Protistas y otros organismos		
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis	Heces humanas y animales
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Crisptosporidiosis	Heces humanas y animales
<i>Entamoeba histolítica</i>	Disentería amebiana	Heces humanas y animales
<i>Cyclospora cayatanensis</i>	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>Microspora</i>	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>Acantamoeba</i>	Infecciones oculares	Tierra y agua
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	Gatos
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis	Tierra y agua
Hongos	Alergias respiratorias	Aire y agua

El uso de esa agua para beber o preparar alimentos, el contacto durante el baño, el lavado de ropa e incluso la inhalación de vapor de agua o aerosoles pueden producir la infección. La demostración de que el agua contaminada puede ser causal de enfermedades, ha conducido a la necesidad de controlar rutinariamente la calidad microbiológica de fuentes y reservorios de agua (Cohn y Berger, 2002).

El monitoreo de los microorganismos hídricos, potencialmente riesgosos para la salud, resulta difícil de llevar a cabo debido a la gran diversidad de especies patógenas; a la complejidad de los ensayos de aislamiento y a la presencia en baja concentración de especies altamente agresivas. Por ello, los análisis microbiológicos apuntan preferentemente a la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal (Moreno y Pérez, 1999)

El diagnóstico de la calidad microbiológica del agua se hace a través del aislamiento e identificación de microorganismos de tipo coliformes totales y estreptococos fecales, así como *Clostridium* sulfito reductor.

Las bacterias coliformes proliferan en presencia de sustancias orgánicas asociadas con restos vegetales o una población habitual de aguas superficiales del suelo; la detección de este tipo de microorganismos no significa solamente contaminación fecal. Este grupo es de gran importancia en aguas de abastecimiento tratadas y cloradas; ya que se consideran indicadores de la contaminación fecal humana (Espigares y Moreno, 1999).

Dentro de los patógenos utilizados como indicadores de calidad del agua se encuentran bacterias cuya metodología de detección está bien desarrollada y contemplan especies consideradas como indicadoras de contaminación. Entre estas se encuentran: coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales, clostridios sulfitorreductores, entre otros (Grabow, 1996).

3.1 Microorganismos

La proliferación de microorganismos en el agua provoca que aparezcan compuestos como aminas, triptófano y sulfatos entre otros, causantes de los olores y sabores desagradables (Moreno y Pérez, 1999).

También existe un aumento de la corrosión y solubilidad de metales pesados, como consecuencia del crecimiento microbiano en conducciones de depósitos. En muchas depuradoras, para tratar de eliminar este tipo de problemas recurren a hipercloración, ocasionando problemas como de citotoxicidad en los consumidores (Espigares y Moreno, 1999).

3.2.- Indicadores

Los microorganismos indicadores son aquellos que su permanencia en el agua es igual o similar a los patógenos, pero para su identificación se emplean técnicas más económicas y fáciles (CYTED, 2002).

El uso de indicadores microbiológicos de contaminación fecal se ha utilizado desde el comienzo del control microbiológico del agua. Estos indicadores son microorganismos de la flora saprófita del intestino humano como son: coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales, entre otros (CYTED, 2002).

Cabe señalar que la contaminación fecal también puede ser causada por algunos animales de sangre caliente que contienen patógenos como *Salmonella*, *Leptospira*, y *Escherichia* (Moreno y Pérez, 1999). La relación entre coliformes fecales y estreptococos fecales se utiliza frecuentemente para saber el origen de la contaminación ya sea humana o animal. Cuando el valor que resulta de dividir ambos indicadores, es mayor de 4 se trata de contaminación de origen humana, cuando la razón es menor de 0.7, la contaminación es de origen animal. Cuando el valor se encuentra entre 0.7 y 4 es difícil de interpretar y se considera una contaminación mixta (Espigares y Moreno, 1999).

Según Espigares y Moreno (1999), los microorganismos indicadores cuentan con las siguientes características:

- Deben estar presentes cuando lo estén los patógenos y ausentes cuando no exista contaminación en el agua.
- Los indicadores deben estar en una proporción mayor que los organismos patógenos.
- Los indicadores deben ser más resistentes que los patógenos a las condiciones ambientales y procesos de tratamiento.
- El aislamiento, recuento e identificación de los indicadores debe ser fácil.

3.2.2.-Ventajas y desventajas de los indicadores de la calidad del agua

El uso de bacterias indicadoras de la calidad del agua se utiliza ampliamente en el mundo, aunque no hay algún indicador que sea el idóneo para medir la calidad del agua (Chalmers *et al.*, 2000., WHO, 2007).

La calidad del agua residual debe proporcionar una garantía para su reutilización, ya que puede provocar brotes epidemiológicos debido a la falta de una adecuada operación, mantenimiento y análisis microbiológico (Craun y Calderón, 2001). Por tanto, es importante conocer las ventajas y desventajas (Cuadro 1.2) que proporcionan los indicadores tradicionales que pueden usarse para establecer la calidad del agua.

Cuadro 1.2. Ventajas y desventajas de indicadores de la calidad del agua. Tomado de Pérez *et al.*, 1996.

INDICADOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Coliformes totales	Técnica simple de aislamiento	Menor supervivencia que los patógenos en agua; mayor sensibilidad a los desinfectantes; origen no fecal; problemas metodológicos relacionados con la enumeración y diferenciación a partir de aguas.

Continuación		
Coliformes fecales (incluyendo <i>Escherichia coli</i>)	Origen fecal Metodología específica	Menor supervivencia que los patógenos en agua; no hay distinción entre contaminación de origen humano y animal.
<i>Streptococos</i> fecales	Buena supervivencia en agua	Baja concentración en heces; incluye especies de origen no fecal.
<i>Enterococcus</i>	Origen fecal	Problemas relacionados con su identificación
Clostridios sulfito reductores	Buena supervivencia en agua y resistencia a los desinfectantes	Limitado significado sanitario; problemas relacionados a su identificación y baja diferenciación a nivel de grupo.

3.3.- Características de los géneros, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Enterococcus*.

A continuación se resumen las características más relevantes de los tres géneros bacterianos (Cuadros 1.3. a 1.5.), que contempla la presente investigación. Cabe señalar que según Carl Woese y colaboradores (1990) pertenecen al Dominio Bacteria; mientras que de acuerdo con Margulis y Champan (1990) al Superreino Prokarya, Reino Bacteria, Subreino Eubacteria, Gracilicutes (en el caso de Gram -) y Firmicutes (para Gram +).

Cuadro 1.3. Características del género *Escherichia* (Holt *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2007); clasificación (Garrit *et al.*, 2003).

Clasificación	Phylum B XIII <i>Proteobacterias</i> Clase III <i>Gammaproteobacteria</i> Orden XIII <i>Enterobacteriales</i> Familia I <i>Enterobacteriaceae</i> Género XIII <i>Escherichia</i>
Tamaño (µm)	1.1-1.5 x 2.0-6.0
Morfología microscópica	Bacilo; células aisladas o en pares
Motilidad	Flagelos peritricos o no móviles
Hábitat	Se encuentran como simbiontes en las partes bajas del intestino de animales de sangre caliente
Importancia médica	Enfermedades diarreicas y gastroenteritis; es el mayor causante de infecciones del tracto urinario, incluyendo infecciones nosocomiales

Continuación	
Importancia médica	El serotipo de <i>E. coli</i> 0157:H7 (EHEC) causante del síndrome urémico hemolítico es considerado como potencial agente bioterrorista
Temperatura óptima (°C)	37
Respiración	Anaerobio facultativo
Tinción de Gram	Negativo
Fuente de energía	Quimioorganótrofo
Metabolismo	Respiración y fermentativo. La glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la formación de gas y ácido. Reducen nitratos
Pruebas bioquímicas	Oxidasa-, catalasa +, rojo de metilo, Voges - Proskauer -, usualmente citrato,- negativo a H ₂ S hidrólisis de urea y lipasa. O nitrofenil β D-galactopiranosido +
Especie tipo	<i>Escherichia coli</i>

Cuadro 1.4. Características del género *Pseudomonas* (Holt *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2007). Clasificación (Garrit *et al.*, 2003).

Clasificación	Phylum B XII <i>Proteobacterias</i> Clase III <i>Gammaproteobacteria</i> Orden IX <i>Pseudomonadales</i> Familia I <i>Pseudomonadaceae</i> Género I <i>Pseudomonas</i>
Tamaño (µm)	0.5-1.0 x 1.5-5.0
Morfología microscópica	Bacilos alargados o ligeramente curvos
Motilidad	Uno o muchos flagelos polares
Hábitat	Ampliamente distribuidos, tanto en agua como suelo. No crecen en un pH menor de 4.5
Importancia médica	Algunas son patógenas para humanos, animales o plantas, se encuentran en forma saprófita en la piel, y tubo digestivo; puede crecer en quemaduras o infecciones ulceradas; forma endotoxinas responsable de cuadros diarreicos; toxinas eritrodérmicas, toxina extracelular
Temperatura óptima (°C)	42
Respiración	Aerobio estricto
Tinción de Gram	Negativo
Fuente de energía	Quimioorganótrofo; algunas especies son quimiolitótrofos facultativos
Metabolismo	Respiratorio
Pruebas bioquímicas	Oxidasa + ó -, catalasa +
Especie tipo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Cuadro 1.5. Características del género *Enterococcus* (Holt *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2007). Clasificación (Garrit *et al.*, 2003).

Clasificación	Phylum B XIII <i>Firmicutes</i> Clase III <i>Bacilli</i> Orden II <i>Lactobacillales</i> Familia IV <i>Enterococcaceae</i> Género I <i>Enterococcus</i>
Tamaño (µm)	0.6-2.0 x 0.6-2.5
Morfología microscópica	Cocos, en pares o cadenas cortas en medios líquidos, no forma endoesporas
Motilidad	No presenta flagelos
Hábitat	Ampliamente distribuidos en la naturaleza particularmente en heces de vertebrados
Importancia médica	Ocasionalmente causan infecciones
Temperatura óptima (°C)	37
Respiración	Anaerobio facultativo
Tinción de Gram	Positivo
Fuente de energía	Quimioorganótrofo
Metabolismo	Fermentativo, una gran variedad de carbohidratos son fermentados con producción de L (+) ácido láctico pero no gas, usualmente fermenta lactosa
Pruebas bioquímicas	Catalasa negativa
Especie tipo	<i>Enterococcus faecalis</i>

II.- Justificación

La presencia de microorganismos patógenos en el agua impacta negativamente en la salud pública y limita su uso para fines diversos. Algunas bacterias pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del agua, denotando si la contaminación fecal es de origen humano o animal.

Los patógenos humanos pueden transmitirse por vía oral a través del agua de consumo o por su contacto indirecto. Es por ello que en las plantas de tratamiento de aguas residuales, el agua es desinfectada para eliminar microorganismos patógenos.

Para obtener una estimación de la calidad del agua se han propuesto diversos indicadores biológicos basándose en la evaluación de organismos presentes en los ecosistemas acuáticos. Hasta el momento las bacterias coliformes han servido como indicadores de origen fecal.

La elaboración de normativas debe estar encaminada a asegurar la calidad del agua mediante la eliminación de microorganismos patógenos, por tanto se requiere incluir otros grupos distintos a los coliformes totales para garantizar una mejor calidad de agua.

El presente trabajo pretende aislar bacterias en aguas desinfectadas con hipoclorito y determinar su resistencia. Por trabajos anteriores de experiencia en el laboratorio de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, existen bacterias que pueden encontrarse de manera significativa en el agua residual, distintas a los indicadores tradicionales de la calidad de agua. Por lo que se desea demostrar su resistencia al proceso de desinfección con hipoclorito de sodio y es necesario incluir otras distintas a los indicadores tradicionales como *Pseudomonas aeruginosa* por ser patógenos oportunistas y *Enterococcus faecalis* debido a que indican si el origen de la contaminación fecal.

III.- Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la resistencia al proceso de desinfección con hipoclorito de bacterias aisladas de agua tratada.

Objetivos particulares

- Evaluar la resistencia al proceso de desinfección con hipoclorito de sodio por coliformes totales, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* aisladas de la planta de tratamiento del I.T.E.S.M campus Hidalgo, empleando diferentes dosis del desinfectante y tiempo de contacto.
- Comparar la resistencia de cepas certificadas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* al proceso de desinfección.

IV.- Método

Se realizaron veinte muestreos semanales en diferentes periodos del año abarcando desde el mes de septiembre hasta abril. Las fechas se pueden observar en las tablas del anexo 3. A continuación se plantea la metodología empleada:

Medios de cultivo

1.- En el apartado IX, anexo 1 se detalla la composición química de los medios de cultivo empleados, así como las especificaciones para su preparación (Figura 4.1). Se emplearon agares de doble capa utilizando como agar de base soya y tripticaseína y en la superficie, agares selectivos, McConkey, Bilis rojo violeta, *Pseudomonas*, *Enterococcus*. Para el conteo de bacterias mesófilas aerobias se usó agar cuenta estándar (anexo 1).



Figura 4.1. Preparación de medios de cultivo.

Muestreo

2.- Se tomaron muestras de agua en frascos de polietileno, estériles de un litro a la entrada (E), en el tanque de secundario (S) y a la salida, es decir, agua tratada (T) que contenía hipoclorito de sodio, según la normativa mexicana (NMX-AA-03-1980) atendiendo a las condiciones que existía en el punto de muestreo y tomado el volumen suficiente para realizar los análisis.

3.- Se midieron *in situ* los parámetros fisicoquímicos: pH, según la norma NMX-AA-008-SCFI-2000 y la temperatura según la norma NMX-AA-007-SCFI-2000 (Figura 4.2).



Figura 4.2. Medición *in situ* de temperatura y pH.

4.- Se colocaron las muestras en una hielera para conservarlas a una temperatura de 4°C y se trasladaron al laboratorio de Ciencias Ambientales del Área Académica de Química (AAQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

5.- Posteriormente, en condiciones de esterilidad se vertieron 200 ml de la muestra de agua de secundario en tres matraces de 250 ml previamente esterilizados (Figura 4.3)

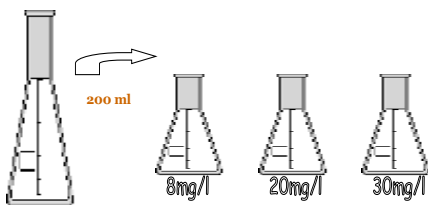


Figura 4.3. Ensayos de desinfección con agua de secundario.

6.- Se adicionaron cantidades necesarias para obtener las concentraciones de hipoclorito de sodio de 8 mg/l, 20 mg/l y 30 mg/l, en los diferentes matraces a partir de hipoclorito de sodio al 11% N01791 Grupo APA.

7.- Se procedió a tomar muestras a diferentes tiempos (0, 20 y 30 min) para medir la acción del hipoclorito sobre los microorganismos (Figura 4.4).



Figura 4.4. Toma de muestras a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

8.- Las muestras tomadas a los diferentes tiempos se sembraron por extensión en placa por triplicado en cada medio de cultivo (Figura 4.5).



Figura 4.5. Siembra de muestras por extensión en placa.

9.- Posteriormente, las cajas se incubaron a 37 °C durante 48 h (Figura 4.6).



Figura 4.6. Incubación de cajas Petri.

10.- Trascurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las UFC presentes en cada caja utilizando el cuenta colonias.

11.- Se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar las UFC de *P. aeruginosa* (Figura 4.7). La prueba de piocianina se considera positiva, al observar colonias verdes fluorescentes cuando se irradian con luz UV después de 48 h de incubación. La prueba de catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O y O_2 . Al agregar el H_2O_2 al 30% y si se observa la formación de burbujas, se considera una prueba positiva (Bartelt, 2000)

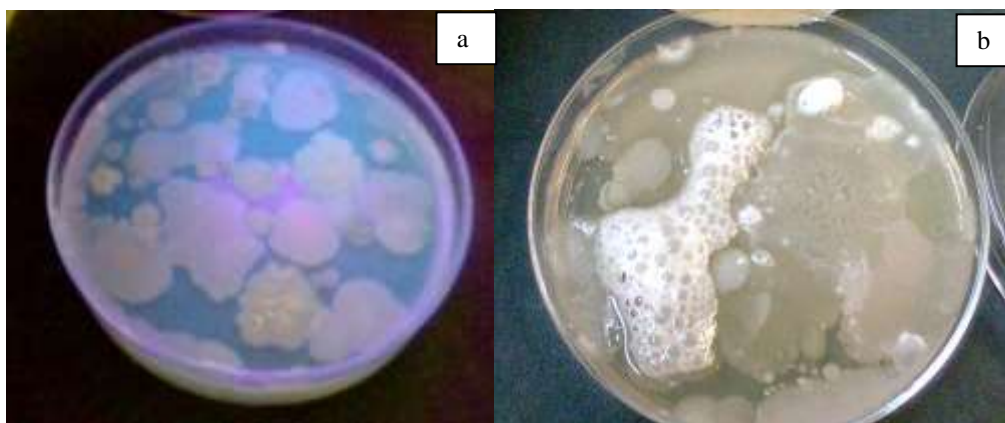


Figura 4.7. Prueba de piocianina (a) y catalasa positiva (b).

12.- El procedimiento experimental se validó empleando cepas de referencia *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 19433 y *E. faecalis* ATCC 10145; con la diferencia que el agua de S fue filtrada con una membrana de nitrocelulosa, estéril de 0.45 μm de poro con la finalidad de que las bacterias estuvieran en contacto con la misma calidad de agua de las bacterias de la investigación, realizando las pruebas por triplicado.

13.- Para el análisis estadístico de los datos se realizó una prueba paramétrica de ANOVA de dos vías para cada microorganismo estudiado y por cada tratamiento (concentración y tiempo). Los datos fueron transformados a logaritmo para normalizarse y aplicar las pruebas estadísticas. Todos los análisis de varianza se llevaron a cabo en el programa estadístico NCSS y PASS (2001). Además, se graficaron los resultados para poder comparar las concentraciones de hipoclorito y cuantificar los efectos del desinfectante sobre los microorganismos en las diferentes concentraciones y en los diferentes tiempos así como realizar las pruebas estadísticas que sustenten con mayor confiabilidad los resultados obtenidos.

V.- Resultados y discusión

Todas las pruebas de análisis de varianza muestran que las especies de microorganismos estudiados varían significativamente de acuerdo a la concentración del desinfectante y al tiempo de retención (cuadro 5.1).

Cuadro 5.1 Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para cada microorganismo estudiado.

Microorganismos	C. totales			<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. faecalis</i>		
	F	g.l	P	F	g.l	p	F	g.l	P	F	g.l	P
TRATAMIENTO	14.77	2	0.001	18.06	2	0.001	20.46	2	0.001	19.99	2	0.001
TIEMPO	25.31	2	0.005	33.28	2	0.015	14.78	2	0.014	14.25	2	0.015
INTERACCION a y b	0.17	4	0.951	0.21	4	0.363	0.46	4	0.766	1.09	4	0.363

Donde: F= Valor total de la estimación del análisis, g.l= grados de libertad y P= valor de significancia.

Las interacciones de los modelos de ANOVA no presentaron valores significativos lo cual indica que la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo al que fueron expuestos son independientes para cada tipo de microorganismos estudiados, CT, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*.

En las figuras 5.1 y 5.2, se aprecia una disminución en la abundancia de microorganismos en función del tiempo para cada una de las concentraciones empleadas. Los valores se presentan en unidades logarítmicas, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, cada especie tiene diferente tendencia de disminución con las condiciones experimentales.

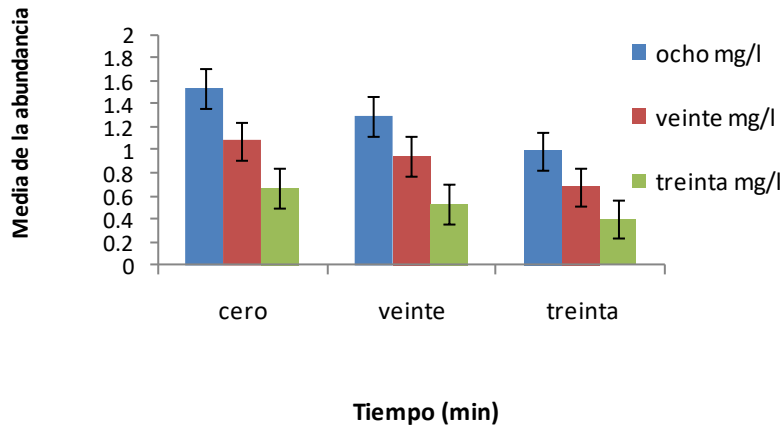
Cabe destacar que la especie más resistente fue *P. aeruginosa* y la que se eliminó en mayor proporción fue *E. faecalis*. En tanto que CT y *E. coli* tienen un comportamiento de remoción similar.

A continuación (Figura 5.1. a y b) se muestra que existen diferencias significativas para *E. coli* y CT y (Figura 5.2.) para *P. aeruginosa* y *E. faecalis*

en los diferentes tratamientos y periodos de tiempo. Se aprecia que no se solapan los errores estándar para ningún tratamiento.

a

Coliformes



E. coli

b

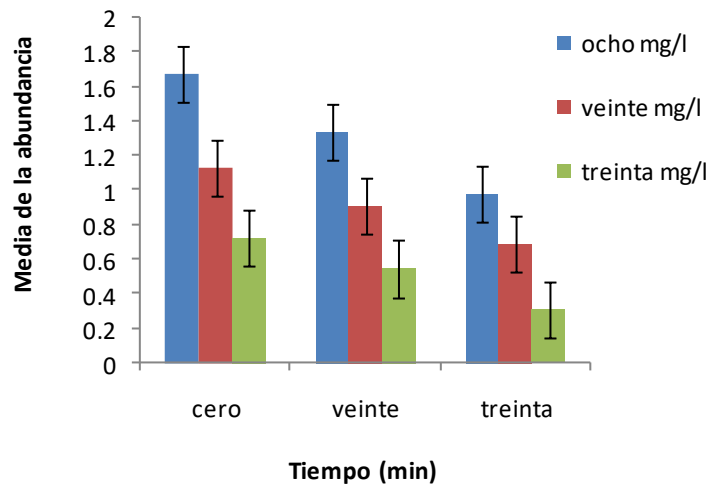
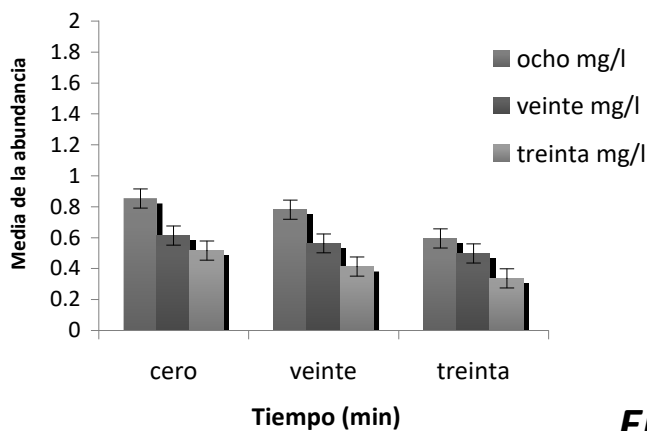


Figura 5.1 a y b. Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para CT y *E. coli*.

a ***Pseudomonas***



Enterococcus

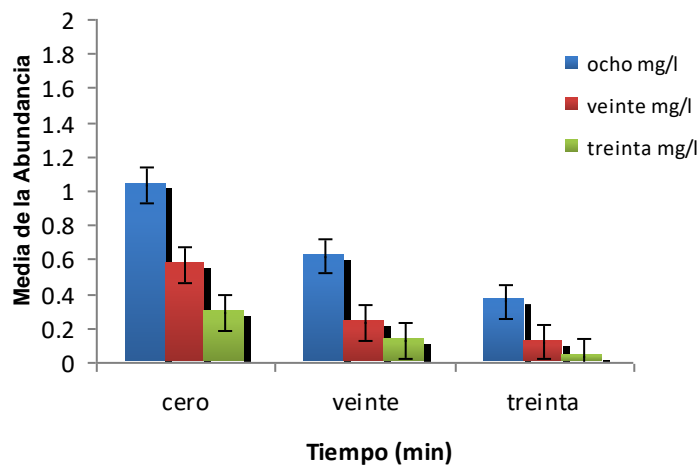


Figura 5.2 a y b Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de dos vías para *P. aeruginosa* y *E. faecalis*.

Comparando la abundancia de las bacterias entre cada uno de los tipos de microorganismos estudiados se aprecia que las tendencias de desinfección son significativamente distintas de acuerdo con la concentración de hipoclorito empleado.

Podemos inferir que existe un efecto inmediato sobre los microorganismos al aplicar las diferentes concentraciones de hipoclorito, posiblemente por la rápida acción del desinfectante sobre las células, por la permeabilidad del agente oxidante al interior de la célula y/o por el tiempo que transcurre en la toma de la muestra, aproximadamente 10 segundos (Pérez y Espigares, 1999). Por tanto, en las figuras se observa que los valores inician con diferente valor para cada

concentración y tipo de microorganismo. Dicho valor puede corregirse al realizar un diseño experimental en el que no se añada el desinfectante y se tenga un conteo directo de cada uno de los microorganismos.

Asimismo, el tiempo de desinfección entre grupos de bacterias presenta la misma tendencia al comparar la abundancia de las mismas conforme avanza el tiempo de desinfección con diferencias significativas entre ellas, excepto para *CT* y *E. faecalis*. Todos los experimentos presentan las mismas tendencias en la tasa de disminución de abundancia conforme aumenta el tiempo de contacto con el desinfectante (Figuras 5.1 a y b y 5.2 a y b) y tasa de disminución de los cuatro tipos de bacterias de acuerdo a la acción del desinfectante (Figura 5.3) y la tasa de disminución de acuerdo al tiempo de contacto (Figura 5.4). En ambos casos se aprecia la tendencia a la disminución de la abundancia de las bacterias según los resultados de los 20 muestreos realizados.

En la figura 5.3, se muestran las tendencias en la disminución de la abundancia media de los microorganismos estudiados expresada en unidades logarítmicas, de acuerdo a la concentración del desinfectante. Los microorganismos presentaron diferencias significativas en su remoción en función de las distintas concentraciones.

La diferencia de los valores obtenidos de las pruebas de ANOVA entre la menor y la mayor concentración del desinfectante fueron de 2.41 log para *E. coli*; 2.23 log para *CT*; 1.55 log para *E. faecalis* y 0.96 log para *P. aeruginosa*.

Cabe señalar que el orden en el que aparecen las tendencias no representa la magnitud en la que son removidos los microorganismos, ya que de acuerdo con la concentración del desinfectante la mayor remoción sigue esta secuencia: *E. faecalis* > *E. coli* > *CT* > *P. aeruginosa*.

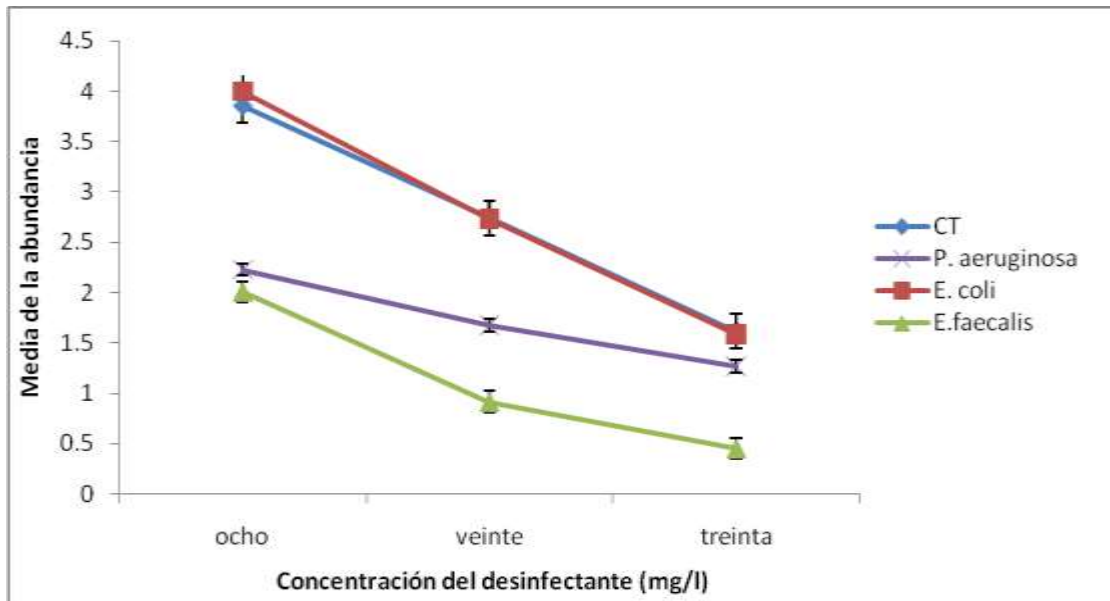


Figura 5.3 Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de acuerdo a la acción del desinfectante.

La remoción de todos los tipos de microorganismos de acuerdo al tiempo de exposición al desinfectante se muestra en la Figura 5.4. Aquí se aprecia que existen diferencias significativas, así como la tendencia a disminuir la abundancia media para cada especie expresada en unidades logarítmicas.

La diferencia de los valores obtenidos de las pruebas de ANOVA entre el tiempo cero y treinta minutos de exposición al desinfectante fueron de 1.54 log *E. coli*; 1.21 log para CT; 1.38 log para *E. faecalis* y 0.55 log para *P. aeruginosa*. Con el mayor tiempo de exposición al desinfectante no se garantiza la eliminación de los diferentes tipos de microorganismos. El orden de la disminución en la abundancia de acuerdo con el tiempo de exposición al desinfectante siguió la misma secuencia que en el patrón de concentración.

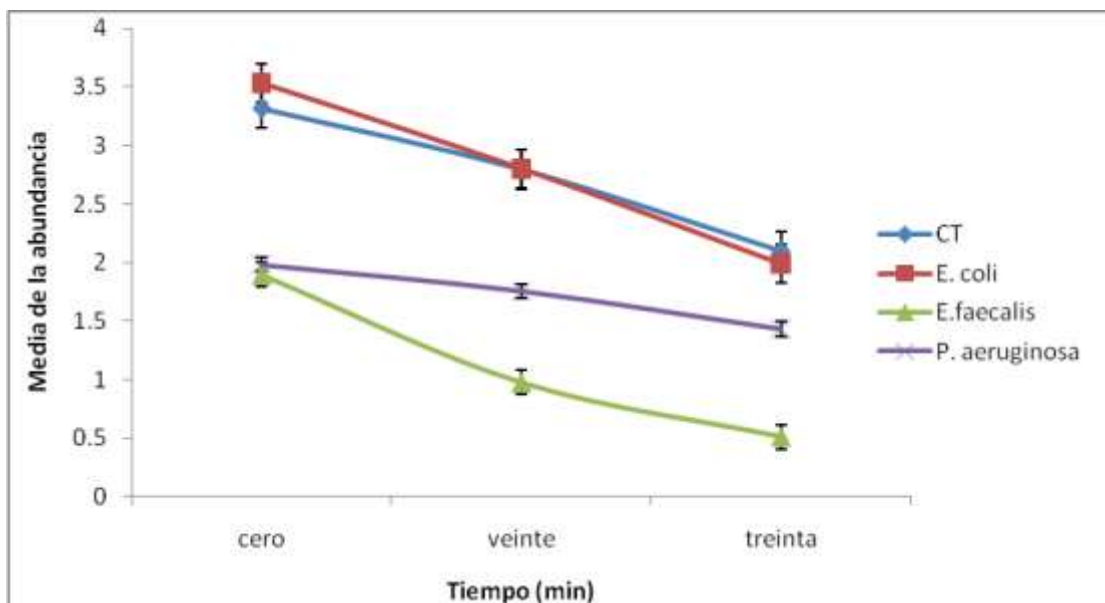


Figura 5.4 Valores obtenidos de las pruebas de ANOVA de acuerdo al tiempo.

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos medidos en el agua de E, S y T de la planta de tratamiento, se muestran en el cuadro 5.2.

Cuadro 5.2 Valores medios del pH y temperatura del agua de los muestreos realizados en tres puntos de la planta.

Parámetros	Puntos de muestreo		
	Entrada	Secundario	Tratada
pH	7.32	7.49	7.44
Temperatura (°C)	19.68	19.80	20.56

Entre los parámetros más importantes para los microorganismos se encuentran: temperatura, pH, disponibilidad de O₂, tensión superficial, entre otros (Apella y Araujo, 2006). Es de gran importancia medir algunos de estos parámetros fisicoquímicos para evaluar si afectan el crecimiento de bacterias.

Los valores medios de los resultados obtenidos en los 20 muestreos evidencian que el pH presentó valores que varían entre 7.32 y 7.49 en los tres puntos de muestreo, lo que indica un pH similar al reportado por Martínez (2006) 7.92 y 7.79 y Coronel (2007) de 7.57 y 7.75 para el agua residual y residual tratada.

En cuanto a la temperatura del agua, el rango se encontró entre 19.68 a 20.56 entre los 3 puntos de muestreo. Dado que los valores de referencia se reportan entre 10 y 20 °C, la temperatura fue idónea para el crecimiento de los microorganismos (Pérez y Espigares, 1999). Y concuerdan por lo reportado por Martínez (2006) 22.03 °C y Coronel (2007) cuyos valores fueron de 21.94 y 21.13°C para el agua residual y residual tratada, respectivamente.

El conteo de bacterias mesófilas aerobias se refiere al número de bacterias que crecen en el medio de cultivo, cuenta estándar, a 37° C durante 48 horas. Se sabe que estos microorganismos pueden producir infecciones cutáneas y de las mucosas del ojo, oído, nariz y garganta (Cohn, 2002).

El conteo de UFC de bacterias mesófilas aerobias en agua de E, S y T de los muestreos realizados se exhibe en el anexo 2; la información inicia a partir del muestreo tres ya que no se tomaron datos del 1er y 2do muestreo.

De los tres sitios de muestreo (E), (S) y (T) se aprecia una disminución considerable en el número total de UFC de bacterias mesófilas aerobias (Figura 5.5). Aunque la diferencia entre el agua de (S) y (T) es mínima en consideración con el agua de (E), donde se aprecia claramente una disminución con los dos primeros tratamientos de la depuradora.

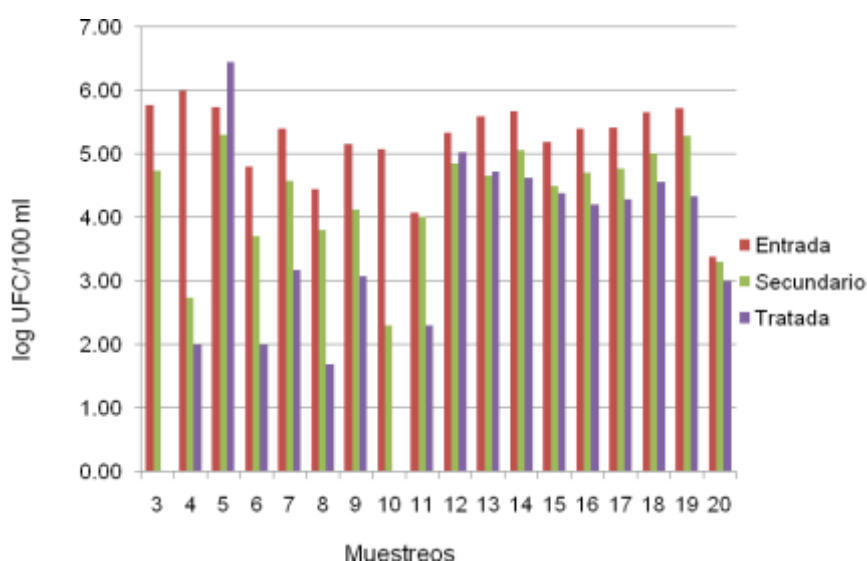


Figura 5.5 Valores medios de bacterias mesófilas aerobias aisladas en los 20 muestreos en el agua de E, S y T de la planta de tratamiento.

Hay que precisar que la depuradora no está eliminando a las bacterias incluso aplicando la desinfección; los valores confirman que tampoco se eliminan las bacterias mesófilas aerobias. Por lo tanto, la calidad del agua no es apropiada para el uso que marcan las normativas, es importante tener un monitoreo constante porque muchas de estas bacterias pueden ser patógenas.

Los resultados obtenidos de los ensayos de desinfección, empleando tres dosis de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de contacto se reportan como el porcentaje de remoción (% R) de bacterias, según la fórmula:

$$\%R = \frac{T_0 - T_1}{T_0} \times 100$$

Donde:

%= Porcentaje de remoción.

T₀ = No. de UFC a tiempo de retención 0 minutos.

T₁ = No. de UFC a tiempo de retención 20 y 30 minutos.

Y de estos resultados se obtuvieron los valores medios (\bar{X}), máximos (MAX), mínimos (MIN) y desviación estándar (DS).

Los resultados del conteo de microorganismos para los 20 muestreos se exhiben a detalle en el anexo 3 para coliformes totales, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, en las tres concentraciones de 8, 20 y 30 mg/l de exposición con hipoclorito de sodio y en cada tiempo de retención de 0, 20 y 30 minutos.

En el cuadro 5.3 se resumen los porcentajes de remoción una vez que se obtuvieron los valores medios de cada triplicado, para cada microorganismo a diferentes dosis y tiempo de contacto del desinfectante. Cabe señalar que la calidad del agua fue muy variable para cada muestreo, debido a que en algunas ocasiones se reportó la existencia de muchas bacterias incluso que el número de UFC era >300 y en algunos muestreos no se aislaron el tipo de bacterias de interés, reportando cajas con cero. Por tanto la desviación estándar es alta para la mayoría de los muestreos.

Con estos resultados se comprueba que los indicadores tradicionales tienen un máximo de remoción entre el 85.95 para CT y 87.40% para *E. coli* a pesar de la exposición con el máximo tiempo de retención del desinfectante que fue 30 min, lo cual no garantiza la desinfección del agua tratada de la planta de tratamiento.

Cuadro 5.3. Valores medios (\bar{X}), máximos (MAX), mínimos (MIN) y desviación estándar (DS) de los porcentajes de remoción de UFC de coliformes totales (CT), *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, expuestos a diferentes concentraciones de NaClO (8, 20 y 30 mg/l), por espacios de 20 y 30 minutos.

		Concentración de hipoclorito de sodio (mg/l)					
		8		20		30	
Microorganismos	T _R =min	20´	30´	20´	30´	20´	30´
CT	\bar{X}	56.96	78.32	67.12	83.06	79.14	85.95
	MAX	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	MIN	2.02	28.90	12.65	54.11	12.50	25.00
	DS	34.29	23.77	33.97	18.16	29.56	20.46
<i>E. coli</i>	\bar{X}	54.82	75.56	55.76	77.51	75.08	87.40
	MAX	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	MIN	0.24	16.20	3.46	40.06	16.70	36.70
	DS	36.80	28.17	37.29	23.23	29.91	20.35
<i>P. aeruginosa</i>	\bar{X}	39.08	50.39	39.33	50.35	50.31	53.57
	MAX	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	MIN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	DS	34.58	30.45	32.68	32.63	35.70	32.69
<i>E. faecalis</i>	\bar{X}	72.78	94.75	91.47	94.88	93.16	98.54
	MAX	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	MIN	8.55	74.72	55.11	50.00	9.90	70.90
	DS	24.25	7.39	13.72	12.11	20.55	6.34

Reportes de Lazarova y col. (1999) determinan que a una dosis de 8 mg/l de cloro con un tiempo de contacto de 30 min garantiza una cantidad menor a 10⁴ CT/ 100 ml de agua analizada.

Stewart y col. (2001), determinaron que con 1000 mg/l de hipoclorito de sodio entre 10 y 12% disminuye la densidad celular de 0.85 log respecto al número de células viables.

En un trabajo reportado por Rutala y Weber (1997), se demostró que a una concentración de cloro residual de 100 mg/l y un tiempo de contacto de 100 minutos, a una temperatura de 20 °C, con valores de pH de 8.2 a 9.2, no hay una disminución de las unidades logarítmicas de *P. aeruginosa*; en tanto que *Enterococcus faecium* con 250 mg/l y 5 minutos disminuye 8.48 a 6 log.

Como se demuestra en este trabajo para *P. aeruginosa*, ni hiperclorando el agua con 30 mg/l, ni con el máximo tiempo de retención son removidas, ya que sólo se eliminan un 53.57% de las bacterias. Esto evidencia la importancia y necesidad de incluir este género dentro de los indicadores de la calidad del agua por su importancia como patógeno oportunista; la resistencia tan clara que tiene ante la acción del desinfectante y la abundancia de estas bacterias en el agua ya tratada hace ver la urgencia con que se debe incorporar a la lista de indicadores en las normativas.

Las bacterias que se eliminaron con mayor eficacia fueron de la especie *E. faecalis*, con un 98.54%, a pesar de que casi se garantiza su eliminación, se puede emplear para denotar el tipo de contaminación fecal que está presente en el agua residual, ya sea de origen humano o animal.

Los resultados obtenidos en porcentaje de remoción para las cepas certificadas se presentan en el cuadro 5.4 y detalladamente en el anexo 4. Al realizar las pruebas con bacterias certificadas se validó el procedimiento experimental de los resultados obtenidos con las bacterias aisladas de los muestreos realizados en la investigación.

También se confirma que las dosis y tiempos empleados no garantizan la eliminación de las cepas certificadas a excepción de *E. faecalis* y por tanto la calidad del agua tratada no es óptima. Para las cepas certificadas el porcentaje

de remoción aumenta al incrementar la dosis del desinfectante y el tiempo de contacto.

El orden de remoción a la máxima concentración y tiempo es *E. faecalis* > *E. coli* > *P. aeruginosa* cuyos valores son 100, 84.61 y 60 % respectivamente. Estos valores son muy similares a los de las cepas aisladas en la planta de 98.54, 85.95 y 53.57 de % de remoción, respectivamente.

Los resultados de *P. aeruginosa* corroboran la resistencia de esta cepa al proceso de desinfección, la máxima remoción fue de 60%, muy similar al resultado obtenido para las bacterias de esta especie aisladas de la planta cuyo valor fue 53.57% incluso a la máxima dosis y tiempo de contacto. Por tanto, se debe incluir a los microorganismos del género *Pseudomonas* como indicadores de la calidad del agua residual tratada.

Cuadro 5.4. Porcentaje de remoción de las cepas de *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 19433 y *E. faecalis* ATCC 10145; en diferentes concentraciones de NaClO (8, 20 y 30 mg/l) a 20 y 30 minutos de contacto.

Microorganismos	Tiempo de contacto (minutos)					
	20			30		
	8mg/l	20mg/l	30mg/l	8mg/l	20mg/l	30mg/l
<i>E. coli</i>	41.01	57.14	69.23	76.1	71.42	84.61
<i>P. aeruginosa</i>	ND	20	50	56.15	55	60
<i>E. faecalis</i>	35.71	50	100	92.85	100	100

ND no disponible

En el caso de *P. aeruginosa* en la concentración de 8 mg/l no fue posible determinar el porcentaje de remoción debido a que no se obtuvieron colonias aisladas a pesar de contar con triplicados.

VI.- Conclusiones

- Se demostró que existe resistencia al proceso de desinfección por parte de organismos de *E. faecalis*, *E. coli*, coliformes totales y *P. aeruginosa*, aisladas de agua tratada.
- Se comprobó que al variar las concentraciones del desinfectante hipoclorito de sodio (8, 20 y 30 mg/l), con exposición a diferentes tiempos (20 y 30 min), no se eliminan en su totalidad las bacterias estudiadas.
- Los valores medios en porcentaje de remoción del total de muestreos para *E. faecalis*, *E. coli*, coliformes totales y *P. aeruginosa* fueron de 98.54, 87.40, 85.95 y 53.57, respectivamente, con la máxima dosis de desinfectante y al mayor tiempo de exposición.
- Los valores medios más altos de eliminación corresponden con la mayor dosis del desinfectante (30 mg/l) para cada tipo de microorganismo.
- De acuerdo con los análisis de ANOVA existen diferencias significativas en la eliminación de los microorganismos estudiados en relación con la concentración del desinfectante. Los resultados son independientes para cada tipo de microorganismo, aunque en todos los casos su remoción es proporcional a la concentración.
- En relación al tiempo de exposición para las distintas dosis del desinfectante, cada tipo de microorganismo disminuye de manera independiente, observándose una mayor remoción en el lapso entre 20 y 30 minutos. A los 30 minutos se alcanza la máxima remoción de microorganismos.
- De acuerdo con los análisis de ANOVA existen diferencias significativas en la eliminación de los microorganismos estudiados en relación con el tiempo de exposición al desinfectante. Los resultados son

independientes para cada tipo de microorganismo, aunque en todos los casos se establece una tendencia de remoción proporcional al tiempo.

- *E. faecalis* alcanza valores de remoción mayores a CT en todas las concentraciones de NaClO probadas, así como en todos los tiempos de contacto. Su escasa presencia en las aguas tratadas se garantiza aun en concentraciones bajas de hipoclorito.
- La resistencia del desinfectante hipoclorito de sodio de bacterias aisladas de la planta de tratamiento, en comparación con las bacterias certificadas *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 19433 y *E. faecalis* ATCC 10145; utilizando el mismo método dio como resultado valores similares a la acción del desinfectante y al tiempo de exposición.
- El tratamiento del agua residual con hipoclorito en sistemas convencionales de depuración, no garantiza la calidad microbiológica requerida para el reuso en contacto directo como lo marca la normativa mexicana. Debido a que el agua tratada es destinada al riego de camellones y jardines podría representar un riesgo potencial de salud debido a que existen actividades de juego sobre las áreas verdes regadas con el agua tratada.
- Es notorio el caso de sobrevivencia de los microorganismos oportunistas de la especie *P. aeruginosa* que es la que más resistió los efectos de la cloración, tanto en las muestras aisladas de la PTAR como en el caso de las cepa certificada ATCC 19433.
- Es necesario modificar la normativa mexicana de aguas residuales tratadas para que incluya otros indicadores distintos a los coliformes como *P. aeruginosa*, debido a su origen patógeno e importancia médica. El hecho de incluir otros microorganismos aparte de los tradicionales en las normativas de aguas permitirá obtener aguas tratadas con mejor calidad y garantizar su reuso.

VII.- Perspectivas

El cuidado de los recursos hídricos podría garantizar la supervivencia de las siguientes generaciones; desafortunadamente el aumento poblacional y el mal manejo de este recurso visualizan un futuro incierto en la disponibilidad para la humanidad. Por ello, el reutilizar el agua tratada cuando no represente ningún riesgo en la salud de la población es una excelente propuesta, pero debe hacerse con la garantía de que ninguna persona corra el riesgo en su salud cuando se exponga de manera directa o indirectamente al agua tratada.

El proponer nuevos indicadores de la calidad del agua como *P. aeruginosa* y *E. faecalis* puede mejorar la eficacia de los estudios microbiológicos y así contar un agua de mayor calidad.

Es importante que se realicen más estudios no sólo en esta planta de tratamiento sino a nivel municipal, estatal y nacional y realizar investigaciones a nivel de comunidades en donde se tengan contacto directo con el agua.

Las autoridades sanitarias deben continuar registrando el número de casos de enfermedades gastrointestinales y buscar si existe una relación directa de los brotes hídricos y la calidad microbiológica del agua residual tratada.

Proponer a la planta de tratamiento del I.T.E.S.M campus Hidalgo realizar periódicamente los análisis correspondientes para garantizar que el uso que le están dando al agua tratada no tenga ninguna consecuencia en la salud de sus estudiantes por el contacto al utilizar sus áreas de recreación.

Utilizar el agua residual podría proporcionarnos muchos beneficios más que problemas, si en un futuro y con la ayuda de la tecnología podemos totalmente eliminar estas bacterias patógenas podríamos aprovechar esta agua, para nuevos usos.

Es importante proponer en las escuelas, municipios y estados contar con más plantas de tratamiento y así poder reutilizar los recursos hídricos y traer beneficios al ambiente.

. VIII.- Referencias bibliográficas

- Anglès d'Auriac M. B., Hildegarda R., Shaw T., Sireva G. R., Hermansen L. F. y Berg J. 2000. **Field evaluation of a semiautomated method for rapid and simple analysis of recreational water microbiological quality.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10): 4401-4407.
- Apella C. M. y Araujo Z. P. 2006. **Microbiología del agua. Conceptos básicos.** www.psa.es/webesb/projects/solarsafewater/documents/libro/02_capitulo_02.pdf.
- Aurazo de Z. M. 2004. **Aspectos biológicos de la calidad del agua.** Capítulo 2. En: Cánepa de V. L, Maldonado Y. V, Barrenechea M. A. Tratamiento de agua para consumo humano: plantas de filtración rápida. Manual I: teoría. tomo I. Lima; CEPIS. p. 58-102.
- Bartelt M. A. 2000. **Diagnostic bacteriology a study guide.** Ed. F. A. Davis company, Philadelphia. pp. 70-72.
- BBL. Becton Dickinson Microbiology Systems. 1988. **Manual of BBL products and laboratory procedures.** 6 ed., Maryland. pp 389.
- Chalmers R. M., Aird H. y Bolton F. J. 2000. **Waterborne *Escherichia coli* 0157.** *Journal of Applied Microbiology* symposium Supplement 88, pp. 124-132.
- Cohn D. P. y Berger S. P. 2002. **Aspectos de la calidad del agua. Salud y estética.** En: Calidad y tratamiento del agua. Manual de suministros del agua. AWWA. Ed. McGraw-Hill, España. pp. 47-64.
- Comett A. M, Orta M. T. y Monje I. 1996. **Efecto del cloro sobre las propiedades físicas y químicas del agua residual.** AIDIS. Consolidación para el desarrollo Tomo 2. Instituto de Ingeniería, UNAM, México. p.1-8.
- Coronel C. 2007. **Justificación del empleo de nuevos indicadores biológicos en relación con la calidad de las aguas.** Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España. pp. 216.
- Craun G. y Calderón R. L. 2001. **Waterborne Disease outbreaks caused by distribution system deficiencies.** *Journal of the American Water Works Association*, septiembre, pp. 64-75.
- CYTED (Red Iberoamericana de Potabilización de Agua) (2002). **Indicadores de Contaminación fecal.** Agua potable para comunidades rurales, rehusó y tratamientos de aguas residuales.
- DIBICO. 2002. **Medios de cultivo. Bacteriología General,** página de internet <http://dibico.com>.

- DIFCO. 1998. **Manual 1998**. Difco laboratorios, Division of Dickinson and company, Maryland. pp 860.
- DOF. Diario oficial de la federación. 6/enero/1997. NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales y bienes nacionales.
- DOF a. Diario oficial de la federación. 3/junio/1998. NOM-002-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
- DOF b. Diario oficial de la federación. 21/septiembre/1998. NOM-003-SEMARNAT-1997. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se rehúsen en servicios al público.
- Engel U. R., Cruz J. I. y Ramírez G. A. 2002. **Proyecto de tratamiento de aguas residuales y usos alternos de aguas tratadas en el Tecnológico de Monterrey I.T.E.S. M. campus Hidalgo**. Pachuca, México.
- Espigares G. M. y Moreno A. O. 1999. **Caracteres microbiológicos. Aguas envasadas. Usos recreativos del agua**. Capítulo 7. En: Estudio sanitario del agua, 2^{da} edición. Ed. Universidad de Granada, España. pp.115-127.
- Fawell J. K. 1995. **Guías para la Calidad Potable. Recomendaciones**. Vol. 1. Organización Mundial de la Salud. 2° ed. Ginebra. pp.1995.
- Fujioka R. S. y Yonoyama B. S. 2001. **Assessing the Vulnerability of Groundwater Sources to Fecal Contamination**. *Journal of the American Water Works Association*, pp. 62-71.
- Garrit J. M., Bell J. A. y Lilburn T. G. 2003. **Taxonomy outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2da edición. Springer Verlag, NY. pp. 397.
- Grabow W. O. K. 1996. **Pathogenic and indicator organisms in drinking water**. En: Seminario Microbiología de las Aguas de abastecimiento. Tomo II. Asociación Española de Abastecimientos de agua y Saneamiento. Madrid pp. 9-36.
- Hernández A. 2001. **Depuración y desinfección de aguas residuales**. Colección Seignor, numero 9. Colegio de I.C.C y P. Madrid. pp. 1151.
- Hernández A. 2002. **Manual de diseño de estaciones depuradoras de aguas residuales**. Colegio de ingenieros en caminos, canales y puertos. 2^{da} edición. España. pp. 225.

- Hill M. (2004). **Understanding environmental pollution**. 2nd edition. Cambridge University Press, UK. pp 486.
- Holt J. G, Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. y Williams S. T. 1994. **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore. pp 787.
- Lazarova V., Savoye P., Janex M. L., Blatchley III E. R. y Pommepuy M. 1999. **Advanced wastewater disinfection Technologies: State of the art and perspectives**. Wat. Sci. Tech. 40,4-5: 203-213.
- Margulis L. y Chapman M. 2009. **Kingdoms and domains. An Illustrated guide of the phyla of life on earth**. W. H. Freeman & Co, USA. pp 711.
- Martínez S. 2006. **Estudio de los géneros bacterianos Escherichia y Pseudomonas como indicadores de la calidad del agua residual tratada en una depuradora**. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. pp. 86.
- Moreno A. O. y Pérez L. J. A. 1999. **Análisis microbiológico del agua de consumo**. Capítulo 8. En: Estudio sanitario del agua, 2^{da} edición. Ed. Universidad de Granada, España. pp. 129-149.
- NCSS 2001 and PASS trial statistical and power analysis. USA.
- NMX-AA-003-1980. Aguas residuales muestreo. SEMARNAT.
- NMX-AA-007-SCFI-2000. Análisis de agua-determinación de la temperatura-en aguas naturales, residuales tratadas-método de prueba SCFI.
- NMX-AA-008-SCFI-2000. Análisis de agua- determinación del pH-método de prueba. SCFI.
- OPS-OMS. 1996. **La calidad del agua potable en América Latina. Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los subproductos de la desinfección química**. Washington D. C. Ilsi Press.
- Pérez L. J. A. y Fernández C. N. M. 1999. **Desinfección del agua**. Capítulo 13. En: Estudio sanitario del agua, 2^{da} edición. Ed. Universidad de Granada, España. pp. 235-250.
- Pérez L. J. A. y Espigares G. M. 1999. **Desinfección del agua. Cloración**. Capítulo 14. En: Estudio sanitario del agua, 2^{da} edición. Ed. Universidad de Granada, España. pp. 253-274.

- Pérez R., Sánchez J. M. y Borrego J. 1996. **Estudio comparativo de inactivación por desinfectantes de diferentes microorganismos detectados en aguas naturales.** En Seminario Microbiología de las Aguas de abastecimiento. Tomo I. Asociación Española de Abastecimientos de agua y Saneamiento. Madrid pp. 109-125.
- Poch E. M. 1999. **Las calidades del agua** 1ª edición. ED. Rubes, S. L. Barcelona, España. pp. 159.
- Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano. BOE 45. pp. 7228-7245.
- Romero M. 2005. **Experiencias en el uso de indicadores y bases de datos para el monitoreo de problemas de salud relacionados al agua en Cuba.** Taller de indicadores. D.F. pp. 29.
- Rutala W. y Weber D. 1997. **Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health care facilities.** *Clinical Microbiology Reviews.* 10, 4: 597-610.
- Stewart P. S., Rayner J., Roe F. y Rees W. M. 2001 **Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates.** *Journal of Applied Microbiology.* 91,525-532.
- Tebbutt T. H. Y. (2002). **Principles of water quality control.** 5ta edición. Butterworth-Heinemann, Oxford. pp. 289.
- Taylor da Cunha e Mello M. L., Giono C. S., de Haro A. I. y López V. Y. 2007. **Guía de bacteriología médica.** Mc Graw Hill. México. pp. 209
- Woese C., Kandler O. y Wheelis M. L. 1990. **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 87. pp. 4576-4579.
- World Health Organization (WHO). **Approaches to microbiological monitoring,** pagina de internet <http://www.who.int>, consultada en el año 2007.

IX.- Anexos

1.- Composición química de los agares y modo de preparación

Agar soya y tripticaseína (BBL, 1988)

Enzimas pancreáticas de caseína	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
pH	7.3 +0.2

Método de preparación:

Suspender 40 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por un minuto. Esterilizar a 121°C x 15 min y vaciar en cajas de Petri, conservar en refrigeración a una temperatura de 2°C a 8°C.

Agar McConkey (DIBICO, 2002)

Agar	13.5 g
Cloruro de sodio	5 g
Cristal violeta	0.001 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Peptona especial	3 g
Peptona de gelatina	17 g
Rojo neutro	0.03 g
pH	7.1 + 0.2

Método de preparación:

Suspender 50 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por un minuto. Esterilizar a 121°C x 15 min y vaciar en cajas de Petri, conservar en refrigeración a una temperatura de 2°C a 8°C.

Agar para *Pseudomonas* (DIBICO, 2002)

Gelatina reducida por enzimas pancreáticas	20 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10 g
Agar	13 g
pH	7.2 + 0.2

Método de preparación:

Suspender 45 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por un minuto. Esterilizar a 121°C x 15 min y vaciar en cajas de Petri, conservar en refrigeración a una temperatura de 2°C a 10°C.

Agar para *Enterococcus* (Difco, 1998)

Triptosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	2 g
Fosfato dipotásico	4 g
Azida sódica	0.4 g
Agar	10 g
Cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio	0.1 g
pH	7,2 + 0.2

Método de preparación:

Suspender 42 g del medio en un litro de agua destilada mezclar y calentar agitando hasta hervir por un minuto. No esterilizar en autoclave, vaciar a cajas Petri conservar.

Agar bilis rojo violeta (Difco, 1998)

Extracto de levadura	3g
Peptona de gelatina	7 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15 g
Rojo Neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
pH	7.4 +/- 0.2

Método de preparación:

Suspender 41.5 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente y hervir por un minuto. Enfriar de 42 a 44 °C y usar inmediato o esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

Agar métodos estándar (BBL, 1988)

Enzima pancreática de caseína	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g

Método de preparación:

Suspender 23.5 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación hasta hervir por 1 min. Esterilizar en autoclave a 121 °C X 15 min. Verter en cajas Petri y almacenar a una temperatura de 2°C a 10°C.

2.- Datos de bacterias mesófilas aerobias

Tabla A.2. Datos obtenidos del conteo de bacterias mesófilas aerobias, del agua de entrada, secundario y tratada

Muestreos	Agua		
	Entrada	Secundario	Tratada
3	5.97E+05	5.49E+04	0.00E+00
4	9.88E+05	5.55E+02	1.00E+02
5	5.61E+05	2.06E+05	2.84E+06
6	6.50E+04	5.15E+03	1.00E+02
7	2.54E+05	3.75E+04	1.50E+03
8	2.80E+04	6.50E+03	5.00E+01
9	1.44E+05	1.35E+04	1.20E+03
10	1.20E+05	2.00E+02	0.00E+00
11	1.20E+04	1.02E+04	2.00E+02
12	2.18E+05	7.15E+04	1.07E+05
13	3.95E+05	4.58E+04	5.35E+04
14	4.73E+05	1.15E+05	4.20E+04
15	1.57E+05	3.15E+04	2.42E+04
16	2.57E+05	5.15E+04	1.65E+04
17	2.63E+05	5.90E+04	1.95E+04
18	4.58E+05	1.02E+05	3.70E+04
19	5.33E+05	1.96E+05	2.15E+04
20	2.46E+03	2.00E+03	1.01E+03
Promedios	5.97E+05	5.50E+04	5.05E+01

3.- Datos de los muestreos

Para las siguientes tablas las abreviaturas empleadas corresponden a: CT, coliformes totales; E. c, *E. coli*; P. a., *P. aeruginosa* y E. f., *E. faecalis*.

Tablas A.3. Promedios de los triplicados de los 20 muestreos por bacterias y fechas en que fueron realizados.

MUESTREO NO 1
17 DE SEPTIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	inc	39	1	inc	26	63	68	26	6
	inc	42	2	inc	124	0	59	40	2
	inc	23	2	inc	98	0	37	34	1
		34.67	1.67		82.67	21	54.67	33.33	3
E.c	40	7	8	inc	20	4	inc	7	4
	18	6	5	inc	30	0	inc	11	2
	43	3	1	inc	20	0	inc	7	2
		33.67	5.33	4.67		23.33	1.33		8.33
P.a	11	23	10	15	27	15	98	28	25
	9	17	2	5	21	9	12	26	2
	3	22	0	7	0	15	1	0	10
		7.67	20.67	4.00	9.00	16.00	13.00	37.00	18.00
E.f	40	0	0	56	1	1	40	0	0
	40	0	0	67	2	7	40	0	0
	31	0	1	50	4	0	27	1	0
		37	0	0.33	57.67	2.33	2.67	35.67	0.33

MUESTREO NO 2
24 DE SEPTIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	59	45	63	103	30	0	39	0	0
	42	18	20	60	61	0	10	0	0
	27	10	8	82	15	0	25	0	35
		42.67	24.33	30.33	81.67	35.33	0.00	24.67	0.00
E.c	33	63	19	0	0	0	0	1	0
	72	76	2	35	0	12	35	4	0
	95	50	5	9	32	2	9	13	1
		66.67	63.00	8.67	14.67	10.67	4.67	14.67	6.00
P.a	1 (1) (1)	1 (1) (1)	2 (2) (2)	7 (2) (7)	10 (1) (10)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	4 (0) (4)	1 (1) (1)
	1 (1) (1)	1 (1) (1)	0	2 (0) (2)	7 (2) (7)	1 (1) (1)	0	1 (1) (1)	1 (1) (1)
	1 (1) (1)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	3 (1) (3)	11 (0) (11)	2 (2) (2)	3 (0) (3)	1 (1) (1)	1 (1) (1)
		1	1	1	1.33	1	1.33	0.33	0.67
E.f	3	0	7	5	2	0	0	1	4
	1	2	1	17	0	0	0	1	1
	0	0	0	5	0	0	0	0	1
		1.33	2	8	27	2	0	0	2

MUESTREO NO 3
01 DE OCTUBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	15	2	0	7	0	0	0	0	0
	26	0	0	3	0	0	0	0	0
	15	0	0	11	0	0	0	0	0
	18.67	0.67	0.00	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E.c	7	1	0	1	0	0	0	0	1
	6	3	0	1	0	0	0	0	0
	4	0	0	2	0	0	0	0	0
	5.67	1.33	0.00	1.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33
P.a	1(1)(1)	12(8)(13)	14(3)(14)	1(1)(1)	22(22)(22)	1(1)(1)	1(1)(1)	18(4)(18)	6(1)(6)
	1(1)(1)	26(12)(26)	5(2)(5)	1(1)(1)	6(3)(6)	1(1)(1)	15(2)(15)	1(1)(1)	1(1)(1)
	1(1)(1)	8(8)(8)	18(5)(18)	1(1)(1)	4(3)(4)	1(1)(1)	11(4)(11)	6(2)(6)	8(4)(8)
	1	9.33	0.36	1	9.33	1	2.33	2.33	2
E.f	49	0	0	10	0	0	0	0	0
	33	0	0	5	0	0	1	0	1
	45	0	0	7	0	1	0	0	1
	42.33	0.00	0.00	7.33	0.00	0.33	0.33	0.00	0.67

MUESTREO NO 4
08 DE OCTUBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	incontables	incontables	31	incontables	142	21	incontables	28	4
	incontables	incontables	45	incontables	98	27	incontables	38	0
	incontables	incontables	30	incontables	89	39	incontables	7	11
			35.33	0	109.67	29	0	24.33	5
E.c	incontables	incontables	49	incontables	45	8	incontables	4	0
	incontables	incontables	55	incontables	24	11	incontables	11	0
	incontables	incontables	53	incontables	60	16	incontables	7	0
			52.33		43	11.67		7.33	0
P.a	1(1)(1)	2(1)(2)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	2(0)(2)	1(1)(1)	1(1)(1)
	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	30(7)(30)	1(1)(1)	1(1)(1)
	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	1(1)(1)	4(2)(4)	1(1)(1)	1(1)(1)
	1	1	1	1	1	1	3	1	1
E.f	34	17	11	27	5	13	16	1	0
	38	15	4	22	3	7	27	2	0
	57	11	7	62	1	14	18	1	0
	43	14.33	7.33	37	3	11.33	20.33	1.33	0

MUESTREO NO 5
15 DE OCTUBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	1114	94	0	51	9	0	7	0	0
	1001	75	0	76	3	0	5	0	0
	989	116	7	89	0	0	0	0	0
	1034.67	95.00	2.33	72.00	4.00	0.00	4.00	0.00	0.00
E.c	978	48	0	72	0	0	3	0	0
	1200	34	0	31	1	0	0	0	0
	680	30	0	42	0	0	0	0	0
	952.67	37.33	0.00	48.33	0.33	0.00	1.00	0.00	0.00
P.a	1 (1) (1)	1 (1) (1)	3(1) (3)	25 (1) (25)	17 (2) (17)	5 (2) (5)	3 (2) (3)	7 (3) (7)	2 (2) (2)
	1 (1) (1)	16 (6) (16)	1 (0) (1)	2 (1) (2)	25 (4) (25)	14 (4) (12)	1 (1) (1)	8 (4) (8)	1 (1) (1)
	1 (1) (1)	27(8) (27)	28 (3) (28)	14 (3) (14)	11 (1) (11)	22 (8) (22)	10 (3) (10)	2 (0) (2)	3 (1) (3)
	1	5	1.33	1.00	2.33	4.67	2.00	2.33	1.33
E.f	58	13	0	0	0	0	0	0	0
	42	18	3	0	0	0	0	0	0
	73	25	1	0	0	0	0	0	0
	57.67	18.67	1.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

MUESTREO NO 6
22 DE OCTUBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.67	0	0	0	0	0	0	0	0
E.c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.a	26 (9) (26)	20 (3) (20)	11 (1) (11)	18 (8) (18)	30 (4) (30)	7 (3) (7)	17(1) (17)	33 (1) (33)	42 (9) (42)
	2 (2) (2)	10 (5) (10)	49 (7) (49)	15 (3) (15)	53 (8) (53)	22 (6) (22)	12 (5) (12)	14 (7) (14)	25 (8) (25)
	84 (10) (84)	41 (13) (41)	40 (14) (40)	40 (11) (40)	32 (6) (32)	23 (11) (23)	53 (4) (53)	18 (2) (18)	20 (11) (20)
	7	7	7.33	7.33	6	6.67	3.33	3.33	9.33
E.f	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

MUESTREO NO 7
29 DE OCTUBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	71	12	0	65	0	0	0	0	0
	170	8	0	52	0	0	4	0	0
	115	3	0	28	0	0	0	0	0
	118.67	7.67	0	48.33	0	0	1.33	0	0
E.c	66	0	0	27	0	1	0	0	0
	56	1	0	8	0	0	0	0	0
	70	0	0	0	0	0	0	0	0
	64	0.33	0	11.67	0	0.33	0	0	0
P.a	126 (15) (126)	13 (2) (13)	8 (1) (8)	35 (13) (35)	10 (1) (10)	18 (1) (18)	16 (4) (16)	10 (5) (10)	3 (2) (3)
	45 (3) (45)	6 (1) (6)	12 (3) (12)	13 (0) (13)	10 (6) (10)	6 (1) (6)	3 (0) (3)	9 (2) (9)	42 (3) (42)
	58 (4) (58)	9 (0) (9)	27 (8) (27)	8 (6) (8)	9 (2) (9)	30 (7) (30)	7 (0) (7)	16 (1) (16)	1 (1) (1)
	7.33	1	4	6.33	3	3	1.33	2.67	2
E.f	4	0	0	2	0	0	0	0	0
	13	0	0	1	1	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	1	0.33	0	0	0	0

MUESTREO NO 8
05 DE NOVIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	0	8	0	0	0	0	0	0	0
	0	75	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	27.67	0	0	0	0	0	0	0
E.c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.a	10 (2) (10)	13 (5) (13)	1 (1) (1)	10 (1) (10)	1 (0) (1)	9 (0) (9)	5 (1) (5)	3 (0) (3)	2 (0) (2)
	6 (1) (6)	8 (1) (8)	1 (0) (1)	6 (3) (6)	9 (2) (9)	9 (4) (9)	12 (6) (12)	8 (3) (8)	2 (1) (2)
	6(0) (6)	5 (0) (5)	6 (2) (6)	8 (4) (8)	13 (2) (13)	18 (3) (18)	11 (2) (11)	12 (1) (12)	12 (1) (12)
	1	2	0.67	2.67	1.33	2.33	3.00	1.33	0.67
E.f	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 9
12 DE NOVIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	65	31	10	2	0	0	0	0	0
	76	25	21	0	0	0	0	0	0
	86	29	13	5	0	0	0	0	0
	75.67	28.33	14.67	2.33	0	0	0	0	0
E.c	67	23	12	3	0	0	0	0	0
	45	19	8	5	0	0	0	0	0
	82	21	15	2	0	0	0	0	0
	64.67	21.00	11.67	3.33	0	0	0	0	0
P.a	14 (2) (14)	21(1) (21)	9 (1)(9)	5 (0) (5)	9 (2) (9)	10 (1) (10)	7 (4) (7)	5 (2) (5)	9 (2) (9)
	9 (0) (9)	29 (3) (23)	1 (1) (1)	3(1) (3)	7 (0) (7)	5 (0) (5)	9 (1) (9)	8 (0) (8)	11 (1) (11)
	27(6) (27)	11 (4) (11)	16 (2) (16)	8 (2) (8)	6 (4) (6)	11 (3) (11)	5 (3) (5)	12 (6) (12)	6 (0) (6)
	2.67	2.67	1.33	1.00	2.00	1.33	2.67	2.67	1.00
E.f	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	2	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.67	0.67	0	0.33	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 10
21 DE NOVIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	13	9	0	0	0	0	0	0	0
	16	9	0	0	0	0	0	0	0
	28	4	0	0	0	0	0	0	0
	19	7.33	0	0	0	0	0	0	0
E.c	15	9	0	0	0	0	0	0	0
	21	11	0	0	0	0	0	0	0
	14	18	0	0	0	0	0	0	0
	16.67	12.67	0	0	0	0	0	0	0
P.a	14 (8) (14)	21 (2) (21)	32 (5) (32)	10 (1) (10)	6 (0) (6)	16 (2) (16)	3 (1) (3)	4 (4) (4)	3 (1) (3)
	23 (15) (23)	9 (1) (9)	29 (0) (29)	7 (4) (7)	5 (2) (5)	2 (2) (2)	7(0) (7)	10 (2) (10)	5 (5) (5)
	28 (3) (28)	11 (0) (11)	18 (8) (18)	9 (0) (9)	6 (1) (6)	4 (1) (4)	5 (4) (5)	5 (2) (5)	7(0) (7)
	8.6	1	4.3	1.66	1	1.66	1.66	2.66	2
E.f	3	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.67	0	0	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 11
28 DE NOVIEMBRE DEL 2007

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
E.c	1.33	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0	0	0	0
P.a	0	0	3	0	0	0	0	0	0
	0	0.67	1	0	0	0	0	0	0
	19 (0) (19)	24 (7) (24)	10 (4) (10)	7 (0) (7)	5 (1) (5)	4 (4) (4)	9 (1) (9)	3(0) (3)	3(1) (3)
E.f	8 (5) (8)	17 (11) (17)	16 (9) (16)	3 (1) (3)	5 (3) (5)	8 (2) (8)	7 (2) (7)	3 (3) (3)	2 (1) (2)
	4 (0) (4)	11 (9) (11)	19 (9) (16)	6(0) (6)	8 (8) (8)	6 (3) (6)	8 (6) (8)	1(0) (1)	3 (1) (3)
	1.66	9	7.33	0.33	4	3	3	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	1	0	2	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0.33	0	0.67	0	0	0	0.33	0

MUESTREO NO 12
22 DE ENERO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	767	976	114	123	67	54	58	22	19
	564	443	175	145	59	51	67	25	6
	744	421	111	116	44	38	32	43	8
E.c	691.67	613.33	133.33	128.00	56.67	47.67	52.33	30.00	11.00
	989	785	212	113	132	66	75	23	9
	1101	666	321	99	76	51	34	11	12
	990	371	211	104	84	49	55	19	7
P.a	1026.67	607.33	248.00	105.33	97.33	55.33	54.67	17.67	9.33
	99 (29) (99)	23 (2) (23)	55 (8) (55)	11 (8) (11)	28 (4) (28)	17 (15) (17)	4 (0) (4)	48 (11) (48)	9 (6) (9)
	78 (0) (78)	1 (1) (1)	31 (3) (31)	7 (0) (7)	18 (9) (18)	9 (0) (9)	1 (1) (1)	17 (2) (17)	2 (2) (2)
E.f	90 (11) (90)	15 (0) (15)	19 (0) (19)	1 (1) (1)	15 (0) (15)	2 (2) (2)	1 (1) (1)	11 (6) (11)	1 (0) (1)
	13.33	1	3.66	3	4.33	5.66	0.66	6.33	2.66
	21	9	3	2	0	0	0	0	0
	15	14	3	1	0	0	0	0	0
	11	6	1	1	0	0	0	0	
	15.67	9.67	2.33	1.33	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 13
30 DE ENERO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	345	321	199	254	112	54	59	45	23
	543	119	196	201	109	78	78	32	31
	789	209	122	232	96	56	55	34	30
	559	216.33	172.33	229	105.67	62.67	64	37	28
E.c	774	511	285	267	211	199	76	32	32
	601	392	119	205	177	158	56	55	37
	642	123	128	308	122	133	81	57	46
	672.33	342.00	177.33	260.00	170.00	163.33	71.00	48.00	38.33
P.a	56 (2) (56)	39 (1) (39)	44 (22) (44)	58 (1) (58)	41 (13) (41)	67 (34) (67)	29 (3) (29)	11 (2) (11)	8 (0) (8)
	79 (23) 79	23 (11) (23)	39 (12) (39)	69 (10) (69)	31 (21) (21)	49 (24) (49)	19 (2) (19)	9 (0) (9)	4 (1) (4)
	44 (10) (44)	45 (23) (45)	78 (11) (78)	89 (4) (89)	28 (4) (28)	39 (1) (39)	16 (0) (16)	5 (3) (5)	5 (0) (5)
	11.66	11.66	15	5	12.66	19.66	1.66	1.66	0.33
E.f	23	16	17	3	0	0	0	0	0
	22	17	11	3	1	0	0	0	0
	15	23	5	0	0	0	0	0	0
	20	18.67	11	2	0.33	0	0	0	0

MUESTREO NO 14
06 DE FEBRERO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	111	99	78	47	43	31	22	27	11
	105	115	67	87	50	39	17	11	11
	78	63	55	55	31	28	9	4	14
	98	92.33	66.67	63	41.33	32.67	16	14	12
E.c	145	109	56	43	29	21	10	7	9
	321	89	89	55	31	19	8	8	6
	111	74	58	69	40	15	12	10	4
	192.33	90.67	67.67	55.67	33.33	18.33	10.00	8.33	6.33
P.a	94 (18) (94)	79 (23) (79)	45 (8) (45)	57 (11) (57)	34 (1) (34)	56 (2) (56)	16 (1) (16)	17 (1) (17)	9 (4) (9)
	78 (5) (78)	67 (1) (67)	40 (4) (40)	21 (1) (21)	39 (0) (34)	22 (0) (22)	19 (4) (19)	18 (0) (18)	9 (1) (9)
	77 (16) (77)	59 (19) (59)	33 (0) (33)	29 (0) (29)	31 (1) (31)	26 (3) (26)	24 (5) (24)	12 (0) (12)	4 (0) (4)
	9.66	14.33	4	4	0.66	1.66	3.33	0.33	1.66
E.f	4	3	4	0	0	1	0	0	0
	7	3	0	2	0	0	0	0	0
	5	1	2	0	0	0	0	0	0
	5.33	2.33	2	0.67	0	0.33	0	0	0

MUESTREO NO 15
13 DE FEBRERO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	34	41	21	21	11	11	4	3	0
	37	22	20	20	6	7	6	3	2
	27	25	11	15	11	3	3	1	1
	32.67	29.33	17.33	18.67	9.33	7.00	4.33	2.33	1.00
E.c	76	55	59	44	39	27	21	9	2
	55	69	67	49	40	22	13	5	1
	79	61	50	31	25	24	19	6	5
	70	61.67	58.67	41.33	34.67	24.33	17.67	6.67	2.67
P.a	101 (9) (101)	88 (16) (88)	62 (4) (62)	70 (8) (70)	42 (3) (42)	30 (4) (30)	27 (2) (27)	19 (0) (19)	10 (2) (10)
	76 (2) (76)	71 (0) (71)	54 (1) (54)	31 (0) (31)	38 (10) (38)	29 (1) (29)	24 (1) (24)	16 (2) (16)	14 (5) (14)
	89 (21) (89)	91 (12) (91)	59 (9) (59)	69 (11) (69)	33 (7) (33)	24 (0) (24)	15 (2) (15)	11 (1) (11)	5 (0) (5)
	10.66	9.3	4.66	6.33	6.66	1.66	1.66	1	2.33
E.f	3	1	1	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	0	0	0	0	0	0	0
	2.67	1	0.33	0	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 16
22 DE FEBRERO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	78	83	40	32	19	12	0	0	0
	55	71	31	26	11	20	0	0	0
	64	39	38	27	16	7	0	0	0
	65.67	64.33	36.33	28.33	15.33	13.00	0	0	0
E.c	99	77	33	22	11	9	7	0	0
	56	86	29	29	38	11	11	0	0
	78	34	65	46	21	28	4	0	0
	77.67	65.67	42.33	32.33	23.33	16.00	7.33	0	0
P.a	53 (8) (53)	44 (11) (44)	29 (5) (29)	19 (1) (19)	11 (1) (11)	1 (1) (1)	5 (0) (5)	8 (1) (8)	1 (1) (1)
	41 (6) (41)	21 (1) (21)	20 (9) (20)	22 (0) (22)	17 (2) (17)	8 (3) (8)	9 (1) (9)	7 (1) (7)	1 (1) (1)
	59 (0) (59)	70 (23) (70)	35 (14) (35)	14 (0) (14)	6 (1) (6)	2 (1) (2)	1 (0) (1)	1 (1) (1)	1 (1) (1)
	4.66	11.66	9.33	0.33	1.33	1.66	0.33	1	1
E.f	9	11	3	1	0	0	0	0	0
	9	4	3	0	1	0	0	0	0
	5	8	4	0	0	0	0	0	0
	7.67	7.67	3.33	0.33	0.33	0	0	0	0

MUESTREO NO 17
07 DE MARZO DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	101	45	22	16	11	8	2	1	1
	89	33	19	12	10	8	7	6	4
	99	31	24	22	15	6	10	4	1
	96.33	36.33	21.67	16.67	12.00	7.33	6.33	3.67	2.00
E.c	77	40	33	30	21	11	7	4	2
	70	34	41	28	22	9	5	6	2
	11	66	50	26	18	7	10	7	1
	52.67	46.67	41.33	28.00	20.33	9.00	7.33	5.67	1.67
P.a	1 (1) (1)	21 (8) (21)	10 (9) (10)	24 (8) (24)	4 (0) (4)	3 (3) (3)	7 (3) (7)	19 (3) (19)	2 (2) (2)
	11 (2) (11)	29 (2) (29)	14 (0) (14)	19 (15) (19)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	6 (4) (6)	9 (8) (9)	1 (0) (0)
	24 (4) (24)	4 (4) (4)	17 (4) (17)	9 (8) (9)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	23 (16) (23)	3 (0) (3)	11 (3) (11)
	2.33	4.66	4.33	10.33	0.66	1.66	7.66	3.66	1.66
E.f	8	4	1	1	0	0	0	0	0
	6	3	2	1	0	0	0	0	0
	8	3	1	1	0	0	0	0	0
	7.33	3.33	1.33	1	0	0	0	0	0

MUESTREO NO 18
01 DE ABRIL DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	79	43	41	26	35	9	1	4	0
	138	99	13	41	27	10	16	2	0
	115	50	43	20	14	14	11	1	0
	110.67	64.00	32.33	29.00	25.33	11.00	9.33	2.33	0
E.c	111	39	9	22	19	7	4	8	1
	88	20	28	24	6	10	9	3	0
	91	19	30	11	13	12	3	1	0
	96.67	26.00	22.33	19.00	12.67	9.67	5.33	4.00	0.33
P.a	99 (23) (99)	51 (7) (51)	39 (4) (39)	28 (7) (28)	20 (1) (20)	15 (0) (15)	1 (0) (1)	3 (1) (3)	6 (0) (6)
	75 (8) (75)	49 (10) (49)	48 (9) (49)	21 (3) (21)	18 (6) (18)	22 (2) (22)	39 (6) (39)	5 (0) (5)	2 (1) (2)
	80 (19) (80)	58 (6) (58)	35 (0) (35)	39 (11) (39)	13 (6) (13)	29 (6) (29)	21 (6) (21)	11 (0) (11)	2 (0) (2)
	16.66	7.66	4.33	7	4.33	2.66	4	0.33	0.33
E.f	59	20	12	38	11	0	11	1	0
	75	19	26	23	11	0	5	3	0
	61	13	13	19	14	0	1	2	0
	65	17.33	17	26.67	12	0	5.67	2	0

MUESTREO NO 19
04 DE ABRIL DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	222	199	98	55	45	33	30	19	4
	209	177	90	44	48	23	10	12	4
	254	156	79	88	40	21	22	9	2
	228.33	177.33	89.00	62.33	44.33	25.67	20.67	13.33	3.33
E.c	199	99	31	44	22	7	9	11	2
	178	89	77	39	29	26	20	13	2
	201	67	89	21	11	21	20	2	9
	192.67	85.00	65.67	34.67	20.67	18.00	16.33	8.67	4.33
P.a	111 (29) (111)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	16 (4) (16)	15 (3) (815)	17 (7) (17)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	1 (0) (1)
	99 (12) (99)	1 (1) (1)	1(0) (1)	22 (2) (22)	9 (0) (9)	1 (1) (1)	5 (1) (5)	1 (0) (1)	1 (0) (0)
	23 (8) (23)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	19 (11) (19)	6 (0) (6)	1 (1) (1)	1 (1) (1)	3 (1) (3)	2 (2) (2)
	16.33	1	0.66	5.66	1	3	1	0.66	0.66
E.f	77	20	26	11	11	1	12	0	0
	64	21	29	28	9	3	1	0	0
	33	23	49	10	8	3	3	0	0
	58	21.33	34.67	16.33	9.33	2.33	5.33	0	0

MUESTREO NO 20
22 DE ABRIL DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
CT	128	77	32	99	73	15	60	21	3
	111	72	28	128	79	10	68	16	1
	92	69	20	69	52	10	52	19	4
	110.33	72.67	26.67	98.67	68.00	11.67	60.00	18.67	2.67
E.c	98	82	3	99	65	0	28	12	0
	77	91	3	115	48	2	22	7	0
	101	87	1	83	37	3	35	9	1
	92	86.67	2.33	99.00	50	1.67	28.33	9.33	0.33
P.a	inc(19)	inc(10)	69(2)	110(8)	72(3)	22(2)	inc(2)	18(2)	11(0)
	inc(25)	inc(5)	52(1)	98(2)	60(5)	31(2)	101(2)	21(4)	11(4)
	inc(20)	inc(7)	58(5)	125(4)	50(0)	27(2)	90(3)	27(1)	9(1)
	21.33	7.33	2.66	4.66	2.66	2	2.33	2.33	1.66
E.f	151	39	14	89	18	0	49	14	0
	156	50	16	66	23	4	60	0	1
	139	64	10	84	18	2	72	16	0
	148.67	51.00	13.33	79.67	19.67	2.00	60.33	10.00	0.33

4.- Datos de bacterias certificadas

Tabla A.4. Resultados de ensayos de desinfección de cepas certificadas.

MUESTREO BACTERIAS CERTIFICADAS
23 DE ABRIL DEL 2008

	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
E.c	17	0	0	12	4	8	10	16	7
	22	9	3	0	11	1	1	2	9
	0	14	11	9	5	0	3	4	1
	5.667	4.667	3.667	7.000	3.000	2.667	4.333	6.667	2.667
P.a	22.000	8.000	6.000	12.000	21.000	15.000	21.000	6.000	10.000
	26.000	1.000	5.000	8.000	8.000	3.000	17.000	2.000	9.000
	9.000	14.000	14.000	16.000	16.000	6.000	10.000	7.000	4.000
	10.333	7.333	6.667	9.333	12.333	7.000	10.333	4.333	4.667
E.f	12.000	9.000	4.000	2.000	0.000	0.000	3.000	0.000	0.000
	6.000	8.000	1.000	2.000	2.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	4.667	3.333	1.333	0.667	0.333	0.000	1.000	0.000	0.000

Valores medios de bacterias certificadas

Microorganismos	8 mg/l			20mg/l			30mg/l		
	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30	T=0	T=20	T=30
<i>E. coli</i> ATCC 35218	5.66	4.66	3.66	5.66	3	2.6667	4.33	6.66	3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19433	10.33	7.33	6.66	9.33	12.33	7	10.33	4.33	4.66
<i>E. faecalis</i> ATCC 10145	4.66	3.33	1.33	0.66	0.33	0	1	0	0

5.- Equipos y aparatos utilizados en la parte experimental

Parrilla de agitación y calentamiento

Marca Termo Line, Modelo SP46925, N.S 1069990763200.

Potenciómetro

Marca, Hanna, Modelo pH 211, N.S. 378099

Micropipeta de 10 a 100 µl

Marca Biohit, N.S. AU34950

Estufa de Cultivo

Marca Riossa, Modelo E-51, N.S. EO51

Autoclave

Marca American, N.S. 0003877

Lámpara de luz ultravioleta

Marca Espectroline, Modelo ENF-240 C, N.S 116110

Cuenta colonias

Marca Solbat, Modelo Q20, N.S. 2275.