

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *ESCHERICHIA COLI SP* A PARTIR DEL  
DESINFECTANTE OBTENIDO POR ELECTRÓLISIS DE CLORURO DE SODIO

LUZ ANGGIE VELÁSQUEZ GONZÁLEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C.  
2018

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *ESCHERICHIA COLI SP* A PARTIR DEL  
DESINFECTANTE OBTENIDO POR ELECTRÓLISIS DE CLORURO DE SODIO

LUZ ANGGIE VELÁSQUEZ GONZÁLEZ

Proyecto integral de grado para optar por el título de  
INGENIERO QUÍMICO

Directora  
DIANA MARCELA CUESTA PARRA  
Ingeniera Ambiental

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C.  
2018

Nota de Aceptación (Subdirector Operativo de Investigación)

---

---

---

---

---

Firma Docente Investigador

---

Firma Docente Jurado 1

---

Firma Docente Jurado 2

Bogotá D.C., Agosto 2018

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

**Dr. JAIME POSADA DÍAZ**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA – PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Decano de Facultad de Ingenierías

**Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director General de Investigación y Proyección Social

**Ing. MANUEL CANCELADO JIMÉNEZ**

Director Programa de Ingeniería Química

**ING. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá Rousmary, mi hermana Luisa y mi abuelita Rosalba, por su amor y apoyo incondicional. Es una bendición tenerlas en mi vida.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 POTABILIZACIÓN DE AGUA	23
1.2 DESINFECTANTES A BASE DE CLORO	24
1.2.1 Hipoclorito de sodio	27
1.2.1.1 Estructura	28
1.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas	28
1.3 PRODUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DE HIPOCLORITO DE SODIO	30
1.4 MICROORGANISMOS EN EL AGUA	32
1.5 BACTERIAS EMPLEADAS COMO BIO-INDICADORES DE CALIDAD DE AGUA	34
1.6 DESTRUCCIÓN BACTERIANA AL CONTACTO CON UN DESINFECTANTE CLORADO	35
1.7 FILTRACIÓN POR MEMBRANA	37
2. METODOLOGÍA	39
2.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA DENTRO DEL PROCESO DE DESINFECCIÓN	39
2.1.1 Temperatura del agente oxidante	39
2.1.2 pH del agente oxidante	40
2.1.3 Concentración del agente oxidante	42
2.1.4 Tiempo de contacto	45
2.1.5 Concentración de la bacteria	45
2.1.6 Agitación	46
2.1.7 Degradación del hipoclorito de sodio	46
2.2 SELECCIÓN DE VARIABLES Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS	47
2.2.1 Selección de variables	47
2.2.1.1 Variables de evaluación	47
2.2.1.2 Variable de control	48
2.2.2 Diseño de experimentos	48
2.3 METODOLOGÍA DE LA OBTENCIÓN DEL AGENTE CLORADO POR ELECTRÓLISIS DE CLORURO DE SODIO	49
2.3.1 Método colorimétrico de la DPD	52
2.3.1.1 Curva de calibración	52
2.4 METODOLOGÍA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA BACTERIA <i>Escherichia coli</i>	54
2.4.1 Duplicación bacteriana	54
2.4.2 Patrón de McFarland	54

2.4.3 Preparación inóculo	56
2.4.4 Neutralización del cloro con tiosulfato de sodio	56
2.4.5 Filtración por membrana	57
2.4.6 Recuento en placa	58
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	60
3.1 OBTENCIÓN DEL AGENTE CLORADO	60
3.1.1 Curva de calibración	60
3.1.2 Concentración del agente clorado	61
3.2 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE <i>E. coli</i>	62
3.2.1 Volumen de hipoclorito de sodio	62
3.2.2 Neutralización con tiosulfato de sodio	63
3.2.3 Recuento en placa	64
3.2.4 Porcentaje de inhibición	64
3.2.5 Análisis de resultados	66
3.2.6 Análisis estadístico	68
4. CONCLUSIONES	71
5. RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	79

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Patrones de McFarland.	55
Tabla 2. Datos curva de calibración.	60
Tabla 3. Volumen de tiosulfato de sodio al 10% requerido en la decoloración.	63
Tabla 4. Comparación % inhibición.	68
Tabla 5. ANOVA.	69
Tabla 6. Estadísticas.	69

## LISTA DE GRÁFICAS

	<b>pág.</b>
Gráfica 1. Curva de calibración.	60
Gráfica 2. Porcentajes de inhibición.	67

## LISTA DE IMÁGENES

	<b>pág.</b>
Imagen 1. Equipo de filtración por membrana.	38
Imagen 2. Filtro de membrana.	38
Imagen 3. Celda electrolítica.	50
Imagen 4. Proceso de electrólisis.	51
Imagen 5. Medición espectrofotómetro.	54
Imagen 6. Comparación de turbidez.	55
Imagen 7. Agitación de muestras.	56
Imagen 8. Caja sembrada.	58
Imagen 9. Filtro de membrana.	58
Imagen 10. Blanco y solución para determinación de cloro residual libre.	62
Imagen 11. Control positivo de la experimentación.	65
Imagen 12. Crecimiento bacteriano en las cajas resultantes.	67

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Estados del cloro	26
Figura 2. Curva de demanda del cloro.	27
Figura 3. Estructura hipoclorito de sodio.	28
Figura 4. Esquema de una celda electrolítica	31
Figura 5. Efecto de la temperatura en el proceso de electrólisis.	40
Figura 6. Distribución del cloro a diferentes pH.	42
Figura 7. Degradación a diferentes temperaturas de una solución de NaOCl al 12.5%.	44
Figura 8. Degradación a diferentes temperaturas de una solución de NaOCl al 15%.	44
Figura 9. Diluciones seriadas.	59
Figura 10. Interacción de las variables.	70
Figura 11. Comportamiento de las variables.	70

## LISTA DE CUADROS

	<b>pág.</b>
Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del hipoclorito de sodio	29
Cuadro 2. Diseño de experimentos.	49
Cuadro 3. Resultados fase I.	49
Cuadro 4. Parámetros de operación para la electrólisis.	51
Cuadro 5. Soluciones curva de calibración.	53
Cuadro 6. Unidades formadoras de colonia presentes.	64
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición.	66

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Matriz de revisión bibliográfica.	80
Anexo B. Protocolo electrólisis.	81
Anexo C. Construcción curva de calibración.	82
Anexo D. Medio de cultivo – Agar nutritivo.	83

## LISTA DE ECUACIONES

	<b>pág.</b>
Ecuación 1. Curva de calibración	61
Ecuación 2. Determinación de volumen	63
Ecuación 3. Porcentaje de inhibición	65

## ABREVIATURAS

**I:** intensidad de corriente (A)

**RPM:** revoluciones por minuto

**T:** temperatura (K)

**t:** tiempo (s)

**UFC:** unidades formadoras de colonias (UFC/mL)

## GLOSARIO

**AGENTE OXIDANTE:** en las reacciones de óxido-reducción, un agente oxidante es aquella sustancia que causa la oxidación de otra sustancia, por lo cual recibe los electrones liberados por la especie que se oxida disminuyendo así su número de oxidación, es por esto que es considerado como la especie que se reduce<sup>1</sup>.

**AGUA POTABLE:** se define como un agua que no posee contaminantes físicos, químicos ni biológicos en cantidades que puedan llegar a afectar la salud del consumidor y por lo cual se le puede considerar como un agua apta para el consumo humano<sup>2</sup>.

**AGUA SINTÉTICA:** agua preparada en el laboratorio de acuerdo a las necesidades experimentales.

**COLORO RESIDUAL LIBRE:** es aquella cantidad de cloro que puede llegar a estar presente en un agua después de realizar un proceso de desinfección, se encuentra en forma de ácido hipocloroso o ion hipoclorito mediante reacciones de tipo químico o biológico<sup>3</sup>.

**COLIFORMES:** son bacterias Gram negativas de morfología bacilar de tipo aerobio o anaerobio facultativo las cuales no forman espora y presentan entre si ciertas características bioquímicas en común, se utilizan como indicadores microbiológicos de contaminación para las aguas de consumo humano<sup>4</sup>.

**ELECTRÓLISIS:** es un proceso en el cual se impulsan las reacciones de óxido-reducción que no son espontáneas mediante una fuente externa de energía eléctrica que facilite el intercambio de electrones entre los átomos de las sustancias presentes en el proceso y de esta forma poder separar las moléculas en forma de iones<sup>5</sup>.

***Escherichia coli:*** es una bacteria aerobia Gram negativa de corto tamaño, no esporulada, perteneciente al grupo de bacilos, la cual está presente en el tracto intestinal de humanos o animales, pertenece a la familia de bacterias entéricas

---

<sup>1</sup> ATKINS, Peter y JONES, Loretta. Chemical Principles. The quest for insight. 5 ed. New York: W. H. FREEMAN AND COMPANY. 2009. p. F81.

<sup>2</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Decreto No. 1575 de 2007. (9, mayo, 2007). Por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano. Bogotá D.C., 2007. p. 1.

<sup>3</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Resolución 2115. (22, junio, 2007). Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Bogotá D.C., 2007. p. 1.

<sup>4</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Op. cit., p. 1.

<sup>5</sup> BROWN, Theodore, *et al.* Química. La ciencia central.11 ed. México: PEARSON EDUCATION, 2009. p. 851. ISBN 978-607-442-021-0.

(*Enterobariaeae*) y es el principal indicador microbiológico de contaminación fecal en las muestras de agua para consumo humano<sup>6-7</sup>.

**INHIBICIÓN:** hace referencia a detener el crecimiento y las funciones vitales de los microorganismos con el fin de evitar su desarrollo y proliferación.

**INOCULACIÓN:** se refiere a la incorporación de microorganismos dentro de un medio de cultivo que posee las características adecuadas y se puede encontrar en estado sólido o líquido, por mecanismos artificiales con el objetivo de dar inicio a un cultivo bacteriano que se desarrolle y multiplique<sup>8</sup>.

**ISOTÓNICO:** es aquel medio donde la concentración de soluto es la misma a ambos lados de la membrana de una célula.

**MICROORGANISMOS ENTÉRICOS:** son bacterias aerobias, Gram negativas de forma bacilar que habitan en la flora intestinal de los mamíferos, aves, peces, reptiles y humanos.<sup>9</sup>

---

<sup>6</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Op. cit., p. 2.

<sup>7</sup> CAMACHO, A., *et al.* Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP) [en línea]. Facultad de Química. UNAM. 2009 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP\\_6529.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf)>.

<sup>8</sup> SANTAMBROSIO, Eduardo. Cátedra de biotecnología. Siembra y recuento de microorganismos [en línea]. Facultad Regional Rosario. 2009 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicolll.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicolll.pdf)>.

<sup>9</sup> PACHÓN D. A.; PULIDO A. P. y MORENO C. A. Aislamiento e identificación de microorganismos entéricos en muestras ambientales y cloacales en *Crocodylus intermedius* y Testudines de la estación de biología tropical Roberto Franco en Villavicencio, Colombia. En: Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Febrero, 2010. vol. 57, p. 23.

## RESUMEN

La evaluación de la inhibición de *Escherichia coli* a partir del desinfectante obtenido por electrólisis de cloruro de sodio, corresponde a la segunda fase de un proyecto de investigación que se fundamenta en la “Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable”<sup>10</sup>, en esta etapa investigativa, se busca determinar si el desinfectante obtenido tiene la capacidad de inhibir la bacteria *Escherichia coli*, la cual es un indicador microbiológico de contaminación fecal en aguas de consumo.

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en tres fases, en la primera se realizó una revisión bibliográfica que permitiera identificar las variables que afectan la evaluación de la capacidad de inhibición que posee el agente oxidante obtenido, con el fin de realizar una selección de los factores que tienen mayor incidencia en el proceso. Esto permitió construir un diseño de experimentos factorial de orden 24, el cual tiene como factores la concentración del agente oxidante y el tiempo de contacto de este con la muestra a tratar.

En la segunda fase, se obtuvo el agente oxidante replicando las condiciones obtenidas en la fase I, concentración de cloruro de sodio de 27 g/L, agitación a 300 RPM, densidad de corriente de 4.84 A y un tiempo de operación de 20 minutos mediante el proceso de electrólisis, alcanzando una concentración de 3.87 g/L de hipoclorito de sodio analizado como cloro residual libre<sup>11</sup>.

En la tercera fase, se realizó la evaluación de la capacidad de inhibición del desinfectante obtenido usando como bio-indicador la bacteria *Escherichia coli*. Se aplicó el agente oxidante en muestras de agua sintética, inoculada con el microorganismo hasta alcanzar el patrón 2 de McFarland, mediante agitación a 150 RPM. Empleando las técnicas de filtración por membrana y recuento en placa se determinó que el hipoclorito de sodio en concentraciones mayores a 80 ppm por un tiempo mínimo de 15 minutos, presenta un porcentaje de inhibición de coliformes fecales de 100%. Los resultados fueron evaluados mediante un análisis estadístico de varianza de doble vía donde se identificó la incidencia de la concentración del agente oxidante, el tiempo de contacto y la interacción de estos factores, sobre la capacidad de inhibición que posee el agente clorado.

**Palabras clave:** electrólisis, desinfección, hipoclorito de sodio, inhibición, *Escherichia coli*.

---

<sup>10</sup> HERNÁNDEZ SALAMANCA, Andrés Camilo; TAFUR LOGREIRA, Javier Santiago. Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable. Tesis de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017. 174 p.

<sup>11</sup> Ibid., p. 128.

## INTRODUCCIÓN

El agua es una de las bases fundamentales de las economías a nivel mundial, en concordancia con la UNESCO, es empleada en ocho grandes sectores que dependen de su uso así como de diversos recursos naturales, entre estos se encuentran: agricultura, mantenimiento de bosques, pesca, energía, producción con uso intensivo de recursos, reciclaje, construcción y transportes. Un tratamiento de agua, junto con la selección de la fuente y su distribución mejoran notablemente la calidad de vida de las personas, las economías sociales de los países, las condiciones laborales y la inclusión social<sup>12</sup>. Actualmente en la población mundial se estima que 844 millones de personas carecen de un servicio básico de agua potable y al menos 2.000 millones de personas utilizan fuentes de agua potable contaminada con heces<sup>13</sup>, en Colombia, hay 318 municipios que están en riesgo de desabastecimiento de agua a causa de factores como la gran contaminación en ríos, la dificultad de extraer agua de los pozos subterráneos y el crecimiento desmedido de la población<sup>14</sup>, de igual forma el 28% de la población rural actual tiene problemas críticos por falta de acueducto, adicionalmente, solo el 15,1% de la población Colombiana utiliza agua en las condiciones aptas de consumo, el 43,6% usa agua con bajos estándares de calidad y el 23,3% utiliza agua cruda tomada directamente de las fuentes<sup>15</sup>.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se puede indicar que gran cantidad de la población mundial está expuesta al consumo de agua con bajos estándares de calidad, la cual presenta contaminantes físicos, químicos y microbiológicos que representan un riesgo para la salud de los seres humanos, por tal motivo, se han realizado diversos tratamientos mediante los cuales se logra la potabilización y desinfección de aguas residuales, con el fin de llegar a obtener aguas potables que cuenten con la calidad mínima requerida de acuerdo a la normatividad estipulada en cada país. Si se analiza la contaminación por agentes microbianos, específicamente las bacterias, se puede determinar que son los causantes de diversas enfermedades que afectan a los seres humanos, tales como la diarrea, el

---

<sup>12</sup> WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo 2016: Agua y empleo. París: UNESCO; 2016. p. 2. ISBN 978-92-3-300035-3.

<sup>13</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Drinking-water [en línea]. 07 de febrero de 2018 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>>.

<sup>14</sup> RUBIANO, María Paula. Colombia hace parte de la mitad del mundo amenazada por la escasez de agua [en línea]. BLOGS EL ESPECTADOR: El río. Bogotá D.C., 26 de abril de 2017. párr. 6 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://blogs.elespectador.com/actualidad/el-rio/colombia-parte-la-mitad-del-mundo-amenazada-la-escasez-agua>>.

<sup>15</sup> AVILA JIMÉNEZ, Cristian. ¿Cómo es el avance en la cobertura de acueducto en Colombia? [en línea]. EL TIEMPO. Bogotá D.C., 23 de marzo de 2015 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-15445939>>.

cólera, la hepatitis A, entre otras, las cuales atacan principalmente a niños menores de cinco años y pueden llegar a causar la muerte<sup>16</sup>.

Teniendo en cuenta esta problemática y sus efectos sobre la salud de los seres humanos, el grupo de investigación Ambiente y Hábitat de la Fundación Universidad de América planteó el desarrollo de dos proyectos que en conjunto permitirán obtener un agente oxidante obtenido a partir de materias primas de bajo costo y de fácil acceso para personas que no cuentan con la disponibilidad del recurso hídrico potable.

---

<sup>16</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Relación del agua, el saneamiento y la higiene con la salud [en línea]. Noviembre de 2004 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/facts2004/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/facts2004/es/)>.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición de *Escherichia coli sp* a partir del desinfectante obtenido por electrólisis de cloruro de sodio.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir los factores que influyen en la acción antimicrobiana dentro el proceso de desinfección.
- Obtener el agente clorado a partir de cloruro de sodio por el método de electrólisis.
- Evaluar la capacidad de inhibición de la bacteria *Escherichia coli sp* que posee el desinfectante obtenido.

## 1. GENERALIDADES

A lo largo de este capítulo se exponen los conceptos requeridos para el desarrollo de este trabajo de investigación, teniendo presente la definición de electrólisis, su mecanismo y las variables empleadas para el desarrollo de este proceso, de igual forma, es necesario hacer una revisión a la técnica de filtración por membrana, las bacterias, su uso como bio-indicadores en aguas potables y la destrucción bacteriana por el desinfectante clorado; esto se realiza con el fin de tener las herramientas necesarias para la correcta evaluación antimicrobiana del agente clorado producido.

### 1.1 POTABILIZACIÓN DE AGUA

Durante décadas se ha tratado el tema de la correcta disposición de residuos líquidos, los cuales llegan a contaminar directamente las fuentes de agua potable disponibles para el consumo humano, se han determinado diversos tratamientos mediante los cuales es posible realizar una correcta desinfección y potabilización de las aguas residuales, de tal forma que se logren cumplir con las normas de calidad de agua establecidas en cada país.

Inicialmente, se cuenta con un pre-tratamiento, el cual de acuerdo con lo estipulado en el RAS 2000 se describe como “sistemas de remoción de material flotante, como rejillas, mallas y trampas de grasa y aceite, de los sistemas de remoción del material suspendido, como desarenadores, sedimentadores, pre-sedimentadores, pre-filtros y micro-tamices y de los procesos de oxidación, como Aireación y oxidación química”<sup>17</sup>; es importante aclarar que de acuerdo con el nivel de contaminación que presente el agua a tratar se deben emplear ciertos pre-tratamientos y no necesariamente se requieren todos a la vez.

La siguiente fase dentro del tratamiento consiste en la remoción de los sólidos suspendidos y coloides dentro del agua a tratar, está compuesta por los procesos de sedimentación, coagulación, floculación y filtración y se conoce como tratamiento primario<sup>18</sup>. La sedimentación es el proceso mediante el cual se logran decantar los sólidos de gran tamaño por acción de la gravedad, mientras que la coagulación y la floculación son empleadas para remover las partículas coloidales presentes, las cuales forman suspensiones estables que hacen que la sedimentación natural de estas no sea posible, son además las encargadas de la turbidez y el color del

---

<sup>17</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. RAS 2000. Título C. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. p. 25.

<sup>18</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. RAS 2000. Título A. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. p. 58.

agua<sup>19</sup>. El objetivo de la coagulación es lograr desequilibrar las partículas que se encuentran dentro del agua mediante coagulantes químicos y agitación, de tal forma que se logren agrupar para su posterior remoción<sup>20</sup>; la floculación es el proceso que le sigue a la etapa de coagulación, este favorece el contacto entre partículas aglomeradas mediante agitación leve, permitiendo así que los flóculos generados ganen masa y peso para su posterior remoción mediante sedimentación<sup>21</sup>. Una vez finalizados los anteriores procesos, se da paso a la filtración, la cual puede ser lenta o rápida y se encarga de terminar de remover las partículas ya sedimentadas y que no hayan sido retenidas por los equipos utilizados en los pasos anteriores<sup>22</sup>. El agua resultante continua con el tratamiento secundario, el cual basa su funcionamiento en reacciones principalmente biológicas, que son empleadas “para convertir la materia orgánica fina coloidal y disuelta en el agua residual en floc biológico sedimentable y sólidos inorgánicos que pueden ser removidos en tanques de sedimentación”<sup>23</sup>.

Finalmente, dentro de los procesos avanzados de tratamiento de agua, se encuentra la desinfección, mediante la cual se logra la inhibición completa de agentes microbianos patógenos que pueden causar enfermedades que afectan la salud del consumidor; existen métodos tanto físicos como químicos a través de los cuales se pueden remover estos agentes contaminantes, entre los métodos físicos se encuentran: ultrafiltración, ultrasonido, ósmosis inversa, calor, radiación ultravioleta, radiación gamma, entre otros, y dentro los métodos químicos a aplicar se pueden reconocer: el cloro y sus derivados, yodo, bromo, peróxido de hidrógeno, sales metálicas, ozono, plata, permanganato de potasio, entre otros. Estos métodos de desinfección deben ser rápidos, efectivos, fáciles de manipular, transportar, aplicar y controlar, evitando que afecten el olor, sabor y apariencia del agua, de igual forma, deben ser solubles para las concentraciones requeridas y tener un efecto residual que evite la re-contaminación<sup>24</sup>.

## 1.2 DESINFECTANTES A BASE DE CLORO

La cloración ha sido una técnica ampliamente usada en la desinfección de aguas residuales, evitando así la transmisión de enfermedades infecciosas por agentes microbianos que puedan estar presentes en el agua potable, esto debido a que su compuesto activo, el cloro, presenta un número atómico de 17 y una distribución

---

<sup>19</sup> ANDÍA CÁRDENAS, Yolanda. Tratamiento de agua: coagulación y floculación. Lima: SEDAPAL, 2000. p. 5.

<sup>20</sup> Ibid., p. 9.

<sup>21</sup> Ibid., p. 33.

<sup>22</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. RAS 2000. Título C, Op. cit., p. 61.

<sup>23</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. RAS 2000. Título E. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. p. 57.

<sup>24</sup> ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía para la selección de sistema de desinfección. Lima, 2007. p. 6.

electrónica mediante la cual puede alcanzar diversos estados de oxidación, es un agente oxidante eficaz que se encuentra disponible como gas, líquido o gránulos, es de bajo costo, fácil dosificación, controla el sabor y el olor del agua, destruye compuestos nitrogenados, tiene alta efectividad en la inhibición de microorganismos entéricos y deja un residual en solución para evitar la re-contaminación de las aguas a tratar hasta que estas lleguen a su destinatario final<sup>25</sup>.

Dentro de los compuestos que contienen cloro y actúan como desinfectantes, se pueden encontrar el cloro gaseoso, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, compuestos organoclorados, entre otros; una vez estos compuestos entran en contacto con el agua, se genera una reacción de óxido – reducción conocida como desproporción, donde se formará ácido hipocloroso (HOCl), así<sup>26</sup>:



De acuerdo con el pH de la solución el ácido hipocloroso puede o no ionizarse para formar el ion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), generando así las especies que conformarán el cloro residual libre. La distribución del cloro se puede observar en la figura 1:

Con base en lo anterior, es posible identificar tres categorías en las cuales el cloro se distribuye de acuerdo con la función que este desarrolla dentro del agua a desinfectar, de esta forma se tiene:

- **Demanda de cloro:** es conocida como la cantidad de cloro empleada previamente a la desinfección del agua a tratar y que cumple con la función de oxidar algunos compuestos presentes, entre estos se encuentra el hierro, manganeso, dióxido de azufre, sulfuro de hidrogeno, materia orgánica como estructuras proteicas, aminoácidos, entre otros<sup>27</sup>.
- **Cloro residual combinado:** se define como la proporción de cloro que reacciona con el nitrógeno presente en forma de amoníaco dentro del agua a tratar, generando la formación de cloraminas, las cuales a su vez se dividen en: monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), dicloramina ( $\text{NHCl}_2$ ) y tricloramina ( $\text{NCl}_3$ ). Estos tres compuestos pueden formarse o no dependiendo de la dosis de cloro, el pH, la cantidad de amoníaco, el tiempo de contacto y la temperatura<sup>28</sup>.

---

<sup>25</sup> ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Calidad del agua. 3 ed. Bogotá D.C.: Escuela Colombiana de Ingeniería, 2009. p. 273. ISBN 978-958-8060-83-5.

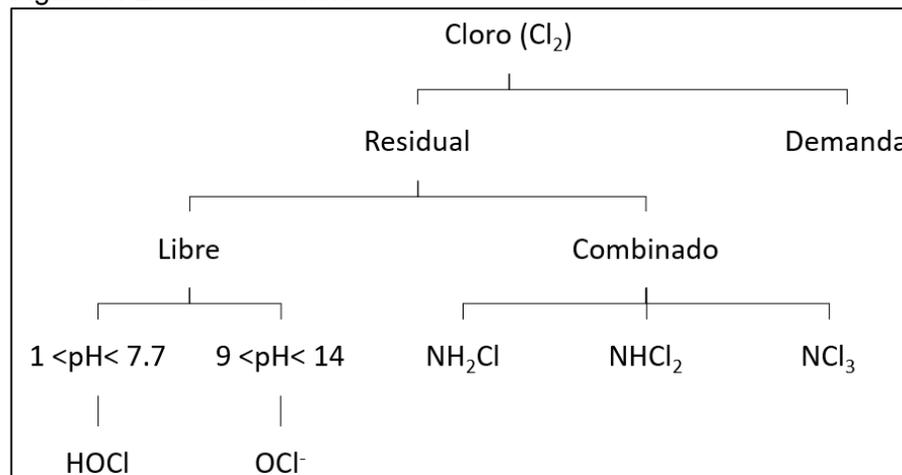
<sup>26</sup> RANDTKE, Stephen. Chapter 2: Chemistry of Aqueous Chlorine. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 87.

<sup>27</sup> ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría. Coordinado por Lidia de Vargas. Lima. 2004. Tomo I. p. 178.

<sup>28</sup> ROMERO ROJAS, Op. cit., p. 275.

- **Cloro residual libre:** es aquella proporción de cloro que resulta después del proceso de desinfección y que queda presente en el agua para evitar una recontaminación, reaccionando con las sustancias que puedan ingresar a la fuente hídrica. Está compuesto por el ion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), los cuales se distribuyen de acuerdo con el pH de la solución, con esto se tiene que, a pH bajo se inhibe la disociación del  $\text{HOCl}$ , a pH igual o mayor a nueve casi todo el residual es  $\text{OCl}^-$  y a pH de 7,7 los residuales de  $\text{HOCl}$  y  $\text{OCl}^-$  son casi similares<sup>29</sup>.

Figura 1. Estados del cloro



Fuente: BARRENECHEA MARTEL, Ada y de VARGAS, Lidia. Capítulo 10. Desinfección [en línea] [citado en 9 mayo de 2018]. Disponible: <<http://www.ingenieroambiental.com/4014/diez.pdf>>.

Los anteriores términos se pueden representar en una gráfica que relaciona la cantidad de cloro residual total presente en el agua a tratar contra la dosis de cloro que se le suministra, tal como se puede observar en la figura 2. Analizando esta figura se encuentra que está compuesta por cuatro secciones que describen el comportamiento del cloro en el proceso de desinfección, en la parte inicial (A - B), el cloro reacciona con los agentes reductores presentes en el agua, y de (B - C) reacciona con el amoníaco y las aminas orgánicas para producir el cloro residual combinado, el cual estará compuesto por cloraminas<sup>30</sup>, las cuales serán removidas mediante oxidación en la sección (C - D), el punto D es conocido como *Breakpoint* o punto de quiebre y es el que indica que la oxidación de los productos del amoníaco ya se ha completado y el nuevo cloro agregado pasará a conformar el cloro residual libre. Cabe resaltar que la curva de demanda de cloro no será igual para todos los tipos de agua, la inclinación y distribución de las diferentes secciones dependerá de

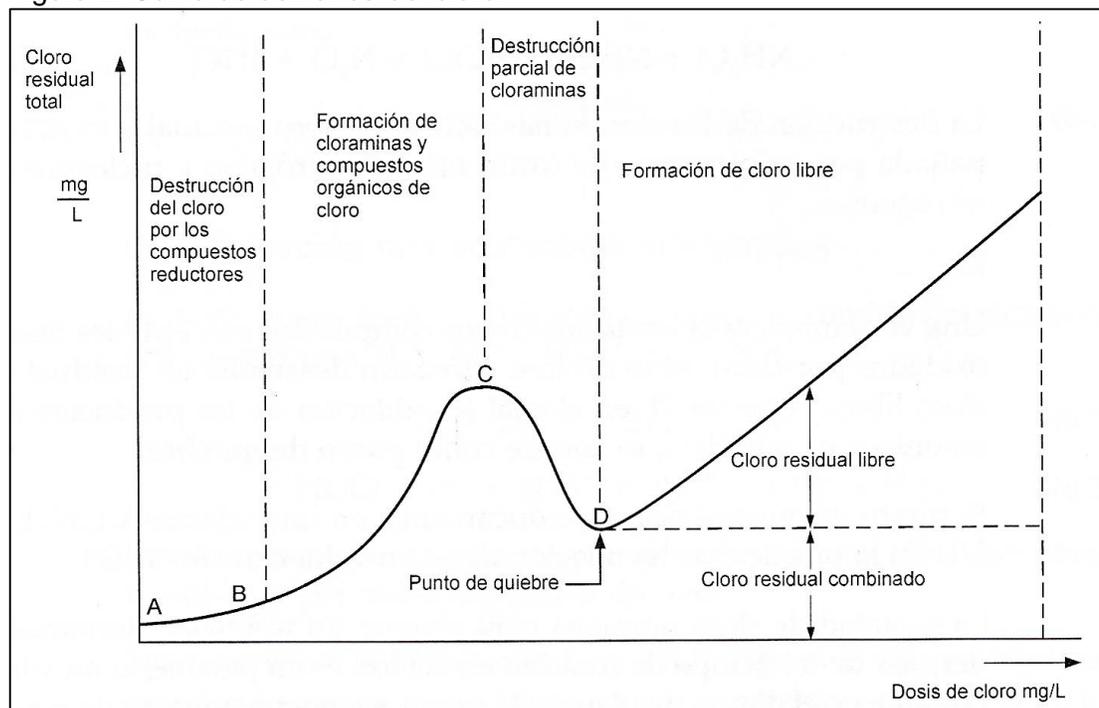
<sup>29</sup> Ibid., p. 274.

<sup>30</sup> Ibid., p. 277.

la cantidad y tipo de contaminante que estas contengan, así como del tiempo de contacto del cloro, el pH y la temperatura<sup>31</sup>.

Por último, es importante resaltar que todos los compuestos que conforman el cloro residual tienen capacidad desinfectante, sin embargo, aun cuando los residuales de cloro combinado son más estables que los residuales de cloro libre, estos suelen ser menos efectivos como desinfectantes y que comparando los compuestos que conforman el cloro residual libre, el ion hipoclorito es inefectivo en comparación con el ácido hipocloroso y sus derivados<sup>32</sup>.

Figura 2. Curva de demanda del cloro.



Fuente: ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Calidad del agua. 3 ed. Bogotá D.C.: Escuela Colombiana de Ingeniería, 2009. p. 277. ISBN 978-958-8060-83-5.

**1.2.1 Hipoclorito de sodio.** El cloro fue un elemento descubierto en 1774 por el Químico Sueco Carl Wilhelm Scheele, desde un inicio este y sus derivados fueron utilizados como blanqueadores principalmente empleados en la industria textil, años más tarde, en 1785, el Químico Claude Louis Berthollet decidió disolver el gas de cloro en agua con el fin de preparar un agente blanqueador, en 1789 con el propósito de mejorar este líquido, le adicionó una solución de hidróxido de potasio para crear la solución conocida como agua Javelle, tiempo después, decidió reemplazar el hidróxido de potasio con una soda caustica obtenida a partir de ceniza de sosa

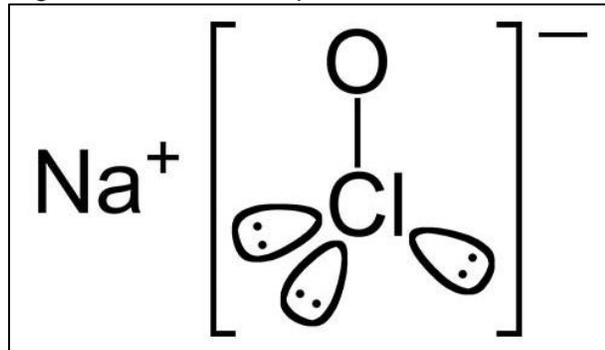
<sup>31</sup> Ibid., p. 278.

<sup>32</sup> Ibid., p. 276.

dando origen al hoy conocido como hipoclorito de sodio empleado en la desinfección<sup>33</sup>.

**1.2.1.1 Estructura.** Como tal, el hipoclorito de sodio (NaClO) es una sal conformada por un enlace iónico entre un ion positivo denominado catión, el cual es aportado por el sodio (Na<sup>+</sup>) y un ion negativo llamado oxoanión, el cual se conoce como hipoclorito (ClO<sup>-</sup>), la forma estructural de este compuesto se puede observar en la figura 3.

Figura 3. Estructura hipoclorito de sodio.



Fuente: BOLIVAR, Gabriel. Hipoclorito de sodio (NaOCl): fórmula, usos y propiedades [en línea]. Lifereder [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<https://www.lifereder.com/hipoclorito-sodio/>>.

**1.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas.** El hipoclorito de sodio es un compuesto inestable y de fácil degradación en estado sólido a condiciones ambientales, es por esto que se comercializa como una solución acuosa a concentraciones bajas de cloro<sup>34</sup>. En el cuadro 1, se resumen las propiedades características de una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y al 6,5 %.

Se puede concluir que las soluciones de hipoclorito de sodio se consideran de carácter básico debido a su pH, mediante el cual logran mantener la estabilidad del componente clave dentro de la solución, de igual forma, a medida que aumenta su concentración, se degradan con mayor facilidad cuando aumenta la temperatura, por tal motivo son solubles en agua fría. Por otro lado, el punto de fusión se relaciona directamente con la cantidad de sal presente en la solución, esto debido a la

<sup>33</sup> LEWIS, Kenneth. Chapter 9. Hypochlorination - Sodium Hypochlorite. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 452-453.

<sup>34</sup> INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES DE COLOMBIA – IDEAM. Hipoclorito de sodio [en línea]. p. 279 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia18.pdf>>.

resistencia a la cristalización que genera la sal, lo cual afectará la temperatura a la que se llevará el proceso de solidificación.

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del hipoclorito de sodio

Propiedad	Valor al 5 % NaOCl	Valor al 6,5 % NaOCl
Color	Color amarillo	Color amarillo
Olor	Cloro	Cloro
Estado físico	Líquido	Líquido
Punto de ebullición (°C)	40	120
Punto de fusión (°C)	-6	8,6
Presión de vapor (mm Hg) a 20 °C	17,5	15
Densidad	1,07 - 1,14	1,11 – 1,2
Solubilidad en agua (%)	100	Soluble en agua fría
Límites de inflamabilidad (% vol)	No combustible	No combustible
pH	9 – 10	12

Fuente: INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES DE COLOMBIA – IDEAM. Hipoclorito de sodio [en línea]. p. 279 [citado 09 may., 2018]. Disponible:

<<http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia18.pdf>>.

Dentro de las características más relevantes que tienen las soluciones de hipoclorito de sodio se encuentra su baja estabilidad y su fácil descomposición por factores como el contacto con ácidos, la luz de día, la temperatura, el pH, la presencia de ciertos metales y venenos tales como gases corrosivos<sup>35</sup>, conllevando así a una rápida descomposición en sub-productos no deseados como el cloruro de sodio, clorato de sodio y oxígeno, los cuales se pueden producir mediante dos diferentes reacciones de descomposición; la primera de ellas se da por una reacción de desproporción en dos etapas, la cual está influenciada por la concentración inicial de hipoclorito, la temperatura y el pH de la solución<sup>36</sup>, así:



Mediante los pasos anteriores se obtiene la reacción global, la cual esta descrita por:



<sup>35</sup> Ibid., p. 280.

<sup>36</sup> LEWIS, Op. cit., p. 463.

La segunda reacción de descomposición es lenta pero puede ser catalizada por algunos iones metálicos o por la luz solar haciendo que se degrade a mayor velocidad el hipoclorito para formar oxígeno gaseoso<sup>37</sup>, así:



Finalmente, se puede concluir que el hipoclorito de sodio es un compuesto reconocido en el campo de desinfección de agua y purificación de superficies, de la misma forma, es ampliamente utilizado en trabajos de blanqueo, desinfección, control de olor, cloración de aguas de proceso y eliminación de microorganismos en diferentes áreas; a nivel industrial se emplea en sectores como el agrícola, pinturas, textil, a nivel farmacéutico y en diversas industrias como la química, de alimentos, sintética, de disposición de residuos, entre otras<sup>38</sup>. Su uso representa ventajas a nivel de transporte y almacenamiento, así como efectividad en el campo de la desinfección, en contraste se debe tener presente que es una sustancia corrosiva y peligrosa que requiere medidas de seguridad adecuadas para su manipulación<sup>39</sup>.

### 1.3 PRODUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DE HIPOCLORITO DE SODIO

El proceso de obtención del agente oxidante, hipoclorito de sodio, a partir de cloruro de sodio se fundamenta en la electroquímica, donde según Brown, se utiliza “energía eléctrica para conseguir que se lleven a cabo ciertos procesos químicos no espontáneos”<sup>40</sup>, este fundamento se aplica a las reacciones de óxido-reducción cuyo carácter natural no es espontáneo. Se pretende lograr que los electrones se movilen de un lado a otro dentro de una celda electrolítica, la cual está constituida como se observa en la figura 4.

Las celdas electrolíticas están compuestas de tres partes, los electrodos, mediante los cuales se conduce la corriente eléctrica y donde se generan las reacciones de óxido – reducción, están subdivididos en ánodo, en donde se lleva a cabo la reacción de oxidación y cátodo, donde se realiza la reacción de reducción, provocando así un movimiento de electrones desde el ánodo hacia el cátodo<sup>41</sup>, una segunda parte está constituida por un electrolito, el cual es una disolución acuosa constituida por los iones de la materia prima y los productos resultantes del

---

<sup>37</sup> Ibid., p. 464.

<sup>38</sup> INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES DE COLOMBIA – IDEAM. Hipoclorito de sodio. Op. cit., p. 284.

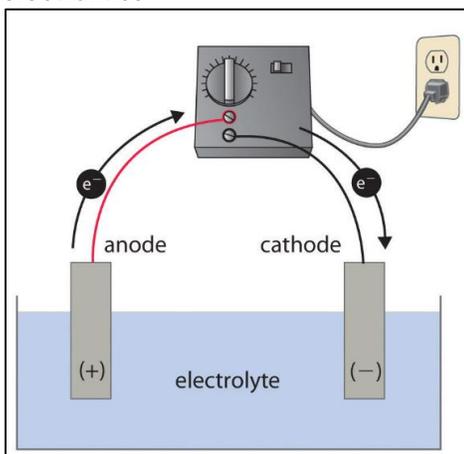
<sup>39</sup> ROMERO ROJAS, Op. cit., p. 294.

<sup>40</sup> BROWN, Op. cit., p. 876.

<sup>41</sup> AVERILL, Bruce y ELDREDGE, Patricia. General chemistry – principles, patterns, and applications [en línea]. p. 1715 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<https://www.saylor.org/site/textbooks/General%20Chemistry%20Principles,%20Patterns,%20and%20Applications.pdf>>.

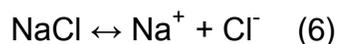
proceso<sup>42</sup>. La tercera y última parte es una fuente de energía que aporte el potencial eléctrico necesario para llevar a cabo la reacción.

Figura 4. Esquema de una celda electrolítica



Fuente: AVERILL, Bruce y ELDREDGE, Patricia. General chemistry – principles, patterns, and applications [en línea]. p. 1715 [citado 09 may., 2018] Disponible: <<https://www.saylor.org/site/textbooks/General%20Chemistry%20Principles,%20Patterns,%20and%20Applications.pdf>>.

Para obtener hipoclorito de sodio a partir de cloruro de sodio, se requieren diversas reacciones y semi-reacciones de óxido – reducción, mediante las cuales se transformará la materia prima en el agente oxidante deseado con la ayuda de un potencial eléctrico. El paso inicial de este proceso consiste en separar los iones que conforman el cloruro de sodio, de forma que el electrolito contenga cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ), aniones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y moléculas de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ )<sup>43</sup>, tal como se indica en la siguiente reacción:

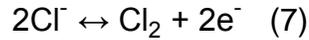


Una vez realizado este proceso, se requiere el uso de corriente eléctrica con el fin de iniciar la transferencia de electrones entre los electrodos, de tal forma que se produzcan reacciones en la superficie de estos, las cuales están descritas por:

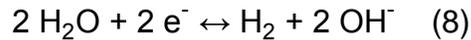
<sup>42</sup> BROWN, Op. cit., p. 120.

<sup>43</sup> PONZANO, Gian Piero. Sodium hypochlorite: history, properties, electrochemical production. En: CONTRIBUTIONS TO NEPHROLOGY. 2007. vol. 154. p. 10.

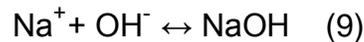
- Mediante el uso de la corriente se logra atraer los aniones de cloro hacia el ánodo, donde se produce una semi-reacción gracias a la interacción de dos de estos iones con el fin de producir cloro gaseoso y un par de electrones<sup>44</sup>, así:



- Los electrones resultantes de la formación de cloro gaseoso se desplazan hacia el cátodo de la celda para que al combinarse con dos cationes de hidrogeno, se produzca hidrogeno gaseoso mediante una semi-reacción de reducción<sup>45</sup>, así:



Por otro lado, los iones disueltos en el electrolito interactúan entre sí mediante enlaces iónicos con el fin de formar hidróxido de sodio.



Finalmente, ocurre la formación del hipoclorito de sodio, el cual actuará como agente oxidante, este se produce mediante la reacción entre una molécula de cloro gaseoso producido en el ánodo, con dos moléculas de hidróxido de sodio disueltas en el electrolito, obteniéndose así una mezcla de hipoclorito sódico<sup>46</sup>.



#### 1.4 MICROORGANISMOS EN EL AGUA

El agua es un compuesto clave para la preservación de todas las formas de vida existentes en el planeta, cuenta con las mínimas fuentes nutricionales requeridas para el crecimiento de diversos microorganismos, los cuales pueden llegar a ser transmisores de enfermedades para el ser humano, entre estos se encuentran algunos virus, las células eucariotas, como las algas, los protozoos y los hongos y células procariontas, como las bacterias<sup>47</sup>.

- **Virus:** son los agentes infecciosos más pequeños que se pueden encontrar en la naturaleza, no pueden ser considerados seres vivos, están compuestos por un ácido nucleico, ya sea ADN o ARN, el cual está rodeado por una cubierta de proteínas que a su vez puede estar recubierta por una membrana con lípidos;

---

<sup>44</sup> Ibid., p. 10.

<sup>45</sup> Ibid., p. 10.

<sup>46</sup> GRATACÓS, Jorge Marcó. Generadores de cloro por electrólisis de salmuera con tecnología de célula con membrana [en línea]. Hispagua. Barcelona, España. 2014. p. 108 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua\\_documento/procesos-y-sistemas-generadores-cloro-electrolisis-salmuera-tecnoaqua-es.pdf](http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua_documento/procesos-y-sistemas-generadores-cloro-electrolisis-salmuera-tecnoaqua-es.pdf)>.

<sup>47</sup> APELLA, María C. y ARAUJO, Paula Z. Capítulo 2: Microbiología de agua. Conceptos básicos. En: Microbiología. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2004. p. 45.

son incapaces de sobrevivir en un medio extracelular, por lo cual requieren de una célula hospedadora donde pueda llevar a cabo sus funciones de replicación actuando como parásitos a nivel genético, durante la replicación no solo se produce el ácido nucleico viral, también se constituyen las cubiertas proteínicas, las cuales se ensamblan con el fin de formar una cápside la cual “rodea y estabiliza el ácido nucleico viral y lo protege del entorno extracelular y facilita la unión y penetración del virus hasta que hay contacto con una nueva célula susceptible”<sup>48</sup>.

- **Algas:** son microorganismos que producen O<sub>2</sub> una vez realizan el proceso de fotosíntesis, por esto contienen clorofila en la membrana fotosintética de su cloroplasto, pueden ser unicelulares o pluricelulares, algunas cepas pueden producir toxinas que podrían llegar a afectar al ser humano<sup>49</sup>.
- **Protozoos:** son organismos unicelulares no fotosintéticos pertenecientes al reino protista, se alimentan de compuestos orgánicos y viven en medios acuáticos o como parásitos, se pueden dividir en flagelados, amebas, esporozoos y ciliados<sup>50</sup>.
- **Hongos:** son organismos eucariotas no fotosintéticos los cuales crecen en condiciones aeróbicas y obtienen su energía mediante la oxidación de la materia orgánica, están compuestos por una serie de filamentos conocidos como hifas, los cuales están formados por una pared celular compuesta del polisacárido quitina, la unión y el entrelazamiento de las hifas se conoce como micelio<sup>51</sup>. Poseen dos tipos de reproducción, la sexual, la cual se realiza mediante la unión de dos núcleos y la asexual mediante la formación de esporas, excepto las levaduras, las cuales se reproducen por gemación<sup>52</sup>.
- **Bacterias:** Son los organismos procariontes unicelulares más abundantes del planeta y los cuales pueden estar presentes en diferentes tipos de hábitat sin importar las condiciones extremas a las que se les someta, están caracterizadas por su diminuto tamaño por lo cual solo pueden ser vistas mediante la formación de colonias, se reproducen mediante fisión binaria, pueden tener características patógenas y causar enfermedades o hasta la muerte en el ser humano, son empleadas en procesos de descomposición, reciclaje, fijación de nitrógeno, obtención de energía así como están presentes en la flora bacteriana.

---

<sup>48</sup> BROOKS, Geo. F., *et al.* Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25 ed. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2011. p. 373. ISBN 978-607-15-0503-3.

<sup>49</sup> *Ibid.*, p. 6.

<sup>50</sup> *Ibid.*, p. 665.

<sup>51</sup> SCHLEGEL, Hans G. y ZABOROSCH, Christiane. Microbiología general. 2 ed. Barcelona, España: Ediciones Omega, 1997. p. 169. ISBN 84-282-1030-6.

<sup>52</sup> *Ibid.*, p. 170.

## 1.5 BACTERIAS EMPLEADAS COMO BIO-INDICADORES DE CALIDAD DE AGUA

Gracias a la necesidad de realizar determinaciones rápidas, económicas y confiables de agentes patógenos en las aguas de consumo, se recurrió al uso de indicadores microbiológicos, los cuales se consideran como una herramienta que ayuda a evaluar la calidad del agua<sup>53</sup>, se caracterizan por poseer comportamientos similares a los patógenos en términos de concentración y reacción frente a factores ambientales, con la excepción de que son más rápidos, económicos y fáciles de identificar, con la confirmación de la presencia de microorganismos indicadores en el agua a evaluar se puede asegurar que también se encuentran presentes agentes patógenos en la misma concentración y que su comportamiento frente a factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, entre otros es similar al del indicador<sup>54</sup>.

Un microorganismo que se vaya a utilizar para la determinación de contaminación fecal en el agua, debe cumplir con las siguientes características principales<sup>55</sup>:

- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
- No debe ser patógeno.
- Su tiempo de supervivencia, así como su resistencia a factores ambientales debe ser igual o superior al de las bacterias patógenas.
- Debe ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.

No existe ningún microorganismo capaz de cumplir todos los requisitos anteriormente mencionados, por lo cual se eligen para la determinación aquellos que más se aproximen<sup>56</sup>.

Se utiliza principalmente como indicador de contaminación bacteriana el grupo de microorganismos coliformes ya que se encuentran en grandes cantidades dentro

---

<sup>53</sup> VÁZQUEZ SILVA, Gabriela, *et al.* Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. En: UAM-X. Mayo, 2006. p. 41.

<sup>54</sup> LARREA MURRELL, Jeny Adina, *et al.* Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. En: REVISTA CENIC: CIENCIAS BIOLÓGICAS. Enero, 2013. vol. 44, no. 3, p. 25.

<sup>55</sup> ARCOS PULIDO, Mireya del Pilar, *et al.* Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. En: NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. Diciembre, 2005. vol. 3, no. 4, p. 71.

<sup>56</sup> ROBLES GARCÍA, Marina. Reutilización de aguas residuales. Aplicación al riego de campos de golf. Tesis de Maestría en Tecnología y Química Ambiental. Madrid: Escuela Técnica Superior de Ingenieros, 2013. p. 9.

del tracto intestinal tanto de humanos como de animales de sangre caliente, en comparación con los patógenos sobreviven mayor cantidad de tiempo en agua y presentan un comportamiento igual o similar a estos en los sistemas de desinfección, este grupo de bacterias se divide en coliformes totales (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*) y coliformes fecales (*Escherichia*)<sup>57</sup>, su principal diferencia radica en el origen de la bacteria ya que las coliformes fecales son de origen exclusivamente fecal de carácter humano o animal, mientras las coliformes totales se pueden encontrar en diversos medios como el suelo y el agua<sup>58</sup>. La presencia de coliformes en aguas tratadas indica que hubo una falla en el procedimiento de desinfección, en la distribución o en las fuentes domiciliarias y por ende se puede decir que ocurrió contaminación sin identificar el origen por lo cual es necesario recurrir a los mecanismos mediante los cuales se controla la calidad en el agua y su procesamiento así como vigilar la red de distribución<sup>59</sup>.

El uso de bio-indicadores presenta diversas ventajas relacionadas al empleo de microorganismos ya que gracias a estos se pueden identificar las condiciones del sistema y por ende otro tipo de contaminación de carácter físico, biológico, químico y ecológico de forma económica a comparación con análisis fisicoquímicos, de la misma forma, la información obtenida puede expresarse mediante escalas numéricas las cuales son de fácil comprensión, por otro lado, existen limitaciones referentes al uso de bio-indicadores, entre las cuales se tienen que: la toma de la muestra implica mayor cantidad de tiempo, se requiere experiencia para la identificación taxonómica de cada especie y si se desea realizar una evaluación completa se requieren análisis fisicoquímicos adicionales o pruebas de toxicidad<sup>60</sup>.

## **1.6 DESTRUCCIÓN BACTERIANA AL CONTACTO CON UN DESINFECTANTE CLORADO**

El cloro es un agente oxidante que cuenta con la capacidad de remover completamente la carga bacteriana de un agua residual, logrando así un tratamiento microbiológico que cumpla con la normatividad requerida para aceptar un agua como agua de consumo. Con base en investigaciones realizadas por diversos autores se logra estipular el comportamiento del cloro cuando entra en contacto con las bacterias y definir cuál es su mecanismo de acción para realizar el proceso antimicrobiano y procurar la eliminación de los componentes orgánicos presentes. Inicialmente, el cloro se difunde a través de las paredes celulares bacterianas, en donde oxida los grupos amino N-terminal de las proteínas que la constituyen, dando como resultado una alteración en la fuerza de la pared y produciendo la muerte de

---

<sup>57</sup> ARCOS PULIDO, Op. cit., p. 72.

<sup>58</sup> CARRILLO ZAPATA, Eliza Marcela y LOZANO CAICEDO, Aura María. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Tesis de Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. p. 7.

<sup>59</sup> ARCOS PULIDO. Op. cit., p. 73.

<sup>60</sup> VAZQUEZ SILVA. Op. cit., p. 42.

la célula<sup>61</sup>, continúa destruyendo la integridad de la membrana celular dañando sus lípidos y ácidos grasos mediante una disolución orgánica por la reacción de saponificación. De igual forma, el desinfectante inhibe la producción de ATP, daña los ácidos nucleicos, neutraliza los aminoácidos presentes, inactiva irreversiblemente los sitios enzimáticos esenciales de la bacteria a través de los iones hidroxilo y la reacción de cloraminación y finalmente, mediante reacciones oxidativas daña las enzimas respiratorias que contengan grupos sulfhidrilo<sup>62-63</sup>. Cabe resaltar que una vez se logra la ruptura de la membrana se genera la salida del material celular produciendo lisis en la bacteria y que de acuerdo a lo estipulado por Wang, la integridad de la membrana es un buen indicador para la eficiencia de un agente clorado en la desinfección<sup>64</sup>.

Así mismo, en un estudio realizado por Diao y consignado en su artículo *Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction*<sup>65</sup>, se logra determinar mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido que el cloro al hacer contacto directo con la bacteria logra causar deformaciones en su superficie.

Igualmente, Wang en su artículo *Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on Escherichia coli and Legionella beliardensis assessed by flow cytometry*<sup>66</sup>, enuncia que las bacterias pierden su capacidad de crecimiento en medio sólido a medida que la concentración de cloro va aumentando, logrando que la célula se despolarice gradualmente.

Aunque los mecanismos de inactivación que se especifican anteriormente son importantes, también se precisa enunciar los factores que influyen en la velocidad y el grado de inactivación que el agente clorado pueda tener, entre estos se tiene: el tipo y la concentración del microorganismo a inactivar, el tipo de desinfectante a emplear, la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, la temperatura, el pH y la interferencia de partículas o sustancias que consuman la demanda de cloro<sup>67</sup>.

---

<sup>61</sup> DIAO, H. F., *et al.* Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. En: PROCESS BIOCHEMISTRY. Junio, 2003. vol. 39, p. 1423.

<sup>62</sup> WANG, Yingying, *et al.* Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on *Escherichia coli* and *Legionella beliardensis* assessed by flow cytometry. En: APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Junio, 2010. vol. 87, no. 1, p. 337.

<sup>63</sup> ALBA TORRES, Nathalia Elvira y ARAUJO ESTRADA, Fanny Lucia. Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios PRONABELL LTDA. Tesis de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2008. p. 21.

<sup>64</sup> WANG. Op. Cit., p. 337.

<sup>65</sup> DIAO. Op. cit., p. 1425.

<sup>66</sup> WANG. Op. cit., p. 338.

<sup>67</sup> LEWIS. Op. cit., p. 463.

## 1.7 FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Es una técnica directa de recuento de microorganismos la cual de acuerdo a la resolución 2115 de 2007, está avalada para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas de consumo humano<sup>68</sup>; consiste en hacer pasar la muestra de agua a analizar a través de un filtro de membrana el cual con la ayuda de una bomba de vacío ejerce una presión diferencial para lograr la filtración. El montaje de este procedimiento se puede observar en la imagen 1. Se deben tener en cuenta ciertos parámetros que permitirán el correcto desarrollo de la técnica, entre estos se tiene:

- La cantidad de agua a filtrar debe ser tal que el número de colonias visibles sobre el filtro sea cuantificable, es decir, no sobrepase las 200 colonias.
- El material así como el tamaño de poro del filtro de membrana deberá retener por completo las bacterias coliformes, generalmente se utilizan filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm; este filtro se puede observar en la imagen 2.
- Los filtros deben estar libres de químicos que inhiban el crecimiento y desarrollo bacteriano, tampoco deben influir sobre el pH del medio de cultivo.
- Los filtros deben estar debidamente esterilizados evitando que sus propiedades intrínsecas se vean afectadas.

Una vez la muestra es filtrada, se procede a sembrar el filtro sobre un medio de cultivo sólido para realizar la lectura de unidades formadoras de colonia presentes en el agua, en caso de que no se observe crecimiento de colonias, se debe expresar el resultado como <1 coliforme/100 mL<sup>69</sup>.

---

<sup>68</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Op. Cit., p 6.

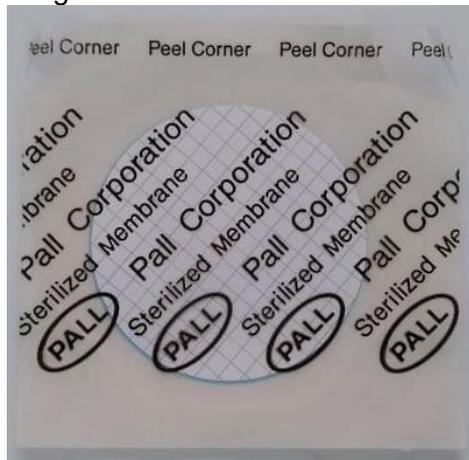
<sup>69</sup> ROMERO ROJAS. Op. cit., p. 222.

Imagen 1. Equipo de filtración por membrana.



Fuente: elaboración propia.

Imagen 2. Filtro de membrana.



Fuente: elaboración propia.

Esta técnica se encuentra dentro de los métodos directos de conteo de microorganismos, ya que permite realizar un conteo real y no estadístico mediante el cual se pueden obtener resultados más exactos y rápidos (24 a 48 horas) en comparación con otras técnicas. Cabe resaltar que la filtración por membrana no es útil para todas las clases de aguas, ya que presenta limitaciones en el análisis de aguas turbias o que contengan grandes proporciones de bacterias no coliformes<sup>70</sup>.

---

<sup>70</sup> Ibid., p. 222.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA DENTRO DEL PROCESO DE DESINFECCIÓN

Para evaluar la capacidad de inhibición de la bacteria *Escherichia coli* dentro de un agua sintética, a partir de hipoclorito de sodio producido por electrólisis de cloruro de sodio, es necesario determinar y parametrizar las variables que establecen el comportamiento y condicionan la eficiencia del desinfectante, así como estipular los factores requeridos para el crecimiento bacteriano; esto se realizó mediante una revisión de experimentaciones similares realizadas por otros autores, las cuales se encuentran resumidas en una matriz de selección disponible en el Anexo A de este documento; a continuación se encuentran los factores más relevantes para el desarrollo de este trabajo investigativo.

**2.1.1 Temperatura del agente oxidante.** La temperatura es una magnitud que está relacionada con la energía cinética de los átomos, posee la capacidad de alterar las propiedades de los materiales y modificar en diversos sentidos las reacciones químicas<sup>71</sup>.

Con base en los datos térmicos obtenidos de la producción del hipoclorito de sodio por un proceso electrolítico y junto con lo descrito por Ponzano en su a, se puede deducir que durante la puesta en marcha de la electrólisis con un ánodo de grafito, la temperatura de la celda aumenta a medida que transcurre el tiempo, produciendo una degradación lenta del agente oxidante hasta temperaturas inferiores a 40 °C, una vez se supera esta temperatura, se evidencia una disminución mayor en la concentración de cloro activo del desinfectante, promoviendo la formación de cloratos en la celda electrolítica mediante la reacción 4, este comportamiento se puede observar en la figura 5; cabe resaltar que las condiciones a las cuales se describe el comportamiento que tendrá la electrólisis son, cátodo de titanio, relación de áreas de 1.33, tiempo de una hora, densidad de corriente de 10 A/dm<sup>2</sup> y un electrolito compuesto por una solución 2 M de cloruro de sodio<sup>72</sup>.

Al momento de finalizar la electrólisis es necesario evaluar la temperatura adecuada a la cual se debe almacenar y suministrar el desinfectante, con el fin de evitar una disminución rápida de la concentración del mismo, por lo tanto, de acuerdo con

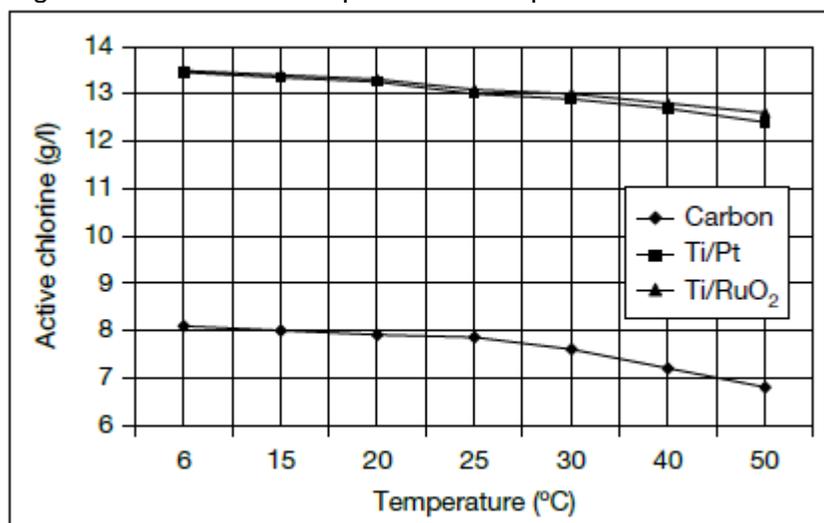
---

<sup>71</sup> KANE, Joseph y STERNHEIM, Morton. Física. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2007. p. 225.

<sup>72</sup> PONZANO. Op. cit., p. 15.

diversos autores como Wang<sup>73</sup>, Aieta<sup>74</sup>, Rasheed<sup>75</sup>, Wilhelm<sup>76</sup>, LeChevallier<sup>77</sup> y Romero Rojas<sup>78</sup>, el rango de temperatura sugerido en el cual el hipoclorito de sodio debe ser suministrado a las fuentes de agua que se quieren desinfectar, es de 20 a 25 °C, en donde se asegura la inhibición completa de los microorganismos presentes y se evita la degradación del hipoclorito de sodio en forma de cloratos. Por otro lado, Lewis recomienda almacenar el agente oxidante a temperaturas bajas, demostrando que a 5 °C y sin metales pesados presentes en el agua, la degradación del desinfectante se detiene por completo<sup>79</sup>.

Figura 5. Efecto de la temperatura en el proceso de electrólisis.



Fuente: PONZANO, Gian Piero. Sodium hypochlorite: history, properties, electrochemical production. En: CONTRIBUTIONS TO NEPHROLOGY. 2007. vol. 154. p. 15.

**2.1.2 pH del agente oxidante.** Es uno de los parámetros más importantes en el proceso de electrólisis, ya que brinda estabilidad a la reacción y define los productos que se obtendrán de está, esto debido a que mantiene un equilibrio entre el cloro gaseoso, el ácido hipocloroso y el ion hipoclorito, donde de acuerdo a la basicidad

<sup>73</sup> WANG. Op. cit., p. 332.

<sup>74</sup> AIETA, Marco, *et al.* Comparison of Chlorine Dioxide and Chlorine in Wastewater Disinfection. En: JOURNAL (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). Abril, 1980. vol. 52, no. 4, p. 811.

<sup>75</sup> RASHEED, Sajida; HASHMI, Imran y CAMPOS, Luiza. Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* with Chlorine in Drinking Waters at Various pH and Temperature Levels. En: LIFE AND ENVIRONMENTAL SCIENCES. Junio, 2016. vol. 53, no. 2, p. 91.

<sup>76</sup> WILHELM, Natalie, *et al.* Sodium hypochlorite dosage for household and emergency water treatment: updated recommendations. En: JOURNAL OF WATER AND HEALTH. Febrero, 2017. vol. 16, no. 1, p. 5.

<sup>77</sup> LECHEVALLIER, M.; EVANS, T. y SEIDLER, R. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Julio, 1981. vol. 42, no. 1, p. 160.

<sup>78</sup> ROMERO ROJAS, Op. cit., p. 274.

<sup>79</sup> LEWIS, Op. cit., p. 468.

o acidez de la solución, se da paso a la formación de alguno de estos compuestos, tal como se describe en la reacción 11.



Las reacciones mediante las cuales se logra la distribución de estas especies, inician con la disociación del hipoclorito de sodio en solución, donde se forma el catión sodio y el anión hipoclorito, tal como se puede observar en la reacción 12<sup>80</sup>.



A su vez, el ion hipoclorito reacciona con los iones hidrógeno presentes en el electrolito y conforman el ácido hipocloroso, siguiendo la reacción 13<sup>81</sup>.



Cuando el pH disminuye desde 11.5 hasta 5, se favorece la presencia de los iones hidrógeno y por lo tanto, el equilibrio tenderá a la formación de ácido hipocloroso, el cual reaccionará con los iones hipoclorito presentes a través de la reacción 14, conocida como descomposición ácida catalizada, en cambio si el pH aumenta a 13 o más, el agente oxidante tenderá a degradarse aumentando la velocidad de descomposición mediante la formación de cloratos, siguiendo la reacción 4. Cabe resaltar que por debajo de pH 4 se produce cloro gaseoso mediante la reacción de destrucción ácida, en donde se mezcla el hipoclorito de sodio con un ácido fuerte<sup>82</sup>.



Estos rangos de distribución de compuestos clorados se pueden observar en la figura 6.

Con base en lo anterior y de acuerdo con las investigaciones de los autores Ponzano<sup>83</sup>, Romero Rojas<sup>84</sup> y Lewis<sup>85</sup>, se estipula que el pH óptimo para la desinfección y almacenamiento del hipoclorito de sodio se encuentra en un rango entre 11.86 y 13, dado que a estos valores se logra mantener la estabilidad de la solución, por lo cual sugieren almacenar el desinfectante con un exceso de hidróxido de sodio que logre mantener esta condición.

---

<sup>80</sup> Ibid., p. 469.

<sup>81</sup> Ibid., p. 470.

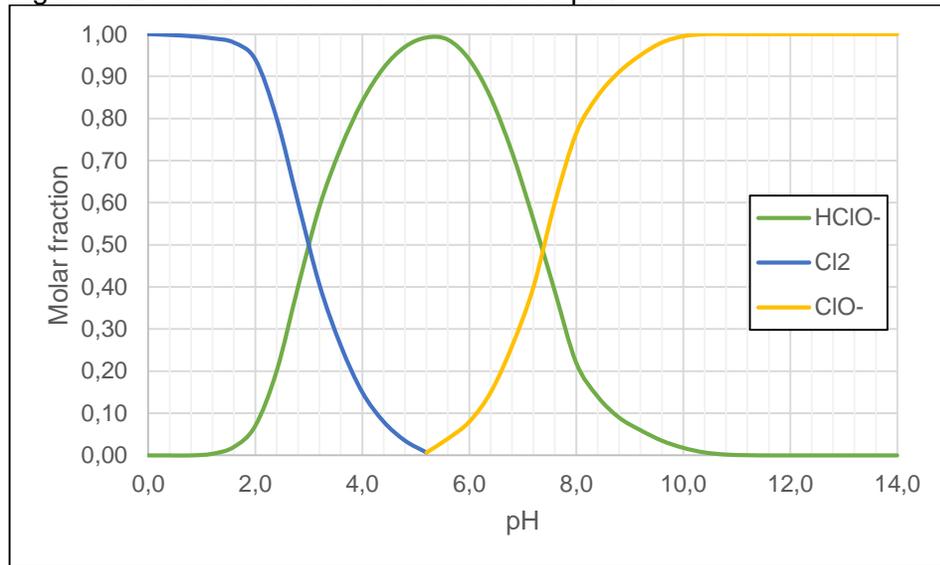
<sup>82</sup> Ibid., p. 470.

<sup>83</sup> PONZANO, Op. cit., p. 22.

<sup>84</sup> ROMERO ROJAS. Op. cit., p. 275.

<sup>85</sup> LEWIS, Op. cit., p. 470.

Figura 6. Distribución del cloro a diferentes pH.



Fuente: PONZANO, Gian Piero. Sodium hypochlorite: history, properties, electrochemical production. En: CONTRIBUTIONS TO NEPHROLOGY. 2007. vol. 154. p. 20. Modificado por el autor.

**2.1.3 Concentración del agente oxidante.** La concentración es la variable sobre la cual se basa la efectividad del análisis de la inhibición de la bacteria *Escherichia coli* en un agua sintética, bibliográficamente se encuentra una gran variedad de datos que indican la concentración adecuada de una solución de hipoclorito de sodio para remover efectivamente los microorganismos coliformes del agua, los autores Ponzano<sup>86</sup>, Wang<sup>87</sup>, Lin<sup>88</sup>, Rasheed<sup>89</sup>, Lechevallier<sup>90</sup> y Costa Miranda<sup>91</sup> aseguran que se requiere una solución con concentraciones de 0.5 a 1 mg/L, Wilhem<sup>92</sup>, Aieta<sup>93</sup>, la Organización Panamericana de la Salud<sup>94</sup>, Lewis<sup>95</sup> y Diao<sup>96</sup> estiman valores de 2 a 10 mg/L de este agente oxidante en solución, mientras Barrenecha

<sup>86</sup> PONZANO. Op. cit., p. 21.

<sup>87</sup> WANG. Op. cit., p. 339.

<sup>88</sup> LIN, Huirong, *et al.* Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. En: ECOLOGY, ENVIRONMENT & CONSERVATION. Noviembre, 2017. p. 244.

<sup>89</sup> RASHEED. Op. cit., p. 91.

<sup>90</sup> LECHEVALLIER, Op. cit., p. 165.

<sup>91</sup> COSTA MIRANDA, Andreza, *et al.* Surface water disinfection by chlorination and advanced oxidation processes: Inactivación of an antibiotic resistant *E. coli* strain and cytotoxicity evaluation. En: Science of the Total Environment. Febrero, 2016. p. 5.

<sup>92</sup> WILHELM, Op. cit., p. 13.

<sup>93</sup> AIETA, Op. cit., p. 817.

<sup>94</sup> ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía para la selección de sistema de desinfección. Op. cit., p. 14.

<sup>95</sup> LEWIS, Op. cit., p. 466.

<sup>96</sup> DIAO, Op. cit., p. 1423.

Martel<sup>97</sup> y Coronel-Olivares<sup>98</sup> reportan que se requieren soluciones de hipoclorito de sodio a concentraciones de 15 y 30 mg/L respectivamente, por último, Crump<sup>99</sup>, Munakata<sup>100</sup> y Romero Rojas<sup>101</sup> hablan del cloro residual libre que debe permanecer en el agua una vez se ha realizado la desinfección, estimando valores de 0.2 mg/L para pH menor a 9.2, 0.6 mg/L para pH de 10 y en general 1mg/L para aguas de baja turbidez y bajo contenido orgánico, también es necesario tener en cuenta el parámetro de máximo cloro residual libre aceptado por la Resolución 2115 de 2007<sup>102</sup>, el cual indica un rango de 0.3 a 2 mg/L para aguas de consumo. Cabe resaltar que todos los valores anteriormente mencionados son aplicables a un agua de baja turbidez.

De igual forma, es indispensable tener en cuenta la relación entre la concentración del agente oxidante y su velocidad de degradación, en donde la mayor descomposición se produce justo después de que se fabrica la solución, con la generación de cloratos, a partir de ahí, la concentración disminuye durante el transcurso del tiempo; esta condición se evidencia en mayor proporción cuando el agente oxidante presenta altas concentraciones iniciales, en la figura 7 y 8 se muestran las curvas de degradación del hipoclorito de sodio a diferentes temperaturas por un periodo de 100 días, variando la concentración inicial en 12.5% y 15% respectivamente<sup>103</sup>.

---

<sup>97</sup> BARRENECHEA MARTEL, Ada y de VARGAS, Lidia. Capítulo 10. Desinfección [en línea] [citado en 9 mayo de 2018]. Disponible: <<http://www.ingenieroambiental.com/4014/diez.pdf>>.

<sup>98</sup> CORONEL OLIVARES, Claudia, *et al.* Chlorine disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*, total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*: revisiting reclaimed water regulations. *En: WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY: A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH*. 2011. vol. 64, no. 11, p. 2156.

<sup>99</sup> CRUMP, J. A., *et al.* Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation–disinfection on drinking water quality in western Kenya. *En: JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*. Julio, 2004. vol. 97, no. 1, p. 228.

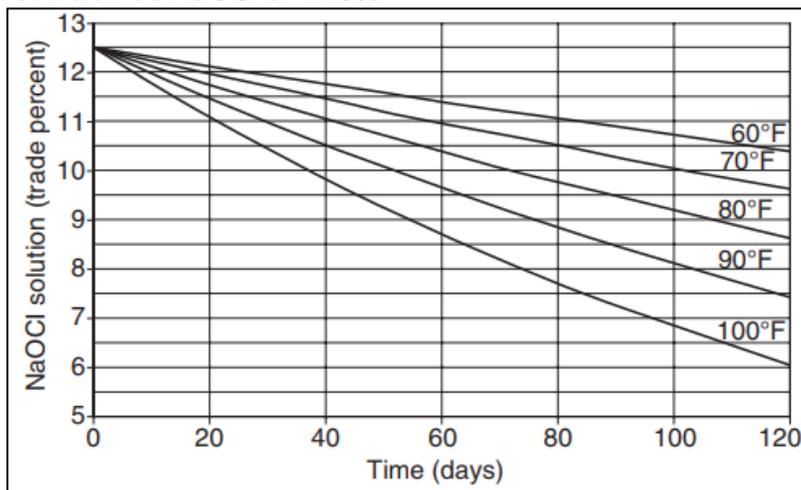
<sup>100</sup> MUNAKATA, Naoko y KUO, Jeff. Disinfection Processes. *En: WATER ENVIRONMENT RESEARCH: A RESEARCH PUBLICATION OF THE WATER ENVIRONMENT FEDERATION*. Octubre, 2015. vol. 87, no. 10, p. 1127

<sup>101</sup> ROMERO ROJAS, Op. cit., p. 285.

<sup>102</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD, Op. cit., p. 5.

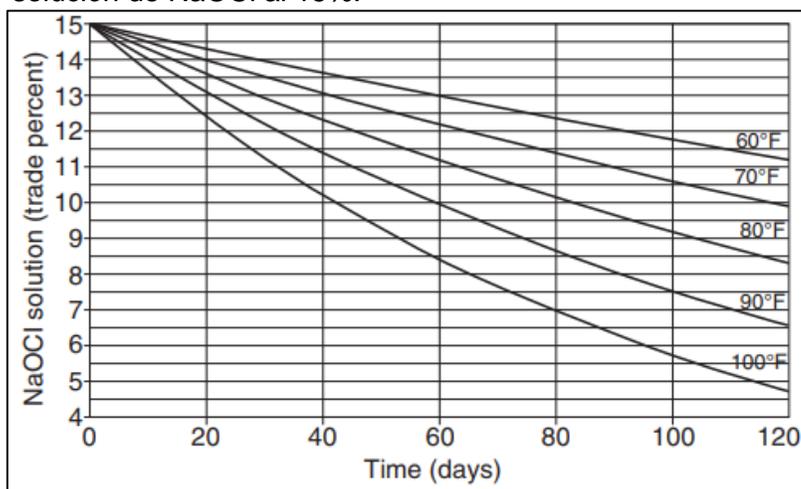
<sup>103</sup> LEWIS, Op. cit., p. 466.

Figura 7. Degradación a diferentes temperaturas de una solución de NaOCl al 12.5%.



Fuente: LEWIS, Kenneth. Chapter 9. Hypochlorination - Sodium Hypochlorite. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 466.

Figura 8. Degradación a diferentes temperaturas de una solución de NaOCl al 15%.



Fuente: LEWIS, Kenneth. Chapter 9. Hypochlorination - Sodium Hypochlorite. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 467.

Realizando una comparación en el día 60 y el día 120, a una temperatura de 100 °F, es fácilmente observable que la solución con mayor porcentaje de cloro activo presenta una mayor degradación a través del tiempo, por lo tanto no siempre una solución con alta concentración será la mejor opción para lograr una desinfección efectiva.

Otro aspecto a considerar para preservar la estabilidad y conservación del desinfectante es la relación de la concentración con la temperatura de la solución, en donde, tal como se definió anteriormente, a una baja concentración y una temperatura moderada aumentan los días de vida media que puede tener el agente oxidante; de acuerdo con lo expuesto en *White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, se puede asegurar que aumentar la temperatura en 10 °C producirá un incremento de 3 a 4 veces en la velocidad de degradación cuando la concentración de la solución es de 5 % a 16 % de cloro y que una solución de hipoclorito de sodio a 15 °C se degradará 14 veces más lento que una almacenada a 35 °C<sup>104</sup>.

**2.1.4 Tiempo de contacto.** Esta es una variable que junto con la concentración del agente oxidante definen la efectividad de la desinfección de un agua potable, se entiende como el tiempo que tarda el hipoclorito de sodio en remover por completo una carga bacteriana de *Escherichia coli*, sin embargo, no hace referencia al tiempo que una concentración de cloro debe permanecer en el agua a tratar, ya que para mantener la calidad potable del agua es necesario que se mantenga una porción de cloro residual libre dentro de esta.

La parametrización de esta variable está ligada a la elección de la concentración de hipoclorito de sodio que se requiera aplicar, no obstante, mediante una revisión bibliográfica, se ha encontrado que el tiempo de desinfección promedio es de 30 minutos para soluciones de hipoclorito de sodio que presenten una concentración de 1 a 10 mg/L, aunque autores como Wang<sup>105</sup> y Diao<sup>106</sup> recomiendan un tiempo de contacto de 40 y 60 minutos respectivamente, mientras que Barrenecha Martel<sup>107</sup> y Costa Miranda<sup>108</sup> estipulan 2 minutos como tiempo requerido para lograr una desinfección completa a concentraciones de 1 mg/L.

**2.1.5 Concentración de la bacteria.** El número de bacterias que se encuentra en un agua residual varía de acuerdo a las características propias de la fuente de recolección del agua, entre estas se encuentra, la temperatura, el pH, la cantidad de materia orgánica, el contenido de sal, entre otras. Su cuantificación es importante para el desarrollo experimental ya que condicionan la cantidad y concentración de la solución de hipoclorito de sodio a emplear así como el tiempo de contacto requerido para una desinfección completa, esto debido a que entre mayor cantidad de bacterias estén presentes, se requiere una mayor concentración de desinfectante; cabe resaltar que esta experimentación se basa en la inhibición de la bacteria *Escherichia coli*, la cual de acuerdo a la Resolución 2115 de 2007<sup>109</sup> es un indicador de contaminación fecal para aguas potables, no obstante, un agua

---

<sup>104</sup> Ibid., p.467.

<sup>105</sup> WANG, Op. cit., p. 336.

<sup>106</sup> DIAO, Op. cit., p. 1423.

<sup>107</sup> BARRENECHEA MARTEL, Op. cit., p. 181.

<sup>108</sup> COSTA MIRANDA, Op. cit., p. 1.

<sup>109</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD, Op. cit., p. 2.

residual presenta diversos tipos de microorganismos en diferentes concentraciones, por lo cual aumentarán las necesidades requeridas del agente oxidante para lograr un agua apta para el consumo humano.

En los tratamientos de aguas no se reconoce un valor estándar que estime la cantidad de microorganismos que deben ser removidos de un agua residual, sin embargo, autores como Diao<sup>110</sup>, Lin<sup>111</sup>, Rasheed<sup>112</sup>, Wilhelm<sup>113</sup> y Costa Miranda<sup>114</sup> estipulan un rango aproximado de  $10^7 - 10^9$  UFC/mL de coliformes fecales.

**2.1.6 Agitación.** Se emplea para realizar una buena distribución del agente clorado y mejorar la incorporación entre este y la carga microbiana, de forma que se asegure la inhibición completa de las bacterias; con base en experimentaciones de otros autores se puede estipular un rango de agitación entre 150 rpm<sup>115</sup> a 180 rpm<sup>116</sup> empleando agitadores magnéticos, se debe tener en cuenta que una agitación excesiva o agresiva puede incrementar la temperatura de la solución o romper la pared de algunas bacterias provocando lisis celular<sup>117</sup>; por lo tanto, la velocidad de agitación óptima del proceso se estipula en 150 rpm.

**2.1.7 Degradación del hipoclorito de sodio.** Aunque no es una variable a parametrizar, es importante considerar cuáles son las causas que aumentan la velocidad de degradación del hipoclorito de sodio en solución, empezando por las anteriormente mencionadas, como, una alta temperatura, alta concentración y rangos extremos de pH, así mismo se encuentra que la exposición a la luz ultravioleta promueve la degradación del hipoclorito de sodio mediante un proceso llamado fotólisis, el cual depende de la cantidad de luz absorbida por la solución y del pH que está presente; a un pH básico predomina la presencia del ion hipoclorito, el cual causa un incremento en la velocidad de degradación mediante la producción de oxígeno (reacción 5) y la catálisis de la reacción de producción de cloratos, esto reduce el tiempo de vida media de la solución de días a horas<sup>118</sup>. Esta incidencia de la luz ultravioleta depende de la profundidad de la solución, dado que la mayor cantidad de luz es absorbida por la superficie del líquido, concluyendo que grandes volúmenes de solución no presentarán una gran degradación por la dificultad con la

---

<sup>110</sup> DIAO, Op. cit., p. 1422.

<sup>111</sup> LIN, Op. cit., p. 243.

<sup>112</sup> RASHEED, Op. cit., p. 85.

<sup>113</sup> WILHELM, Op. cit., p. 3.

<sup>114</sup> COSTA MIRANDA, Op. cit., p. 2.

<sup>115</sup> GARZÓN RUIZ, Astrid Xiomara y GÓMEZ GUERRERO, Julieth Andrea. Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleado buffer fosfatos. Tesis de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2007. p. 34.

<sup>116</sup> LIN, Op. cit., p. 243.

<sup>117</sup> GARZÓN RUIZ, Op. cit., p. 23.

<sup>118</sup> LEWIS, Op. cit., p. 463.

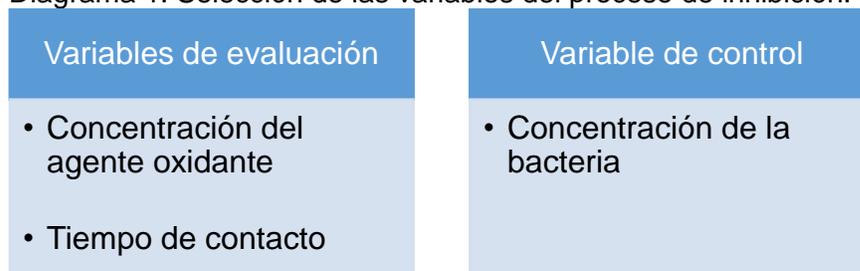
que los rayos de luz tendrían que penetrar, sin embargo, deben permanecer alejados de las fuentes de luz intensa durante su almacenamiento<sup>119</sup>.

Otra causa de desintegración de la solución de hipoclorito de sodio es la presencia de impurezas, referidas a metales pesados como hierro, níquel, cobre, cobalto y manganeso, las cuales también catalizan la reacción de producción de oxígeno y bajo ciertas condiciones estimulan la producción de cloratos; de igual forma, el grafito empleado como ánodo en la celda electrolítica desprende partículas que causan contaminación así como la degradación de la solución<sup>120</sup>.

## 2.2 SELECCIÓN DE VARIABLES Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

**2.2.1 Selección de variables.** Con base en los factores que influyen en la acción antimicrobiana en el proceso de desinfección, es posible realizar una selección de aquellos que tendrían una mayor incidencia sobre la capacidad de inhibición del agente oxidante obtenido por electrólisis de cloruro de sodio, de tal forma que se logre establecer un diseño de experimentos que permita desarrollar y evaluar el objetivo de investigación planteado. La clasificación de estas variables se puede encontrar en el diagrama 1.

Diagrama 1. Selección de las variables del proceso de inhibición.



Fuente: elaboración propia.

**2.2.1.1 Variables de evaluación.** Se estipulan como variables de evaluación aquellos factores que presentan una incidencia real sobre la variable respuesta, estos fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:

- La concentración del agente oxidante es un factor que determina la capacidad de inhibición bacteriana que presenta el desinfectante obtenido, su valor depende del volumen de agua a tratar así como de la cantidad de agentes químicos y la carga microbiana que esta contenga.
- El tiempo de contacto entre el agente clorado y el agua que contiene compuestos químicos y microbiológicos está directamente relacionado con la concentración que se emplee del desinfectante, sin embargo, es una variable que condiciona

<sup>119</sup> LEWIS, Op. cit., p. 471.

<sup>120</sup> PONZANO, Op. cit., p. 22.

la eficiencia del proceso, ya que no se cuenta con un tiempo estándar estipulado para la inhibición de todas las especies microbianas<sup>121</sup>, este es un factor que se debe evaluar y estimar para alcanzar una desinfección microbiológica completa.

**2.2.1.2 Variable de control.** Es aquella a la cual se le ha asignado un valor fijo dentro de un proceso y que es necesaria para lograr determinar la incidencia de las variables de evaluación sobre la variable respuesta. Su selección debe realizarse con base en revisiones bibliográficas o referentes teóricos.

- La concentración bacteriana se establece como una variable a parametrizar en este proyecto investigativo, de acuerdo a lo estipulado por algunos autores se establece en el patrón 2 de McFarland, correspondiente a  $6 \times 10^8$  UFC/mL.

**2.2.2 Diseño de experimentos.** Con base en lo expuesto anteriormente se plantea un diseño de experimentos  $2^4$ , donde los factores tratamiento son la concentración del agente oxidante y el tiempo de contacto y la variable respuesta es la capacidad de inhibición del agente oxidante obtenido por electrólisis de cloruro de sodio, la cual fue determinada en términos de porcentaje de inhibición. Los niveles de variación de los factores tratamiento fueron seleccionados bajo los siguientes criterios:

- Los niveles de la concentración de la solución de hipoclorito de sodio se estiman de acuerdo a datos encontrados bibliográficamente, en donde el valor experimental más empleado fue 1 mg/L<sup>122</sup>, teniendo en cuenta esta concentración y el rango de cloro residual libre que debe permanecer en la solución estipulado por la Resolución 2115 de 2007<sup>123</sup>, se designaron aleatoriamente para esta variable los valores de 1 ppm, 10 ppm, 80 ppm y 100 ppm.
- El tiempo de contacto entre el desinfectante clorado y la muestra a tratar se estipula de acuerdo a valores teóricos encontrados bibliográficamente donde el menor tiempo de contacto fue de 15 minutos<sup>124</sup>, el tiempo óptimo fue de 30 minutos, el tiempo requerido para una inhibición completa de *Escherichia coli* fue de 45 minutos<sup>125</sup> y el tiempo máximo encontrado fue de 60 minutos<sup>126</sup>, quedando esta variable especificada a los niveles de 15, 30, 45 y 60 minutos.

El resumen de este diseño de experimentos se encuentra en el cuadro 2.

---

<sup>121</sup> CORONEL OLIVARES, Op. cit., p. 2155.

<sup>122</sup> LECHEVALLIER, Op. cit., p. 165.

<sup>123</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Op. cit., p. 5.

<sup>124</sup> COSTA MIRANDA, Op. cit., p. 4.

<sup>125</sup> RASHEED, Op. cit., p. 88.

<sup>126</sup> DIAO, Op. cit., p. 1423.

Cuadro 2. Diseño de experimentos.

<b>Factores (2)</b>	<b>Niveles (4)</b>			
Concentración del agente oxidante (ppm)	1	10	80	100
Tiempo de contacto (minutos)	15	30	45	60

Fuente: elaboración propia.

### 2.3 METODOLOGÍA DE LA OBTENCIÓN DEL AGENTE CLORADO POR ELECTRÓLISIS DE CLORURO DE SODIO

La producción del agente clorado mediante electrólisis de cloruro de sodio corresponde a la fase I de este proyecto de investigación, fue desarrollado en el grupo de investigación de Ambiente y Hábitat, por Andrés Camilo Hernández Salamanca y Javier Santiago Tafur Logreira bajo el nombre de “Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable”<sup>127</sup>, en donde se obtuvieron los resultados estipulados en cuadro 3. La metodología para la obtención y posterior evaluación de este desinfectante recopila y replica las condiciones y resultados obtenidos en la fase anteriormente mencionada.

Cuadro 3. Resultados fase I.

<b>Cloruro de sodio gastado</b>	21.2 %	
<b>Cloro residual libre obtenido</b>	3.8713 g/L	
<b>Condiciones de operación</b>	Concentración de NaCl inicial	27 g/L
	Agitación	300 RPM
	Densidad de corriente	4.84 A
	Tiempo de operación	20 min
	Temperatura del proceso	19.5 – 43 °C

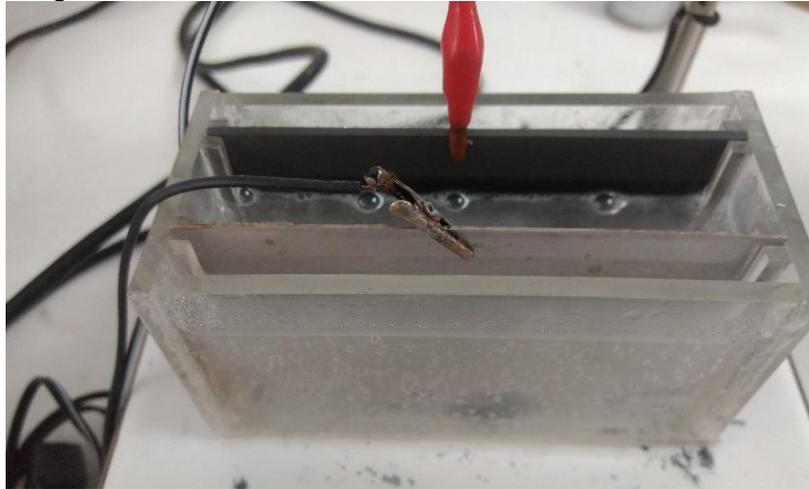
Fuente: HERNÁNDEZ SALAMANCA, Andrés Camilo y TAFUR LOGREIRA, Javier Santiago. Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable. Tesis de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017. p. 128. Modificado por el autor.

Para el desarrollo del proceso electrolítico se empleó una fuente de alimentación marca BAKU de referencia BK-305D, la cual se utiliza para transformar el voltaje alterno proveniente de un tomacorriente en un voltaje continuo y reducido con el fin de suministrar la intensidad de corriente requerida por el proceso; de igual forma, se emplea una celda electrolítica en donde se llevan a cabo las reacciones de óxido-reducción para la obtención del agente oxidante, está diseñada en

<sup>127</sup> HERNÁNDEZ SALAMANCA. Op. cit. 174 p.

polimetilmetacrilato (PMMA) y funciona como un sistema Batch con agitación poco abrasiva que mantiene constante la concentración dentro de la celda, contiene un electrolito compuesto por una solución de 27 g/L de cloruro de sodio en agua destilada, así como un ánodo de grafito y un cátodo de acero inoxidable que funcionan como los electrodos del proceso<sup>128</sup>, el montaje de la celda electrolítica se puede observar en la imagen 3.

Imagen 3. Celda electrolítica.



Fuente: elaboración propia.

Inicialmente, se deben preparar 250 cm<sup>3</sup> de la solución de cloruro de sodio empleada como electrolito, la cual se adiciona a la celda electrolítica una vez se encuentran ubicados el ánodo y el cátodo dentro de las ranuras dispuestas para tal fin; dado que el proceso requiere de agitación constante, es necesario ubicar la celda sobre una plancha de agitación evitando cualquier roce del agitador magnético con los electrodos y establecer la velocidad de agitación requerida. Los electrodos deben ser conectados a la fuente de poder teniendo presente su polaridad para finalmente, estipular la intensidad de corriente que esta proporcionará. El montaje y el protocolo de este proceso se puede observar en la imagen 4 y el anexo B, respectivamente.

Después de transcurrido el tiempo de electrólisis se procede a determinar la concentración de cloro residual libre presente en el agente clorado obtenido mediante el método colorimétrico de la DPD, la cual es una técnica avalada por la *American Water Works Association (AWWA)* en su manual "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*" en el método 4500-Cl-G<sup>129</sup>, del cual se deriva el procedimiento aplicado en el presente trabajo investigativo. El resumen de

---

<sup>128</sup> HERNÁNDEZ SALAMANCA, Op. cit., p. 128.

<sup>129</sup> AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20 ed. American Water Works Association. 1999.

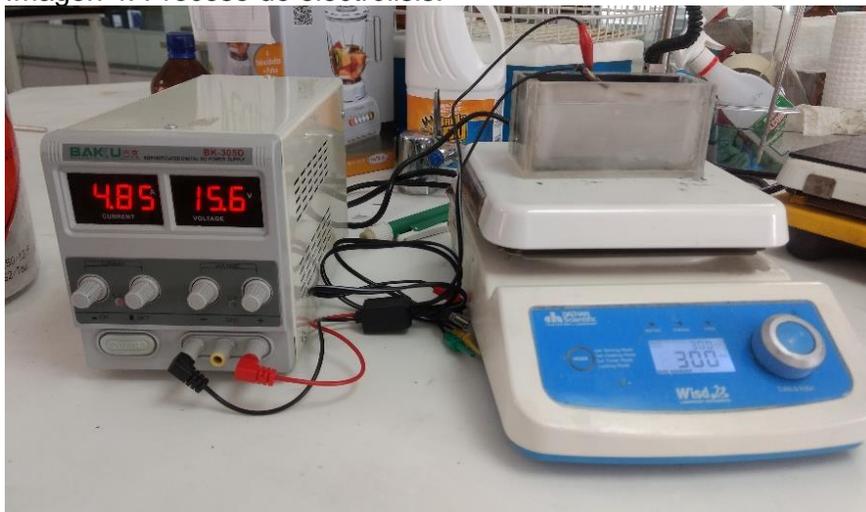
los parámetros de operación empleados en la electrólisis se encuentra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Parámetros de operación para la electrólisis.

Propiedad	Parámetro
Ánodo	Grafito
Cátodo	Acero inoxidable
Concentración de sal (g/L)	27
Densidad de corriente (A/dm <sup>2</sup> )	4.84
Agitación (RPM)	300
Dimensiones celda	Ancho: 12 cm
	Alto: 6 cm
	Profundidad: 5 cm
Dimensiones del ánodo	Ancho: 12 cm
	Alto: 6 cm
	Profundidad: 3 mm
Dimensiones del cátodo	Ancho: 12 cm
	Alto: 6 cm
	Profundidad: 2 mm
Distancia entre electrodos	1.5 cm
Volumen del electrolito	250 cm <sup>3</sup>
Tiempo de operación	20 min

Fuente: HERNÁNDEZ SALAMANCA, Andrés Camilo y TAFUR LOGREIRA, Javier Santiago. Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable. Tesis de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017. 174 p. Modificado por el autor.

Imagen 4. Proceso de electrólisis.

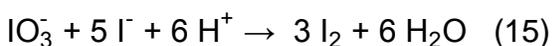


Fuente: elaboración propia.

**2.3.1 Método colorimétrico de la DPD.** Consiste en la oxidación del compuesto N,N-dietilfenileno-1,4 diamina (DPD) en un radical semiquinónico que varía su tonalidad a rosado por la presencia de un agente oxidante, en este caso, el hipoclorito de sodio, la intensidad de la tonalidad presentada tendrá una relación directa con la concentración del oxidante dentro de la muestra, la cual se evalúa a través de una curva de calibración por medio de la relación entre la absorbancia de la solución y la concentración de cloro en mg/L que esta posea. Para determinar la absorbancia se emplea un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm con celdas de 1 cm de espesor<sup>130</sup>.

Este es un método que sirve para distinguir las diversas especies que el cloro puede conformar, teniendo la capacidad de diferenciar el cloro libre del cloro combinado, no obstante, la determinación de cloraminas requiere de la adición de iones de yodo<sup>131</sup>.

**2.3.1.1 Curva de calibración.** Se emplea para determinar la concentración de cloro activo presente en una solución, su funcionamiento consiste en relacionar la absorbancia de la muestra con la concentración de cloro en mg/L de la misma; teóricamente su construcción debería realizarse a partir de una solución madre de cloro cuya concentración haya sido determinada por yodometría, y a partir de esta preparar las diluciones requeridas que acoten un rango amplio de mg/L de cloro, no obstante, el cloro presenta baja estabilidad cuando se encuentra en solución, por lo cual se requiere emplear un reactivo que presente el mismo comportamiento frente a la DPD que este y que permita hacer una relación adecuada entre los valores obtenidos y la concentración de cloro real de la muestra, adicionalmente, debe ser un agente oxidante de fácil manipulación y control. Para esta experimentación se decidió emplear una solución de yodato potásico yodurado, en donde el yodato reacciona para formar yodo, el cual presenta el mismo comportamiento del cloro frente a la molécula de DPD, de tal forma que 1 mol de yodato producirá tres moles de yodo las cuales representan tres moles de cloro, tal como se puede observar en la reacción 15.



Para construir la curva de calibración se requiere la preparación de soluciones que contengan diferentes concentraciones de una solución patrón de yodato potásico yodurado, a las cuales se les adiciona ácido sulfúrico e hidróxido de sodio de acuerdo a lo estipulado en el cuadro N° 5.

---

<sup>130</sup> AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Op cit., p. 1105.

<sup>131</sup> ROMERO ROJAS, Op. cit., 290.

Cuadro 5. Soluciones curva de calibración.

Solución patrón yodato potásico yodurado (mL)	0	3	5	10	25	50
Solución ácido sulfúrico 2N	1 mL					
Esperar 1 minuto						
Solución hidróxido sodio 2N	1 mL					
Agua desionizada	Hasta 100 mL					
Corresponde a mg Cl/L	0	0,3	0,5	1	2,5	5

Fuente: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. American Water Works Association. 1999. Modificado por el autor.

La solución tampón fosfato y la solución indicadora de DPD son adicionadas una vez se tengan las diluciones correspondientes a cada punto de la curva de calibración; posteriormente, se procede a medir la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY de referencia 6320D, teniendo presente que para la medición de cada muestra se debe preparar un nuevo blanco, el cual está constituido por 1mL de una solución 2N de ácido sulfúrico y 1 mL de una solución 2N de hidróxido de sodio diluidos en 100 mL de agua desionizada. El procedimiento de construcción de la curva de calibración se encuentra consignado en el anexo C de este documento.

Dado que el método colorimétrico de la DPD posee un rango definido de determinación de cloro, es necesario realizar una dilución de 1 a 1000 de la muestra tomada, es decir 100 µL de hipoclorito de sodio para analizar, para esto se requiere tomar 5 mL de la solución tampón fosfato y 5 mL de la solución de DPD, a los cuales se les adicionará la muestra de 100 µL de hipoclorito de sodio diluida en 100 mL de agua desionizada, posteriormente se procederá a determinar la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro, por consiguiente se requiere preparar el blanco empleado en la curva de calibración con el fin de ajustar el equipo dentro de los rangos de medición requeridos. El espectrofotómetro empleado se puede observar en la imagen 5.

Imagen 5. Medición espectrofotómetro.



Fuente: elaboración propia.

## 2.4 METODOLOGÍA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA BACTERIA *Escherichia coli*

**2.4.1 Duplicación bacteriana.** La cepa empleada en la experimentación fue *Escherichia coli* ATCC 25922, inicialmente se procedió a regenerar y duplicar el cultivo bacteriano, para lo cual se emplearon 200 mL de solución salina estéril, la cual fue inoculada a partir del cultivo original de bacteria, posteriormente, se procedió a realizar una siembra por estría en cinco cajas de Petri servidas con agar nutritivo previamente esterilizado, una vez realizado este procedimiento se llevaron las cajas a incubación a 37 °C por 24 horas. La información correspondiente al agar nutritivo se puede encontrar en el anexo D.

**2.4.2 Patrón de McFarland.** Son patrones que permiten cuantificar el número de UFC presentes en una suspensión bacteriana mediante la determinación de su turbidez, se preparan a partir de una solución de cloruro de bario al 1.175% adicionada a una solución de ácido sulfúrico al 1%, generando un precipitado de sulfato de bario que pueda ser comparable con la suspensión a evaluar. La cuantificación de la carga bacteriana se realiza empleando una plantilla con líneas a través de las cuales se puede comparar la nitidez de las rectas, al enfrentar una alícuota del patrón seleccionado contra una alícuota de la suspensión del inóculo. Si la solución bacteriana no cuenta con la suficiente turbidez se requerirá adicionar mayor cantidad de colonias, en cambio, si es demasiado turbia, se podrá diluir con más diluyente, buscando siempre igualar la nitidez del patrón seleccionado<sup>132</sup>, este procedimiento puede ser observado en la imagen 6. Los volúmenes requeridos para

<sup>132</sup> CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad. En: Medicina & laboratorio. 2009. vol. 15. no. 11-12. p. 557-558.

preparar la escala de patrones se encuentran consignado en la tabla 1. Cabe resaltar que las soluciones pueden preservarse hasta seis meses en buenas condiciones de almacenamiento<sup>133</sup>.

Tabla 1. Patrones de McFarland.

N° Turbidez	Cloruro de bario (1.175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Densidad de bacterias aprox. (UFC/mL)
1	0.1 mL	9.9 mL	$3 \times 10^8$
2	0.2 mL	9.8 mL	$6 \times 10^8$
3	0.3 mL	9.7 mL	$9 \times 10^8$
4	0.4 mL	9.6 mL	$12 \times 10^8$
5	0.5 mL	9.5 mL	$15 \times 10^8$
6	0.6 mL	9.4 mL	$18 \times 10^8$
7	0.7 mL	9.3 mL	$21 \times 10^8$
8	0.8 mL	9.2 mL	$24 \times 10^8$
9	0.9 mL	9.1 mL	$27 \times 10^8$
10	1.0 mL	9.0 mL	$30 \times 10^8$

Fuente: CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad. En: Medicina & laboratorio. 2009. vol. 15. no. 11-12. p. 559. Modificado por el autor.

Imagen 6. Comparación de turbidez.



Fuente: CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad. En: Medicina & laboratorio. 2009. vol. 15. no. 11-12. p. 559.

<sup>133</sup> CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Op. cit., p. 558.

**2.4.3 Preparación inóculo.** Para realizar la evaluación de la capacidad de inhibición de *Escherichia coli* que posee el desinfectante clorado, se requirió la preparación de una muestra a base de solución salina estéril al 0.85%, inoculada con *Escherichia coli* hasta alcanzar el patrón N° 2 de McFarland, posteriormente, se adicionaron volúmenes iguales de 100 mL de la solución salina con bacteria en cuatro recipientes ámbar a los cuales se les agregó la solución de hipoclorito de sodio, previamente obtenida por electrólisis de cloruro de sodio, a una concentración de 1 ppm. El volumen de 100 mL empleado para la evaluación de la capacidad de inhibición del agente oxidante está determinado de acuerdo a la Resolución 2115 de 2007<sup>134</sup>. Una vez se obtienen las muestras con microorganismo y desinfectante se llevan a un shaker para su agitación a 150 RPM, estas fueron retiradas conforme pasaban los tiempos de contacto estipulados en el diseño de experimentos, el montaje de este procedimiento se puede observar en la imagen 7. Con la finalidad de asegurar la homogeneidad del cultivo bacteriano dentro de las muestras, se realizaron coloraciones de Gram a las soluciones salinas antes de ser distribuidas en los diferentes recipientes. Cabe resaltar que este procedimiento también fue realizado para las concentraciones de 10, 80 y 100 ppm.

Imagen 7. Agitación de muestras.



Fuente: elaboración propia.

**2.4.4 Neutralización del cloro con tiosulfato de sodio.** Al momento de finalizar los tiempos de contacto estipulados en el diseño de experimentos se procedió a retirar las muestras del shaker para su evaluación. Una vez retirados los recipientes se les adicionó una solución de tiosulfato de sodio, el cual es un compuesto comúnmente empleado para frenar la acción del cloro en una muestra ya sea parcial

<sup>134</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Op. cit., p. 6.

o totalmente, esto con el fin de asegurar que los resultados microbiológicos reflejen el estado real del agua al momento del monitoreo de calidad; de acuerdo a lo estipulado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM)<sup>135</sup> la concentración adecuada de este agente decolorante es de 10%. Cabe resaltar que se han realizado investigaciones previas que aseguran que adicionar soluciones de tiosulfato de sodio a muestras cloradas y no cloradas, no afecta la supervivencia de la bacteria *Escherichia coli* y si neutraliza el cloro residual libre presente dentro de estas<sup>136</sup>.

Para determinar la cantidad de solución de tiosulfato de sodio al 10% requerida para frenar la acción del cloro a las concentraciones estipuladas en el diseño de experimentos, se realizó una titulación a una solución de 100 mL de agua desionizada que contenga el agente oxidante a una concentración de 100 ppm con el indicador ortolidina, el cual toma una coloración amarilla en presencia de cloro y es incoloro en su ausencia. Esta titulación se llevó hasta el viraje del indicador perdiendo su tonalidad. Para determinar el volumen de decoloración requerido para las concentraciones de 1, 10 y 80 ppm se realizó una relación entre los mililitros gastados de la solución de tiosulfato de sodio al 10% y la concentración a 100 ppm.

**2.4.5 Filtración por membrana.** Una vez decolorada la muestra se realizó la filtración por membrana de acuerdo al procedimiento estipulado por la American Water Works Association (AWWA) en su manual Standard Methods<sup>137</sup>. Este procedimiento requiere armar el montaje estipulado en la sección 1.7 de este documento. Una vez realizado el montaje del equipo se procede a filtrar la muestra decolorada con ayuda de una bomba de vacío, cuando finaliza la filtración se recoge el filtro y se siembra en cajas de Petri que contienen el medio de cultivo Endo-Agar, tal como se puede observar en la imagen 8, estas cajas se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C. Para este procedimiento se emplearon filtros de membrana hechos de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm, los cuales se pueden observar en la imagen 9.

El equipo de filtración por membrana fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio por cinco minutos y posteriormente en una solución de tiosulfato de sodio al 10% después de cada filtración, con el fin de poder evaluar exactamente la cantidad de microorganismos presentes en la muestra después de la desinfección.

---

<sup>135</sup> INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Determinación de coliformes totales y *E. coli* de aguas mediante la técnica de sustrato definido, colilert por el método del Número más Probable [en línea]. TP0423. 2 ed. 2007. p. 6. Disponible: <<http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+agua+NMP+M%C3%A9todo+Colilert.pdf/463a6c8d-122c-4f75-8572-81bd64baa2d2>>.

<sup>136</sup> Ibid., p. 3.

<sup>137</sup> AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Op. cit., p. 1427.

Imagen 8. Caja sembrada.



Fuente: elaboración propia.

Imagen 9. Filtro de membrana.

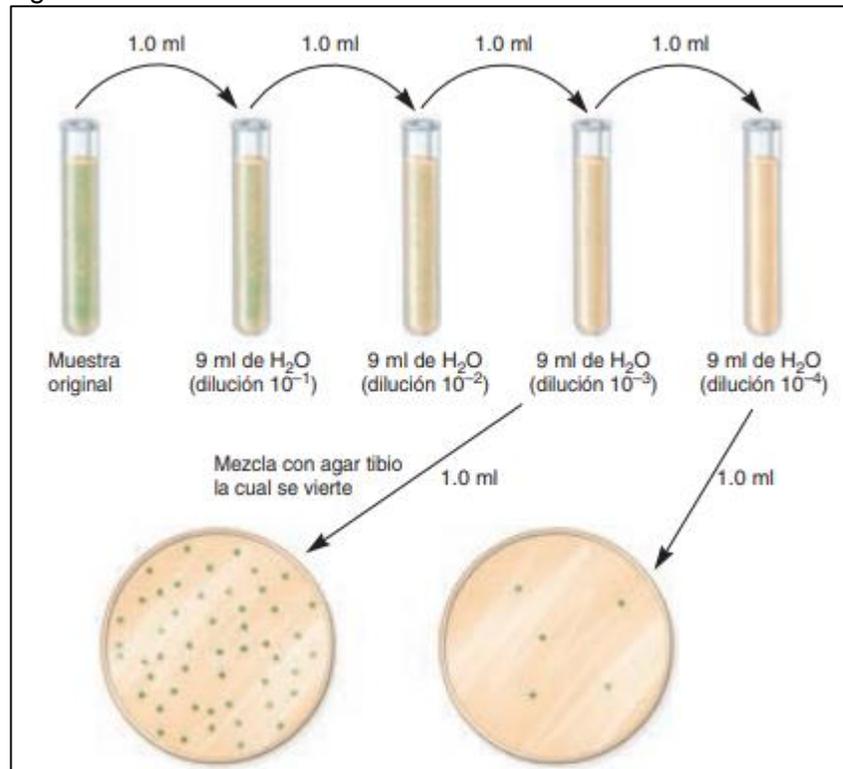


Fuente: elaboración propia.

**2.4.6 Recuento en placa.** Después de las 24 horas de incubación se tomaron las cajas de Petri para realizar el recuento en placa, la cual es una técnica que permite determinar el número de bacterias presentes en una muestra mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y de esta forma por poder determinar la eficiencia del agente clorado obtenido por electrólisis de cloruro de sodio. Cuando la suspensión bacteriana está muy concentrada, se requieren de diluciones seriadas de la muestra con el fin de reducir la población y facilitar el conteo de células en el

agar<sup>138</sup>. La dilución consiste en tomar 1 mL de una muestra original del caldo bacteriano y trasvasar 1 mL de esta solución a un nuevo tubo que contenga 9 mL de agua estéril, con el fin de lograr una dilución de 1 en 10 del número de células presentes, este procedimiento se debe repetir las veces que se considere necesario y se ejemplifica en la figura 9. Es recomendable sembrar en cajas de Petri las dos últimas diluciones realizadas.

Figura 9. Diluciones seriadas.



Fuente: BROOKS, Geo. F., *et al.* Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25 ed. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2011. p. 72. ISBN 978-607-15-0503-3.

<sup>138</sup> BROOKS, Op. cit., p. 73.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 OBTENCIÓN DEL AGENTE CLORADO

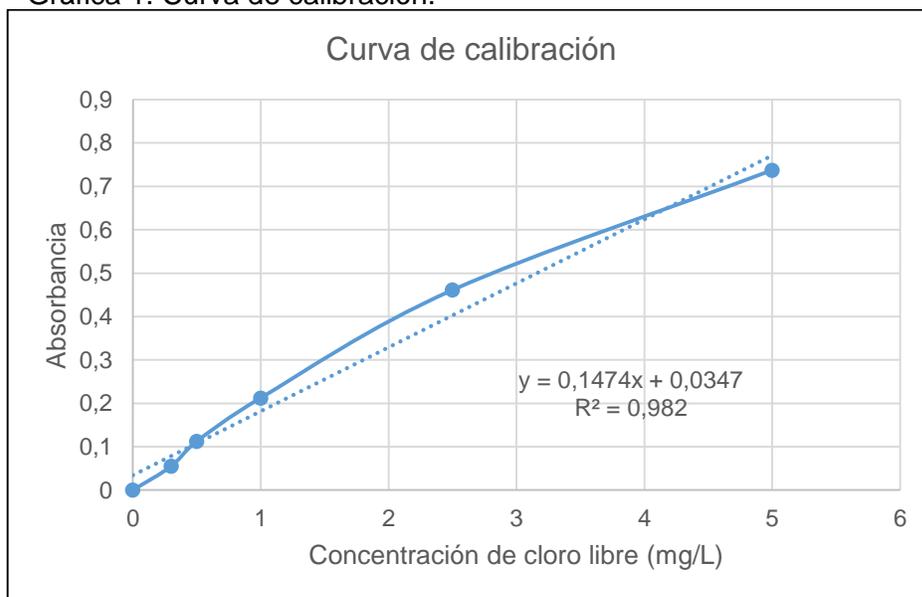
**3.1.1 Curva de calibración.** A partir de la metodología propuesta en la sección 2.3.1.1 se construyó la curva de calibración requerida para esta experimentación, dando como resultado los datos consignados en la tabla 2, los cuales fueron obtenidos de un promedio de cuatro replicas con el fin de obtener la mínima desviación posible. Los valores resultantes fueron graficados y linealizados para determinar la ecuación que relaciona la concentración de cloro libre de una muestra en mg/L con su absorbancia. La curva de calibración obtenida se muestra en la gráfica 1.

Tabla 2. Datos curva de calibración.

<b>Concentración cloro libre (mg/L)</b>	<b>Absorbancia Promedio</b>
0	0.000
0.300	0.055
0.500	0.113
1.000	0.213
2.500	0.461
5.000	0.738

Fuente: elaboración propia.

Gráfica 1. Curva de calibración.



Fuente: elaboración propia.

De la linealización de la curva de calibración se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.982 y la siguiente ecuación:

$$y = 0.1475 x + 0.0347 \quad (1)$$

**3.1.2 Concentración del agente clorado.** Mediante el método colorimétrico de la DPD fue posible determinar las concentraciones de hipoclorito de sodio resultantes de las electrólisis de cloruro de sodio realizadas en esta etapa experimental, obteniendo así una concentración promedio de 3.069 g/L; comparando con la fase I de este trabajo investigativo, donde se obtuvo una concentración de hipoclorito de sodio promedio de 3.8713 g/L<sup>139</sup>, se procede a analizar el porcentaje de error entre estas dos mediciones, así:

- Porcentaje de error

$$\% \text{ Diferencia} = \left| \frac{\text{Concentración fase I} - \text{Concentración fase II}}{\text{Concentración fase I}} \right|$$

$$\% \text{ Diferencia} = \left| \frac{3.8713 \text{ g/L} - 3.069 \text{ g/L}}{3.8713 \text{ g/L}} \right| \rightarrow \% \text{ Diferencia} = 20.72\%$$

Es fácilmente apreciable que en la fase I de esta etapa investigativa se obtuvo un agente oxidante con mayor concentración de cloro residual libre, dando un porcentaje de diferencia del 20.72% con respecto a la fase actual, esto se pudo dar por cambios experimentales relacionados con el método colorimétrico de la DPD, para el cual se construyó una nueva curva de calibración empleando celdas espectrofotométricas diferentes a las utilizadas en la fase I, de igual forma, se debe considerar el tiempo de vida útil de los reactivos empleados dado que la solución de DPD se oxida muy fácilmente, lo que produce un valor de absorbancia diferente del valor real. También es importante considerar el desgaste del ánodo de grafito a medida que se realizaron los procesos de electrólisis y las fallas estructurales que pudo presentar la celda electrolítica.

En la imagen 10 se pueden apreciar las soluciones resultantes del método colorimétrico de la DPD para la determinación de cloro residual libre después de un proceso de electrólisis.

---

<sup>139</sup> HERNÁNDEZ SALAMANCA. Op. cit., p. 128.

Imagen 10. Blanco y solución para determinación de cloro residual libre.



Fuente: elaboración propia.

### 3.2 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *E. coli*

**3.2.1 Volumen de hipoclorito de sodio.** El volumen de la solución de agente oxidante requerido para alcanzar las concentraciones estipuladas en el diseño de experimentos de 1, 10, 80 y 100 ppm en una muestra de 100 mL, se determinó a partir de la absorbancia al finalizar el proceso de electrólisis de cloruro de sodio y la ecuación dada por la curva de calibración. A continuación se realizará una muestra de cálculo para determinar el volumen requerido de la solución de hipoclorito de sodio para la evaluación de la concentración de 100 ppm. Se empleará un valor de absorbancia de 0.487 el cual se obtiene de un promedio de mediciones de los procesos de electrólisis realizados.

$$y = 0.1475 x + 0.0347$$

$$0.487 = 0.1475 x + 0.0347$$

$$x = \frac{0.487 - 0.0347}{0.1475} \rightarrow x = 3.07 \text{ g/L}$$

Inicialmente se determina la concentración a la cual se obtiene la solución de hipoclorito de sodio empleando la ecuación dada por la curva de calibración, donde Y es la absorbancia de la muestra y X es la concentración de cloro residual libre en g/L. Para una solución cuya absorbancia sea de 0.487 se tendrá una concentración de cloro residual libre de 3.07 g/L. Posteriormente se procede a determinar el volumen de solución requerido.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (2)$$

$$V_2 = \frac{C_1V_1}{C_2} \rightarrow V_2 = \frac{100 \text{ mg/L} * 100 \text{ mL}}{3.07 \text{ g/L} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}$$

$$V_2 = 3.257 \text{ mL}$$

Se necesita un volumen de 3.258 mL de una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 3.069 g/L para alcanzar la concentración de 100 ppm en una muestra de 100 mL. Este cálculo fue realizado por cada proceso de electrólisis con el fin de determinar el volumen necesario del agente oxidante para cada una de las concentraciones a evaluar.

**3.2.2 Neutralización con tiosulfato de sodio.** La titulación de la solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 100 ppm gastó 0.6 mL de la solución decolorante de tiosulfato del sodio al 10%, con base en este resultado se logró determinar la cantidad de tiosulfato de sodio al 10% requerida para inactivar la acción de cloro en las muestras empleadas en esta experimentación a las concentraciones de 1, 10 y 80 ppm. Se debe tener en cuenta que tanto para la titulación como para las muestras de evaluación de la inhibición del agente clorado se emplearon 100 mL de solución.

$$\begin{array}{l} 100 \text{ ppm} \rightarrow 0.6 \text{ mL} \\ 1 \text{ ppm} \rightarrow x \text{ mL} \end{array}$$

$$x \text{ mL} = \frac{1 \text{ ppm} * 0.6 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$x \text{ mL} = 0.006 \text{ mL}$$

Mediante la muestra de cálculo anterior se puede determinar que se requieren 0.006 mL de tiosulfato de sodio al 10% para decolorar una muestra de hipoclorito de sodio a una concentración de 1 ppm. En la tabla 3 se encuentran consignados los volúmenes requeridos para inactivar la acción del cloro a las diferentes concentraciones de esta experimentación.

Tabla 3. Volumen de tiosulfato de sodio al 10% requerido en la decoloración.

<b>Concentración de la solución (ppm)</b>	<b>Volumen decoloración (mL)</b>
1	0.006
10	0.06
80	0.48
100	0.6

Fuente: elaboración propia.

**3.2.3 Recuento en placa.** Después de las 24 horas de incubación de las cajas de Petri con los filtros resultantes de la filtración por membrana se procede a determinar las unidades formadoras de colonias mediante la técnica de recuento en placa para cada experimento y su repetición. Con base en los primeros resultados que se obtuvieron de esta experimentación fue necesario emplear el procedimiento de diluciones seriadas, ya que el número de colonias presentes en las cajas a las concentraciones de 1 ppm y 10 ppm eran incontables. Los resultados del conteo obtenidos están consignados en el cuadro 6.

Cuadro 6. Unidades formadoras de colonia presentes.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	UFC/mL 1era corrida	UFC/mL 2da corrida
1	15	3.40E+07	4.20E+07
	30	1.36E+07	1.78E+07
	45	6.00E+03	9.50E+06
	60	2.99E+06	2.95E+06
10	15	2.70E+07	4.80E+07
	30	1.00E+05	1.52E+06
	45	6.00E+04	2.30E+04
	60	1.00E+04	5.00E+04
80	15	0	0
	30	0	0
	45	0	0
	60	0	0
100	15	0	0
	30	0	0
	45	0	0
	60	0	0

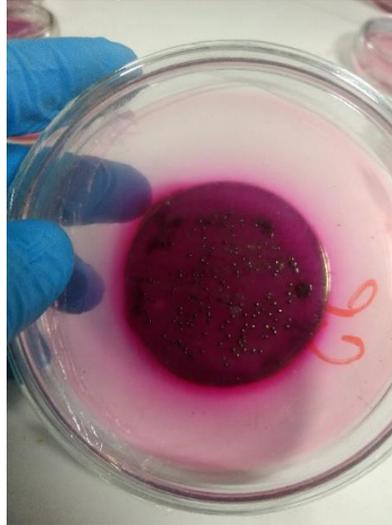
Fuente: elaboración propia.

**3.2.4 Porcentaje de inhibición.** Para poder determinar el porcentaje de inhibición de la bacteria por el desinfectante clorado, se realizó un control positivo de la solución salina inoculada, para esto se preparó hasta la octava dilución seriada a partir de un mililitro de solución con microorganismo, posteriormente se filtró y se sembró el filtro para que después de 24 horas en incubación se pudiera realizar un conteo de las unidades formadoras de colonia presentes, encontrándose que habían  $2.79 \times 10^{11}$  UFC/mL. La presencia de colonias en este control positivo se puede observar en la imagen 11.

El porcentaje de inhibición es un indicador de la eficiencia que posee la solución de hipoclorito de sodio obtenida por electrólisis de cloruro de sodio, se puede medir con base en la fórmula que sugiere Coronel Olivares en el artículo "*Chlorine disinfection of Pseudomonas aeruginosa, total coliforms, Escherihia coli and*

*Enterococcus faecalis*: revisiting reclaimed water regulations<sup>140</sup>, en donde se determina el porcentaje de inhibición de microorganismos relacionando las unidades formadoras de colonias al iniciar y al finalizar cada corrida experimental siguiendo la ecuación 2.

Imagen 11. Control positivo de la experimentación.



Fuente: elaboración propia.

$$\% I = \frac{(T_0 - T_1)}{T_0} * 100 \quad (3)$$

En donde, I simboliza el porcentaje de inhibición, To representa el número de unidades formadoras de colonias antes de empezar la desinfección, es decir  $2.79 \times 10^{11}$  UFC/mL y T1 muestra el número de unidades formadoras de colonias cuantificadas en los tiempos estipulados en el diseño de experimentos; los valores de T1 están consignados en el cuadro 6. A continuación se realizará una muestra de cálculo del porcentaje de inhibición calculado para una concentración de 1 ppm y un tiempo de contacto de 15 minutos. Los porcentajes de inhibición de cada experimento y su repetición se encuentran en el cuadro 7.

$$\% I = \frac{(T_0 - T_1)}{T_0} * 100$$

$$\% I = \frac{(2.79 \times 10^{11} \text{ UFC/mL} - 3.40 \times 10^7 \text{ UFC/mL})}{2.79 \times 10^{11} \text{ UFC/mL}} * 100 \rightarrow \% I = 99.988\%$$

<sup>140</sup> CORONEL OLIVARES. Op. cit., p. 2152.

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición.

Experimento	Tiempo (min)	Concentración (ppm)			
		1	10	80	100
1ª corrida	15	99,988	99,990	100,000	100,000
	30	99,995	100,000	100,000	100,000
	45	100,000	100,000	100,000	100,000
	60	99,998	100,000	100,000	100,000
2ª corrida	15	99,985	99,983	100,000	100,000
	30	99,994	99,999	100,000	100,000
	45	99,996	100,000	100,000	100,000
	60	99,998	100,000	100,000	100,000

Fuente: elaboración propia.

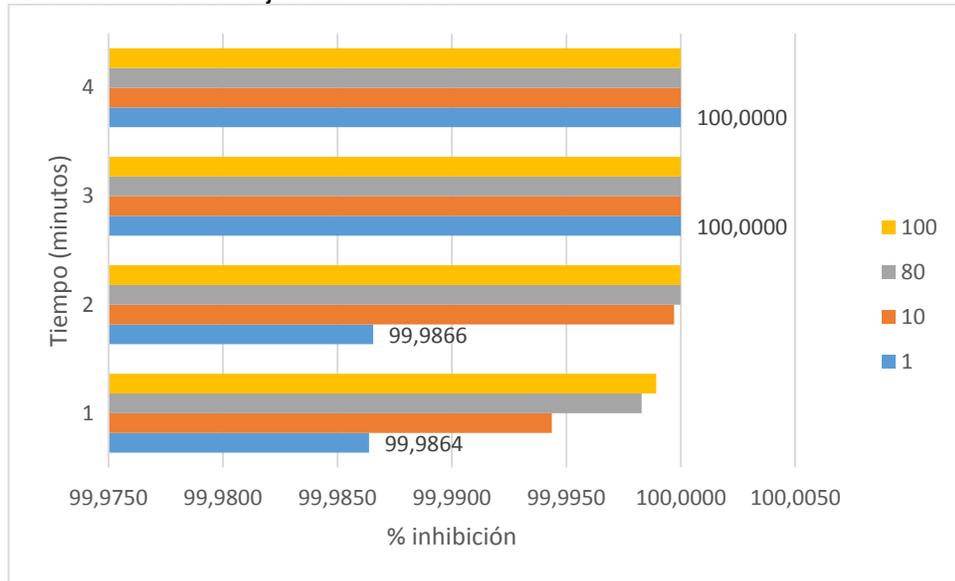
**3.2.5 Análisis de resultados.** Con base en los porcentajes de inhibición presentados en el cuadro 7 se realiza una comparación ilustrada en la gráfica 2, construida a partir del cálculo del promedio de los porcentajes de inhibición para cada experimento y su repetición, donde se puede observar que aunque el desinfectante clorado producido por electrólisis de cloruro de sodio presenta altos porcentajes de inhibición para todos los experimentos realizados, no inhibió completamente el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en concentraciones bajas aun cuando su tiempo de exposición fue el mayor, no obstante, en los experimentos a concentraciones de hipoclorito de sodio de 80 y 100 ppm la inhibición fue completa, incluso frente al menor tiempo de exposición. En la gráfica se observa que el menor porcentaje de inhibición fue de 99.9864% a una concentración de 1 ppm para el menor tiempo de exposición, es decir 15 minutos.

En la imagen 12, se pueden observar las cajas resultantes de la experimentación después de 24 horas de incubación a 37 °C, en donde es visible el crecimiento de colonias a bajas concentraciones y la ausencia de microorganismos en altas concentraciones. Se debe especificar que aunque en la tabla 4 se indiquen porcentajes de inhibición de 100% para la concentración de 10 ppm en los tiempos de 30, 45 y 60 minutos, hubo crecimiento microbiano en todas las cajas a esta concentración, este error sucede debido a que matemáticamente el dato calculado por la fórmula de inhibición presenta muchos decimales, por lo tanto, el sistema lo aproxima al 100%.

En la tabla 4 se presentan los porcentajes de inhibición teóricos encontrados en diversos artículos mediante la matriz de revisión bibliográfica con el fin de realizar una comparación entre los resultados de los autores y los de este trabajo investigativo. Es posible observar que los porcentajes de inhibición teóricos expresados por Costa Miranda y Rasheed no concuerdan con los resultados experimentales de esta investigación ya que a la concentración de 1 ppm y al máximo tiempo de contacto con el agente clorado se encuentra crecimiento bacteriano en las cajas, por lo tanto la inhibición no sería del 100%, sin embargo, si

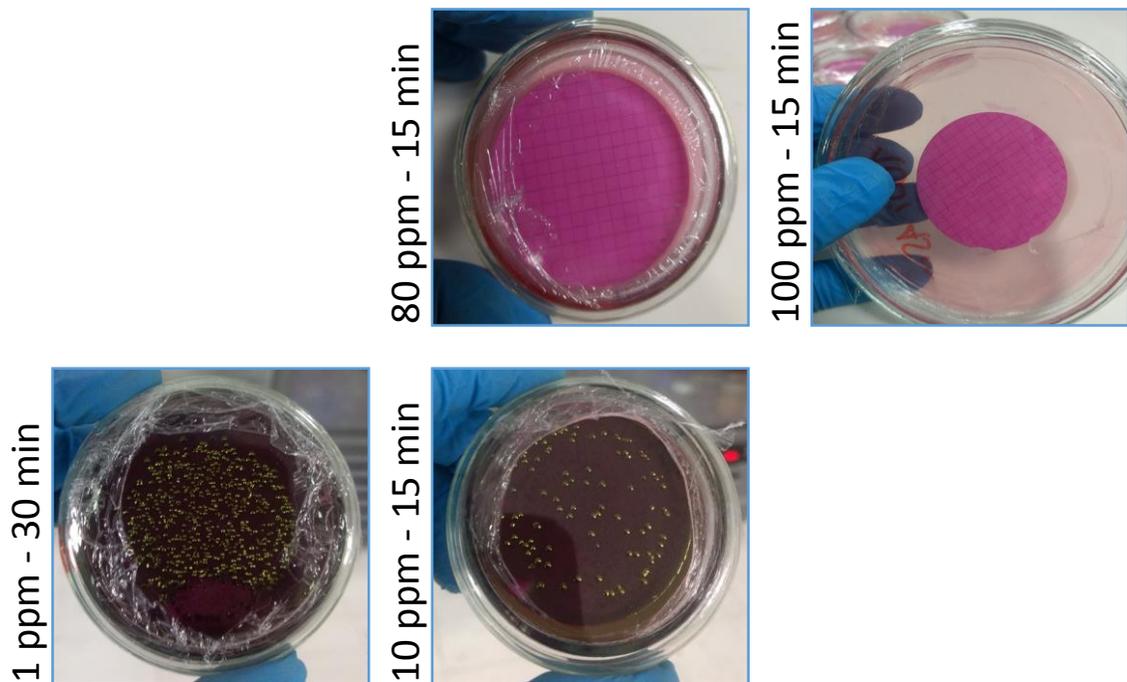
existe similitud en los resultados estipulados por Diao y Lewis, ya que a medida que aumenta la concentración del agente clorado aumenta el porcentaje de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*.

Gráfica 2. Porcentajes de inhibición.



Fuente: elaboración propia.

Imagen 12. Crecimiento bacteriano en las cajas resultantes.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Comparación % inhibición.

Autor	Concentración (mg/L)	Tiempo (min)	% Inhibición
Wang <sup>141</sup>	1	10	90%
Costa Miranda <sup>142</sup>	1	15	100%
Rasheed <sup>143</sup>	1	45	100%
Diao <sup>144</sup>	5	30 – 60	99.94%
Lewis <sup>145</sup>	10	30	99%
Coronel Olivares <sup>146</sup>	30	30	87.40%

Fuente: elaboración propia.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos con la Resolución 2115 de 2007<sup>147</sup>, donde se estipula que un agua para ser avalada como de consumo, debe presentar 0 UFC/mL del indicador microbiológico de contaminación fecal, *Escherichia coli*, se encuentra que solo las concentraciones de 80 ppm y 100 ppm desde el mínimo tiempo (15 min) cumplen con esta normatividad. Sin embargo, deben realizarse análisis más profundos que confirmen la calidad de agua desde otros parámetros para ser aceptada como consumible para el ser humano.

**3.2.6 Análisis estadístico.** A partir de los valores obtenidos durante el desarrollo de la experimentación se procede a realizar un análisis ANOVA, el cual se emplea para determinar la importancia que tienen la concentración de la solución de hipoclorito de sodio, el tiempo de contacto o la interacción de estas dos variables sobre la variable respuesta, la cual es el porcentaje de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*. Este método consiste en comparar las medias de la variable respuesta asociadas a los diferentes niveles que posea un factor, de tal forma que establezca el comportamiento del proceso y logre predecir los valores que tomará esta variable respuesta bajo ciertas condiciones<sup>148</sup>. Los factores junto con sus niveles fueron especificados en el cuadro 2 y este análisis se llevó a cabo con una prueba gratuita de 30 días en el software Design Expert. Los resultados del ANOVA realizado se encuentran en la tabla 5, de la cual es posible inferir que los tanto los factores principales así como su interacción poseen un efecto significativo en el porcentaje de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*, esto debido a que se obtienen valores de P inferiores a 0.05, por lo cual se rechaza la hipótesis nula de la prueba, la cual estipula que el agente clorado producido por electrólisis de cloruro de sodio no inhibe a la bacteria *Escherichia coli*.

<sup>141</sup> WANG, Op. cit., p. 339.

<sup>142</sup> COSTA MIRANDA, Op. cit., p. 5.

<sup>143</sup> RASHEED, Op. cit., p. 91.

<sup>144</sup> DIAO, Op. cit., p. 1423.

<sup>145</sup> LEWIS, Op. cit., p. 466.

<sup>146</sup> CORONEL OLIVARES, Op. cit., p. 2156.

<sup>147</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD, Op. cit., p. 5.

<sup>148</sup> MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México: Limusa Wiley, 2004. p. 25

Tabla 5. ANOVA.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	0.0006	15	0.0000	17.52	<0.0001	significant
A-Concentración	0.0002	3	0.0001	24.10	<0.0001	
B-Tiempo	0.0002	3	0.0001	30.68	<0.0001	
AB	0.0002	9	0.0000	10.94	<0.0001	
<b>Pure Error</b>	0.0000	16	2.460E-06			
<b>Cor Total</b>	0.0007	31				

Fuente: elaboración propia. Programa: Design Expert

Adicionalmente, se obtuvo el valor de  $R^2$ , el cual indica una buena proporción de la variable respuesta al ser descrita por las variables independientes y Adeq Precision que proporciona una relación señal/ruido la cual es una medida que identifica los factores de control que logran reducir la variabilidad del proceso minimizando el ruido presente, es decir los factores que no se pueden controlar, por lo cual se puede concluir que la relación presenta una señal alta disminuyendo la variabilidad del proceso, tal como se observa en tabla 6.

Tabla 6. Estadísticas.

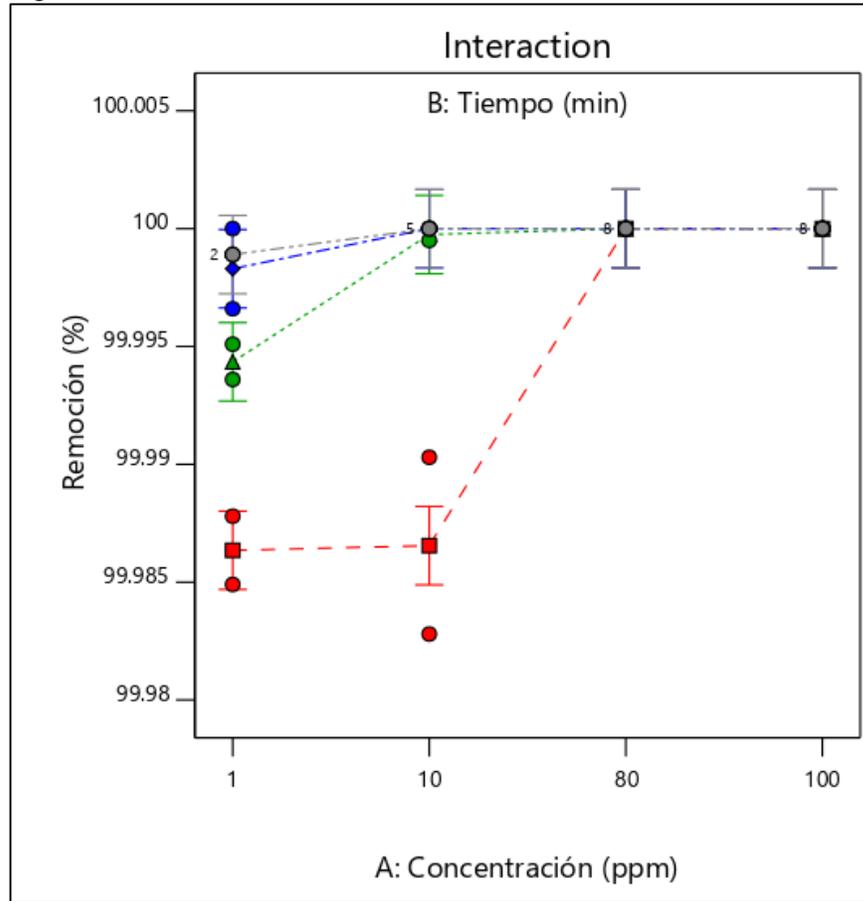
Estadística	Valor
Std. Dev.	0.0016
Mean	100.00
C.V. %	0.0016
$R^2$	0.9426
Adjusted $R^2$	0.8888
Predicted $R^2$	0.7704
Adeq Precision	12.3078

Fuente: Fuente: elaboración propia.  
Programa: Design Expert

De igual forma, es posible obtener la gráfica de interacción que correlaciona las dos variables independientes, la concentración de la solución de hipoclorito y el tiempo de contacto, la cual se puede observar en la figura 10, en donde se puede determinar que el porcentaje de inhibición es de 100% en los máximos valores de concentración y de tiempo y que la variabilidad en la variable respuesta no es significativa cuando se encuentra a altas concentraciones y tiempos pequeños.

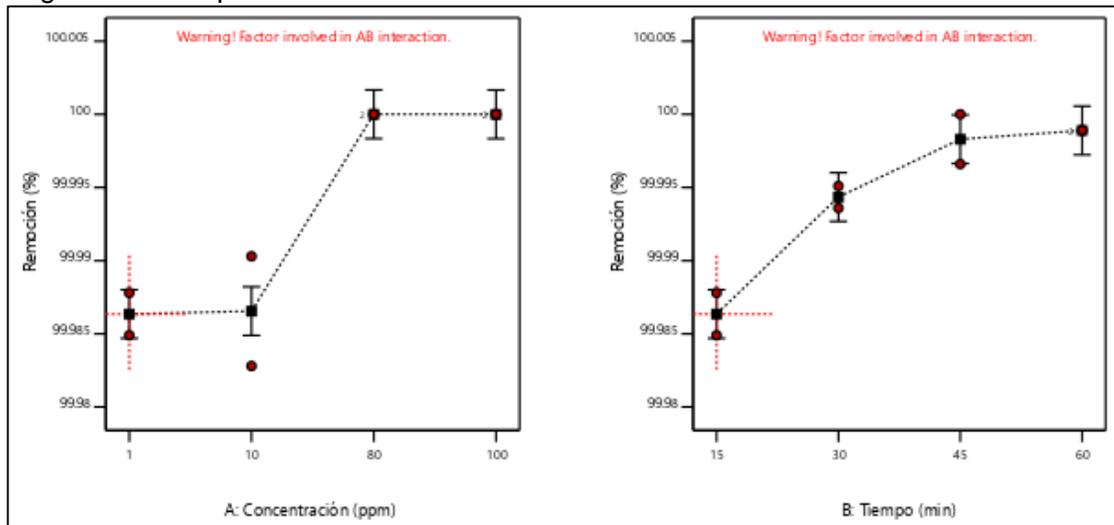
Si se analizan las variables independientes en gráficos por separado, tal como se ilustra en la figura 11, se puede evidenciar que la variable tiempo es co-dependiente de la concentración, ya que la inhibición fue completa a las máximas concentraciones estipuladas en este diseño de experimentos para todos los tiempos de contacto, sin embargo no se presentaron inhibiciones completas a altos tiempos de contacto cuando la concentración fue la menor, es decir, 1 ppm.

Figura 10. Interacción de las variables.



Fuente: Design Expert

Figura 11. Comportamiento de las variables.



Fuente: Design Expert

#### 4. CONCLUSIONES

- Se definieron que los factores que determinan la acción antimicrobiana dentro el proceso de desinfección son la concentración del agente oxidante y el tiempo de contacto entre este y la muestra a desinfectar, por lo cual se decidió evaluar las concentraciones a 1, 10, 80 y 100 ppm y el tiempo de contacto a 15, 30, 45 y 60 minutos, de acuerdo con la revisión de experimentaciones realizadas por otros autores.
- Se obtuvo el agente desinfectante con una concentración promedio de cloro residual libre de 0.396 g/L a partir de una solución de 27 g/L de cloruro de sodio por el método de electrólisis, empleando electrodos de grafito y acero inoxidable como ánodo y cátodo respectivamente, bajo las siguientes condiciones, 4.84 A, 300 RPM, durante 20 minutos.
- Se evaluó la capacidad de inhibición de la bacteria *Escherichia coli sp* que posee el desinfectante obtenido mediante la técnica de filtración por membrana empleando filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m y soluciones de 100 mL inoculadas hasta el patrón N° 2 de McFarland, donde se obtuvo como resultado que a concentraciones de 1 ppm y 10 ppm del agente clorado se inhibió el 99.9865% del bio-indicador, mientras para las concentraciones de 80 ppm y 100 ppm el porcentaje de inhibición es del 100% para cualquier tiempo.
- Mediante el análisis estadístico de varianza de dos vías se determinó que las variables de operación estipuladas para este proceso, la concentración del agente oxidante y el tiempo de contacto, así como su interacción, presentan una relación directa con la efectividad del hipoclorito de sodio para remover la bacteria *Escherichia coli* de una muestra de agua.

## 5. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración de cloro residual libre presente en la muestra de agua a tratar después de realizada la desinfección con el fin de evaluar una concentración adecuada en la cual se cumpla la normatividad vigente.
- Probar el desinfectante en aguas naturales para evaluar su capacidad de inhibición de otro tipo de microorganismos así como su efectividad en la inhibición y remoción de otros contaminantes.
- Determinar las condiciones de concentración de la solución de hipoclorito de sodio y el tiempo de contacto mínimas en los cuales se realice una desinfección efectiva.
- Evaluar la producción de hipoclorito de sodio por electrólisis de cloruro de sodio en lugares donde la temperatura ambiental sea mayor para determinar la estabilidad de la solución a estas condiciones.
- Evaluar el agua de mar como electrolito para realizar el proceso de electrólisis, teniendo en cuenta el rendimiento del proceso, la capacidad desinfectante y la posible formación de sub-productos como los trihalometanos y los ácidos haloacéticos.

## BIBLIOGRAFÍA

AIETA, Marco, *et al.* Comparison of Chlorine Dioxide and Chlorine in Wastewater Disinfection. En: JOURNAL (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). Abril, 1980. vol. 52, no. 4, p. 810-822.

ALBA TORRES, Nathalia Elvira y ARAUJO ESTRADA, Fanny Lucia. Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios PRONABELL LTDA. Tesis de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2008. 99 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. American Water Works Association. 1999. 1220 p.

ANDÍA CÁRDENAS, Yolanda. Tratamiento de agua: coagulación y floculación. Lima: SEDAPAL, 2000. 44 p.

APELLA, María C. y ARAUJO, Paula Z. Capítulo 2: Microbiología de agua. Conceptos básicos. En: Microbiología. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2004. p. 33-50.

ARCOS PULIDO, Mireya del Pilar, *et al.* Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. En: NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. Diciembre, 2005. vol. 3, no. 4, p. 69-79.

ATKINS, Peter y JONES, Loretta. Chemical Principles. The quest for insight. 5 ed. New York: W. H. FREEMAN AND COMPANY. 2009. 1024 p.

AVERILL, Bruce y ELDREDGE, Patricia. General chemistry – principles, patterns, and applications [en línea]. 2365 p [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<https://www.saylor.org/site/textbooks/General%20Chemistry%20Principles,%20Patterns,%20and%20Applications.pdf>>.

AVILA JIMÉNEZ, Cristian. ¿Cómo es el avance en la cobertura de acueducto en Colombia? [en línea]. EL TIEMPO. Bogotá D.C., 23 de marzo de 2015 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-15445939>>.

BARRENECHEA MARTEL, Ada y de VARGAS, Lidia. Capítulo 10. Desinfección [en línea] [citado en 9 mayo de 2018]. Disponible: <<http://www.ingenieroambiental.com/4014/diez.pdf>>.

BOLIVAR, Gabriel. Hipoclorito de sodio (NaOCl): fórmula, usos y propiedades [en línea]. Liferder [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<https://www.liferder.com/hipoclorito-sodio/>>.

BROOKS, Geo. F., *et al.* Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25 ed. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2011. 819 p. ISBN 978-607-15-0503-3.

BROWN, Theodore, *et al.* Química. La ciencia central.11 ed. México: PEARSON EDUCATION, 2009. 1240 p. ISBN 978-607-442-021-0.

CAMACHO, A., *et al.* Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP) [en línea]. Facultad de Química. UNAM. 2009 [citado 09 may., 2018]. Disponible en: <[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP\\_6529.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf)>.

CARRILLO ZAPATA, Eliza Marcela y LOZANO CAICEDO, Aura María. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Tesis de Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. 82 p.

CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad. En: Medicina & laboratorio. 2009. vol. 15. no. 11-12. 587 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. RAS 2000. Título A. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. 103 p.

\_\_\_\_\_. RAS 2000. Título C. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. 182 p.

\_\_\_\_\_. RAS 2000. Título E. (17, noviembre, 2000). Por la cual se adopta el Reglamento técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. Bogotá D.C., 2000. no. 1096. 144 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Decreto No. 1575 de 2007. (9, mayo, 2007). Por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano. Bogotá D.C., 2007. 14 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Resolución 2115. (22, junio, 2007). Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del

sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Bogotá D.C., 2007. 23 p.

CORONEL OLIVARES, Claudia, *et al.* Chlorine disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*, total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*: revisiting reclaimed water regulations. En: WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY: A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH. 2011. vol. 64, no. 11, p. 2151-2157.

COSTA MIRANDA, Andreza, *et al.* Surface water disinfection by chlorination and advanced oxidation processes: Inactivación of an antibiotic resistant *E. coli* strain and cytotoxicity evaluation. En: Science of the Total Environment. Febrero, 2016. p. 1-6.

CRUMP, J. A., *et al.* Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation–disinfection on drinking water quality in western Kenya. En: JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY. Julio, 2004. vol. 97, no. 1, p. 225-231.

DIAO, H. F., *et al.* Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. En: PROCESS BIOCHEMISTRY. Junio, 2003. vol. 39, p. 1421-1426.

ESPIGARES GARCÍA, M. y PÉREZ LÓPEZ, J. A. Aguas residuales. Composición [en línea]. [Consultado en 15 de abril de 2018]. Disponible en internet: <[http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas\\_Residuales\\_composicion.pdf](http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf)>.

GARZÓN RUIZ, Astrid Xiomara y GÓMEZ GUERRERO, Julieth Andrea. Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleado buffer fosfatos. Tesis de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2007. 95 p.

GRATACÓS, Jorge Marcó. Generadores de cloro por electrólisis de salmuera con tecnología de célula con membrana [en línea]. Hispagua. Barcelona, España. 2014. p. 108 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua\\_documento/procesos-y-sistemas-generadores-cloro-electrolisis-salmuera-tecnoaqua-es.pdf](http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua_documento/procesos-y-sistemas-generadores-cloro-electrolisis-salmuera-tecnoaqua-es.pdf)>.

HERNÁNDEZ SALAMANCA, Andrés Camilo; TAFUR LOGREIRA, Javier Santiago. Obtención de un agente desinfectante a partir de la electrólisis de cloruro de sodio para el tratamiento de agua potable. Tesis de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017. 175 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización, 1 ed. Bogotá: ICONTEC, 2008. 33 p.

\_\_\_\_\_. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. 1 ed. Bogotá: El instituto, 2008. 38 p.

\_\_\_\_\_. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. 1 ed. Bogotá: El instituto, 1998. 23 p.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Determinación de coliformes totales y *E. coli* de aguas mediante la técnica de sustrato definido, colilert por el método del Número más Probable [en línea]. TP0423. 2 ed. 2007. 13 p. Disponible en: <<http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+agua+NMP+M%C3%A9todo+Colilert.pdf/463a6c8d-122c-4f75-8572-81bd64baa2d2>>.

\_\_\_\_\_. Hipoclorito de sodio [en línea]. p. 279 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia18.pdf>>. KANE, Joseph y STERNHEIM, Morton. Física. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2007. 795 p.

LARREA MURRELL, Jeny Adina, *et al.* Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. En: REVISTA CENIC: CIENCIAS BIOLÓGICAS. Enero, 2013. vol. 44, no. 3, p. 24-34.

LECHEVALLIER, M.; EVANS, T. y SEIDLER, R. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Julio, 1981. vol. 42, no. 1, p. 159-167.

LEWIS, Kenneth. Chapter 9. Hypochlorination - Sodium Hypochlorite. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 452-527.

LIN, Huirong, *et al.* Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. En: ECOLOGY, ENVIRONMENT & CONSERVATION. Noviembre, 2017. p. 242-249.

MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México: Limusa Wiley, 2004. 687 p.

MUNAKATA, Naoko y KUO, Jeff. Disinfection Processes. En: WATER ENVIRONMENT RESEARCH: A RESEARCH PUBLICATION OF THE WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Octubre, 2015. vol. 87, no. 10, p. 1127-1146.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Drinking-water [en línea]. 07 de febrero de 2018 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>>.

\_\_\_\_\_. Relación del agua, el saneamiento y la higiene con la salud [en línea]. Noviembre de 2004 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/facts2004/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/facts2004/es/)>.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía para la selección de sistema de desinfección. Lima. 2007. 33 p.

\_\_\_\_\_. Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría. Coordinado por Lidia de Vargas. Lima. 2004. Tomo I. 313 p.

PACHÓN D. A.; PULIDO A. P. y MORENO C. A. Aislamiento e identificación de microorganismos entéricos en muestras ambientales y cloacales en *Crocodylus intermedius* y Testudines de la estación de biología tropical Roberto Franco en Villavicencio, Colombia. En: Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Febrero, 2010. vol. 57, p. 23-34.

PONZANO, Gian Piero. Sodium hypochlorite: history, properties, electrochemical production. En: CONTRIBUTIONS TO NEPHROLOGY. 2007. vol. 154. p. 7-23.

RANDTKE, Stephen. Chapter 2. Chemistry of Aqueous Chlorine. En: BLACK & VEATCH CORPORATION. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 68-173.

RASHEED, Sajida; HASHMI, Imran y CAMPOS, Luiza. Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* with Chlorine in Drinking Waters at Various pH and Temperature Levels. En: LIFE AND ENVIRONMENTAL SCIENCES. Junio, 2016. vol. 53, no. 2, p. 83-92.

ROBLES GARCÍA, Marina. Reutilización de aguas residuales. Aplicación al riego de campos de golf. Tesis de Maestría en Tecnología y Química Ambiental. Madrid: Escuela Técnica Superior de Ingenieros, 2013. 65 p.

ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Calidad del agua. 3 ed. Bogotá D.C.: Escuela Colombiana de Ingeniería, 2009. 485 p. ISBN 978-958-8060-83-5.

RUBIANO, María Paula. Colombia hace parte de la mitad del mundo amenazada por la escasez de agua [en línea]. BLOGS EL ESPECTADOR: El río. Bogotá D.C., 26 de abril de 2017 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <<http://blogs.elespectador.com/actualidad/el-rio/colombia-parte-la-mitad-del-mundo-amenazada-la-escasez-agua>>.

SANTAMBROSIO, Eduardo. Cátedra de biotecnología. Siembra y recuento de microorganismos [en línea]. Facultad Regional Rosario. 2009 [citado 09 may., 2018]. Disponible: <[https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicoll.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoll.pdf)>.

SCHLEGEL, Hans G. y ZABOROSCH, Christiane. Microbiología general. 2 ed. Barcelona, España: Ediciones Omega, 1997. 654 p. ISBN 84-282-1030-6.

VÁZQUEZ SILVA, Gabriela, *et al.* Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. En: UAM-X. Mayo, 2006. p. 41-48.

WANG, Yingying, *et al.* Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on *Escherichia coli* and *Legionella beliardensis* assessed by flow cytometry. En: APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Junio, 2010. vol. 87, no. 1, p. 331-341.

WILHELM, Natalie, *et al.* Sodium hypochlorite dosage for household and emergency water treatment: updated recommendations. En: JOURNAL OF WATER AND HEALTH. Febrero, 2017. vol. 16, no. 1, p. 1-14.

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo 2016: Agua y empleo. Paris: UNESCO; 2016. 151 p. ISBN 978-92-3-300035-3.

# ANEXOS

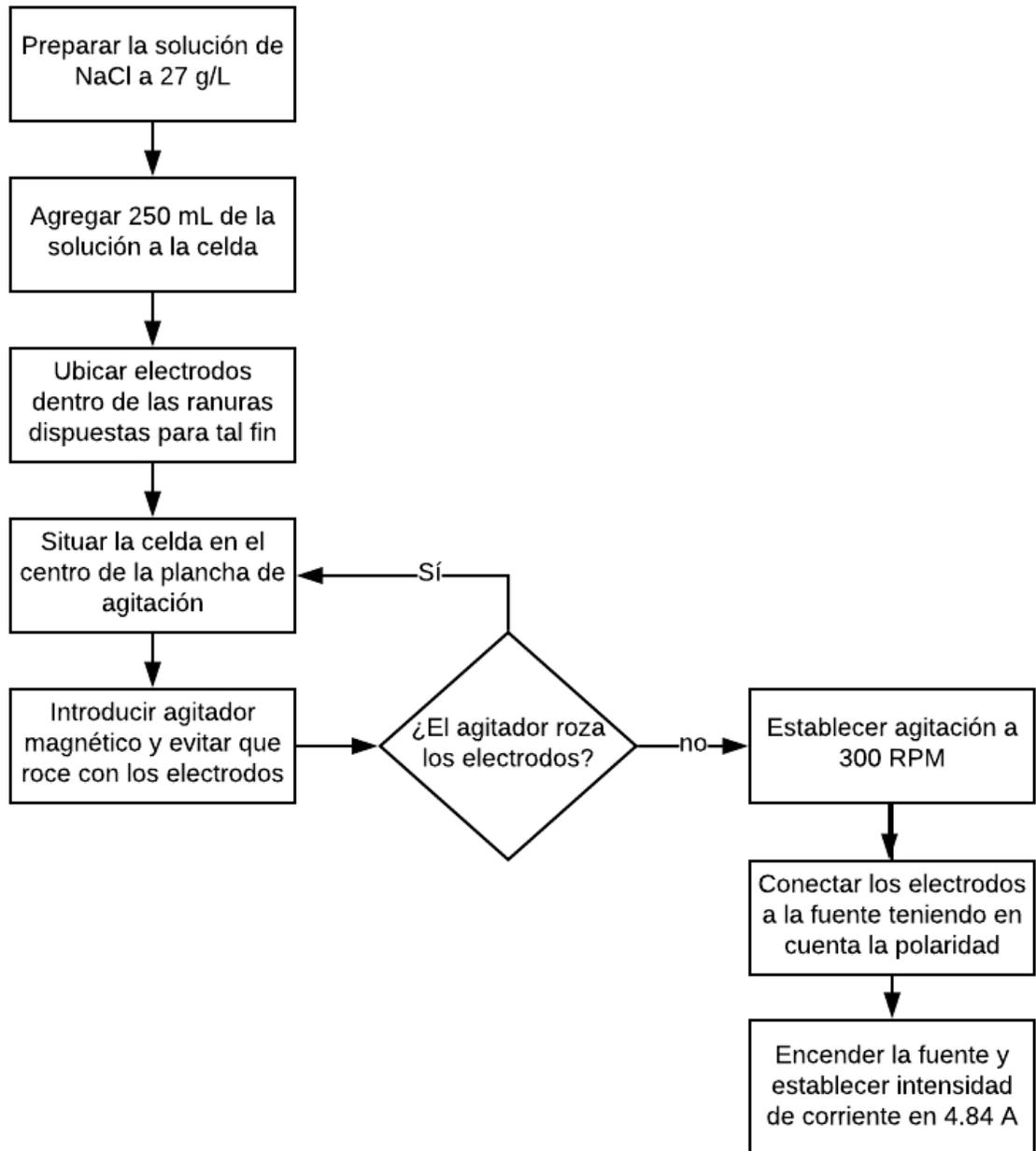
## **Anexo A.**

Matriz de revisión bibliográfica.

(Ver documento en el CD)

## Anexo B.

### Protocolo electrólisis.



## Anexo C.

### Construcción curva de calibración.

Para la determinación del cloro residual libre presente al finalizar el proceso de electrólisis de cloruro de sodio se requiere de la elaboración de una curva de calibración que permita relacionar la absorbancia de una muestra del desinfectante producido, a una longitud de onda de 510 nm, con la cantidad de cloro residual libre en mg/L presente en la misma.

- Elaboración de la curva de calibración
  1. Solución tampón de fosfato: Pesar 12 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhídrido y 23 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro y disolver en agua destilada. Aparte pesar 400 mg de EDTA y diluir en 100 mL de agua destilada, combinar con la preparación inicial. Añadir 10 mg de  $\text{HgCl}_2$  para impedir el crecimiento bacteriano y aforar hasta 500 mL.
  2. Solución indicadora de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD): Disolver 200 mg de sal disódica de EDTA dihidrato en 250 mL de agua desionizada. Añadir 8mL de ácido sulfúrico 2N y disolver 1,1 g de sulfato de DPD anhidro. Completar a 1 L. Esta solución debe conservarse en un frasco ámbar con un tapón de vidrio y a la oscuridad para maximizar su preservación.
  3. Solución madre de yodato potásico (1,006 g/L): Disolver 1,006 g de yodato potásico ( $\text{KIO}_3$ ) en agua desionizada hasta completar 1 litro.
  4. Solución patrón de yodato potásico yodurado (10,06 mg/L): Tomar 10 mL de la solución madre de yodato potásico anteriormente preparada, añadir 1 g de yoduro de potasio KI y disolver en agua desinizada hasta completar 1 litro de solución.
  5. Realización de la curva de calibración: En diferentes matraces aforados de 100 mL añadir las cantidades indicadas de la solución patrón de yodato potásico yodurada, la cual brindará la concentración de cloro residual equivalente en mg/L. Estas cantidades se especifican en el cuadro 5 del presente documento.

Una vez se tengan las soluciones de 100 mL se debe transvasar a un Erlenmeyer de 100 mL que contenga con anterioridad y por menos de un minuto, 5 mL de la solución tampón fosfato y 5 mL de la solución indicadora de DPD. La medida se realiza en un espectrofotómetro a 510 nm en celdas de 1 cm.

## Anexo D.

### Medio de cultivo - Agar nutritivo.

**Britania**

REF B0212205 REF B0212206

## Nutritivo Agar

IVD

### USO

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

Su uso está descrito en procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

### FUNDAMENTO

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y permite una clara visualización de las reacciones de hemólisis.

### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0212205: envase x 100 g.

Código B0212206: envase x 500 g.

### FÓRMULA (en gramos por litro)

PLURIPEPTONA.....	5.0
EXTRACTO DE CARNE.....	3.0
CLORURO DE SODIO.....	8.0
AGAR.....	15.0

pH FINAL: 7.3 ± 0.2

### INSTRUCCIONES

Suspender 31 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Preparación de Agar Sangre: agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro ligeramente opalescente.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

### ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

### PROCEDIMIENTO

#### Siembra

En superficie: inocular directamente la muestra por estría.

En profundidad: inocular una alcuota de la muestra directa o de su dilución. Verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40 - 45°C. Homogeneizar mediante movimientos de vaivén y rotación. Dejar solidificar.

#### Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

#### En general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 35-37° C durante 18 a 24 horas.

Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5-10 % de CO<sub>2</sub>, a 35-37 °C durante 24-48 horas.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características de las colonias.

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

**Hemólisis alfa:** lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

**Hemólisis beta:** lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo

## Nutritivo Agar

claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.

**Hemólisis gamma:** ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

### CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Satisfactorio
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Satisfactorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Satisfactorio

### Nutritivo Agar suplementado con 5% de sangre ovina:

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	HEMÓLISIS
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Satisfactorio	Beta
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Satisfactorio	Alfa
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Satisfactorio	Alfa

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

### MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de

calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

### PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

### REFERENCIAS

- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Downes and Ito (ed). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

### INDICACIONES AL CONSUMIDOR

- Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.
- Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.