

Anexo I

Metodología analítica

Producción de medios

Los medios sólidos empleados se encuentran en forma granular o de polvo fino. Para la constitución de las placas Petri sobre las que se trabaja se suspende la cantidad necesaria de medio en agua destilada y se lleva a ebullición. Tras esto, la mezcla se esteriliza en un autoclave durante 15 minutos a 121°C y 1 bar. Una vez esterilizado, se deja enfriar aproximadamente hasta los 50°C y se vierte sobre placas Petri donde solidifica cuando se enfría a temperatura ambiente.

Algunos medios, como es el caso de agar selectivo Slanetz & Bartley, requieren de la adición de suplementos que actuarán como indicadores de color, en este caso en concreto se adiciona 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para la identificación de *Enterococcus sp.*

Método de siembra

El desarrollo del método de siembra es el siguiente. Por medio de una micropipeta automática se coloca un pequeño volumen conocido sobre una placa de Petri con el medio adecuado. El volumen empleado de muestra puede ir desde los 100 µL a los 1000 µL, aunque en nuestro caso siempre empleamos 100 µL. Con ayuda de una pipeta Pasteur a la cual se le ha dado forma de asa se extiende la muestra por toda la placa de manera homogénea, todo este proceso se lleva a cabo en una atmósfera estéril gracias al uso de un mechero Bunsen. A modo representativo, la figura 8 muestra cómo se debe de repartir la muestra en la placa.

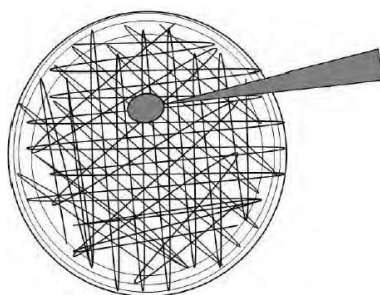


Figura 8. Proceso de extensión de las bacterias en el método de siembra.

Método de filtración

Este método lo vamos a emplear cuando la concentración de bacterias esperada en la muestra no es muy elevada. Al igual que en el método de siembra, se trabaja en una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, con un filtro de membrana estéril (Millipore) y gracias a una bomba de vacío, se filtran las muestras de manera que las bacterias se queden retenidas en el filtro. Con ayuda de unas pinzas colocaremos el filtro en una placa de Petri con el medio adecuado. Posteriormente se incuba para que las colonias bacterianas se desarrollen.

El procedimiento de actuación queda reflejado en la figura 9. En primer lugar, se coloca el filtro en el soporte de filtración con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas, seguido se adapta el embudo en el soporte y con la bomba de vacío encendida se añade solución salina estéril para humedecer el filtro. Las muestras que se analizaron rondaron entre 0,1 mL y 1 mL. Por ello se añadió algo de disolución salina estéril al embudo y seguido la muestra. Una vez se haya filtrado, se retira el filtro y se coloca en una placa de Petri.



Figura 9. Procedimiento de actuación en el método de filtración.

Disoluciones seriadas

La figura 10 es un esquema representativo del proceso. Para llevar a cabo estas disoluciones seriadas, se toma 1 mL de la disolución inicial y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0.9% NaCl (solución salina estéril). Posteriormente, se homogeneiza en un agitador vortex, obteniéndose así una dilución 1:10. Para hacer las sucesivas diluciones, se procede de la misma manera, tomando 1 mL del tubo homogeneizado previamente y llevándolo a otro tubo con 9 mL de disolución salina estéril.

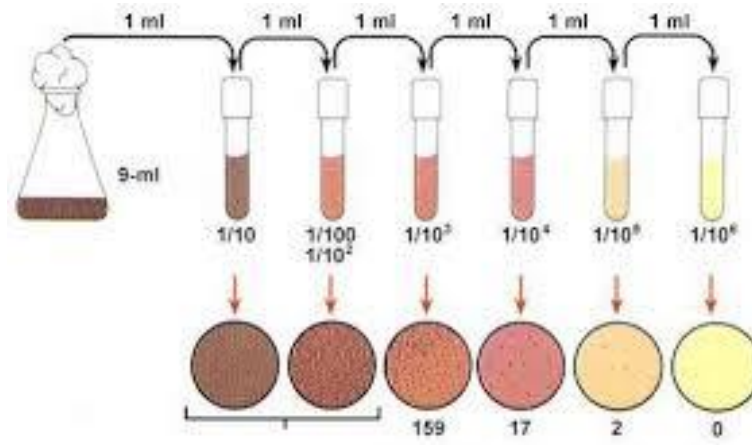


Figura 10. Esquema de disoluciones seriadas

Fortificación de muestras

A partir, de las cepas de estas bacterias están disponibles en el laboratorio del grupo de referencia del Gobierno de Aragón “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza, con ayuda de una pequeña asa de metal se extiende un pequeño inóculo de la bacteria sobre la superficie de una placa de Petri con agar nutritivo como se indica en la figura 11, de forma que al final de dicha siembra “por agotamiento”, la cantidad de inóculo se espera sea lo suficientemente baja como para que se depositen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar a partir de las cuales surjan, tras incubación, colonias aisladas.

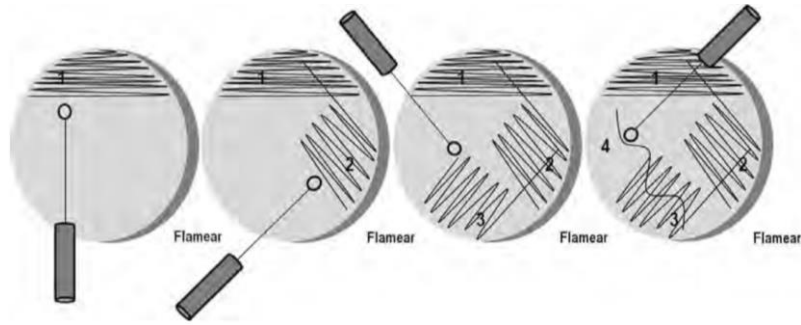


Figura 11. Proceso de extensión por “agotamiento”.

Tras la incubación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada añadiendo las colonias formadas a un tubo con disolución salina estéril (NaCl 0.9%). Conforme se van añadiendo las colonias, la turbidez de la disolución aumenta hasta obtener el nivel deseado. La turbidez se controla gracias a un espectrofotómetro y unas rectas de calibrado que relacionan la turbidez con la concentración bacteriana. Dichas rectas de calibrado han sido realizadas por los miembros del laboratorio del laboratorio de Calidad y Tratamiento de aguas de la universidad de Zaragoza en investigaciones previas.

Cálculo del coeficiente de variación

El coeficiente de variación se va a expresar en forma de porcentaje y representa la repetibilidad del método empleado, es decir, la posibilidad de obtener resultados consistentes al aplicar el mismo método a muestras diferentes.

Para su cálculo se emplea la ecuación [18] en la que \bar{X} es el recuento medio de las unidades formadoras de colonias y la S es la desviación estándar de las muestras.

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad [18]$$

Anexo II

Ozonizador

El ozono necesario para la realización de los experimentos de inactivación de las bacterias *Enterococcus sp.* Y *E. coli.* se genera a escala de laboratorio mediante un ozonizador FISHER modelo 500, situado en el laboratorio del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de aguas de la universidad de Zaragoza.

La figura 12 muestra un esquema representativo de la instalación empleada.

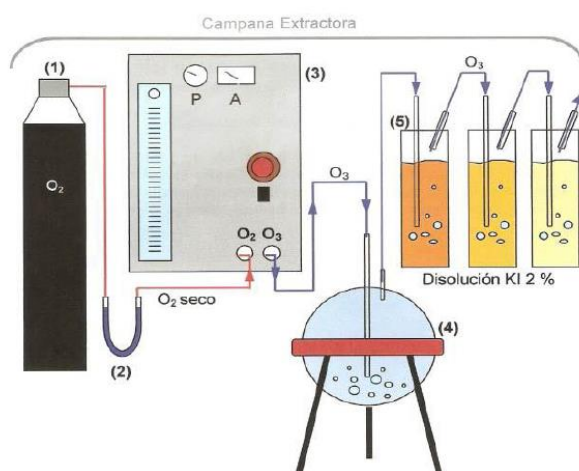


Figura 12. Esquema general de la planta ozonización a escala de laboratorio.

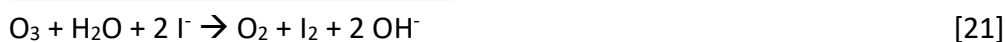
Al ozonizador se le administra oxígeno desde una botella de gas comprimido directamente al equipo. Entre la salida de la botella y la entrada al ozonizador se coloca un tubo en U con sílica gel, para que cualquier humedad de la corriente de O₂ sea eliminada antes de que la corriente entre en la instalación. Mediante una válvula situada en la parte frontal del ozonizador se regula el flujo de oxígeno introducido.

El equipo contiene dos electrodos concéntricos entre los que se establece un alto voltaje mientras fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga que se produce, se genera oxígeno atómico que se combina con el oxígeno molecular que circula entre los electrodos, formándose así la molécula de ozono.

Al ozonizador se conecta un reactor cerrado de vidrio que va a funcionar en régimen semicontinuo, por un lado, será continuo respecto al gas, el cual se introduce mediante un difusor poroso (O₃ introducido) que produce un burbujeo proporcionando una agitación

a la muestra favoreciendo el contacto ozono-agua, y por otro lado discontinuo respecto del líquido.

El flujo de ozono se mantiene constante a lo largo de cada experimento y se calcula mediante una calibración previa del equipo, tal y como se describirá más adelante. Todo el ozono que se produce y llega al agua no se consume, es por ello, que este exceso se ha de destruir. Al reactor, se conectan en serie dos o tres borboteadores que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono va a reaccionar con el yoduro reduciéndose a oxígeno, y el yoduro por su parte se oxidará a yodo (I₂). Este proceso se da por las siguientes reacciones [19 – 20]. Tanto la calibración como los experimentos se han de realizar en una campana de extracción ya que el ozono es tóxico.



El O₃ consumido por nuestra muestra se calcula mediante la ecuación [22] Puede quedar ozono residual disuelto en la muestra, pero la cantidad de este es muy pequeña por lo que se puede considerar despreciable.

$$\text{O}_3 \text{ consumido} = \text{O}_3 \text{ producido} - (\text{O}_3 \text{ no consumido} + \text{O}_3 \text{ residual}) \quad [22]$$

Para conocer la cantidad de ozono que se está produciendo y por ello introduciendo a la muestra se ha de llevar a cabo una calibración previa del equipo. Para la calibración se conectan directamente tres borboteadores a la salida del generador, cada uno de ellos con 250ml de disolución de yoduro potásico al 2% en peso y se determina a diferentes tiempos la cantidad de ozono generado.

Durante los tiempos fijados, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50L/h, empleando una potencia de ozonización de 3 W y aplicando una presión de oxígeno de 1 bar. Finalmente, la cantidad de ozono presente en los diferentes borboteadores se calcula por el método yodométrico estandarizado 2350 E (Eaton et al., 2005). Este método se va a emplear tanto en la calibración como en los diferentes experimentos para determinar el ozono no consumido.

En la figura 13 se muestra la recta de calibrado del ozonizador, en la que se representa el ozono generado expresado como mg O₃ en función del tiempo de tratamiento.



Figura 13. Calibración ozonizador

ANEXO III

Parámetros físico-químicos estudiados en la muestra real de aguas de salida de EDAR:

- **Conductividad:** expresa la capacidad que tiene el agua para dejar pasar a través de la misma la corriente eléctrica. La conductividad nos indicará la concentración de iones en el agua. Para determinarla se usa un conductímetro de la marca ThermoScientific modelo ORION que se ha calibrado previamente con una disolución tampón de 1413 μ S/cm. El conductímetro dispone de una célula de dos electrodos y se trabaja de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 27888:1994 (AENOR, 1994). En función del del rango de trabajo en el que nos encontremos el conductímetro expresará los resultados en mS/cm o en μ S/cm.
- **pH:** el pH es una medida de la acidez o alcalinidad de la disolución. Va a indicar la concentración de iones hidrógeno presentes en la disolución. Para su determinación se emplea un pH-metro de la marca Crison modelo GLP 21 que se ha calibrado con dos disoluciones tampón de pH 7 y pH4,1. El método de trabajo empleado es el 4500-HB del Standard Methods (Eaton A. D., Clesceri L. S., Rice E. W., 2005).
- **DQO:** determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua, bajo condiciones específicas de agente oxidante, temperatura y tiempo. Para su determinación se emplea un fotómetro multiparamétrico de la marca Hanna modelo HI 83099. La muestra se mezcla con una disolución de dicromato. Los compuestos orgánicos oxidables de la muestra reducen el ión dicromato a ión cromo (III), produciendo un cambio de color de naranja a verde. LA cantidad de ión cromo (III) formado se determina con una lampara de tungsteno con un filtro de interferencia de banda estrecha a 420 nm.
- **COT:** Como describe el DIN EN 1484:1997 (*Water análisis- Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)*) el carbono orgánico total (TOC) es “un método de medida del contenido en carbono de las sustancias orgánicas disueltas y en suspensión del agua”. Para su determinación se emplea el equipo TOC-V_{CSH} de la marca Shimadzu. En las muestras de agua hay dos tipos de carbono, el orgánico (COD) que se corresponde con los compuestos orgánicos y el inorgánico (CI) que se

corresponde con el CO_2 , o por sales inorgánicas como carbonatos y bicarbonatos.

El conjunto de ambos forma el carbono total (CT), cumpliéndose la relación:
 $\text{CT}=\text{COD}+\text{CI}$.

Las muestras a analizar se introducen en viales en el equipo, que se programa con las rectas de calibración que mejor se ajusten a los valores de COD esperados.