

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AGUA TRATADA CON OZONO, PARA SU USO EN LA CRÍA DE ANIMALES LIBRES DE GÉRMESES PATÓGENOS ESPECÍFICOS

María E. Arteaga*, M. Bataller, J. Molerio**, R. Pérez** y L. Riera***

**Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Finca Tirabeque.
Carretera del Cacahual Km 2½, La Habana, Cuba. Telf. 0 683 72 25. E mail: cetex@cenpalab.inf.cu,
Fax (537) 57 90 23; **Centro de Investigaciones de Ozono*

RESUMEN: Las excelentes propiedades germicidas del ozono han quedado evidenciadas en numerosos trabajos. Sin embargo, no existe abundante información referente al empleo del mismo para la esterilización de aguas. El calor es prácticamente el único método de esterilización utilizado, el proceso consume considerablemente gran cantidad de energía. Sobre la base de la experiencia acumulada en Cuba acerca del empleo del ozono en el tratamiento de las aguas, se diseñó, construyó y se puso en funcionamiento el primer sistema de ozonización de agua para abastecer a animales libres de gérmenes patógenos (SPF) en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se evaluó la calidad del agua obtenida por el sistema durante, aproximadamente, un mes de funcionamiento, en el que se tomaron muestras de agua en frascos con tapa, esterilizados en seis puntos seleccionados; tres de ellos fuera de la barrera, y los restantes, dentro de la zona protegida. De un total de 21 muestras analizadas, en puntos posteriores al tratamiento de ozono, 20 resultaron estériles (ausencia de bacterias, hongos filamentosos y levaduras). La calidad del agua suministrada a la zona protegida, se comprobó también con los análisis realizados a los animales, en los que no se detectó la presencia de gérmenes patógenos específicos.

(Palabras clave: agua; ozono; esterilización; animales SPF)

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF WATER TREATED WITH OZONE FOR ITS USE IN THE REARING OF SPECIFIC PATHOGEN FREE ANIMALS

ABSTRACT: The excellent germicide properties of ozone have been evidenced in numerous projects. However, there is not enough information related to its use for water sterilization, or rather for the elimination of microorganisms. Heating is practically the main used sterilization method, and the process considerably consumes great quantity of energy. Based on the accumulated experience in Cuba about the used of ozone treating water, the first system of water ozonization to supply specific pathogen free animals (SPF) was designed, built and put into practice in the National Center for the Production of Laboratory Animals (CENPALAB). The water quality obtained by the system during approximately a month of operation was evaluated. Water samples were taken in sterilized flasks with lid in six selected points, three of them outside the barrier, and the rest within the protected zone. From 21 analyzed samples, in points subsequent to the ozone treatment, 20 resulted sterile (absence of bacteria, filamentous fungi and yeasts). The water quality, supplied to the protected zone, was also proven with the analysis carried out in animals, in which the presence of specific pathogen germs was not detected.

(Key words: water, ozone, sterilization, SPF animals)

INTRODUCCIÓN

El empleo del ozono en el tratamiento del agua se ha extendido considerablemente durante los últimos años. Esto es posible gracias al aumento de eficiencia logrado en los equipos productores de ozono, lo que posibilita que la ozonización de agua se haga competitiva con la cloración.

Las excelentes propiedades germicidas del ozono han quedado evidenciadas en numerosos trabajos (1-7), en ellos se demuestra la capacidad del ozono para inactivar bacterias, virus y quistes de protozoos, aun en los casos de cepas o especies resistentes a otros agentes.

El ozono ejerce su acción desinfectante sin formar, o al menos en menor cuantía compuestos tóxicos, si se compara con el cloro (8-11), este último da lugar por reacción, a compuestos orgánicos clorados, que pueden resultar mucho más tóxicos e incluso, mutagénicos y carcinogénicos (12-13).

Sin embargo, a pesar de todos estos factores, no existe información referente al empleo del ozono para la esterilización de las aguas. El calor se ha mantenido durante largo tiempo, prácticamente, como el único método de esterilización, y por lo general, se recomiendan condiciones drásticas para estos fines, por ejemplo: 121°C durante 60 minutos, de modo que el proceso consume considerable cantidad de energía y requiere del equipamiento especial de alto costo que permitan trabajar con grandes volúmenes de agua a elevada temperatura y a sobrepresión.

Sobre la base de la experiencia acumulada en Cuba, acerca del empleo del ozono en el tratamiento de aguas (14-15), se diseñó, construyó y se puso en funcionamiento un sistema de ozonización de agua en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con la finalidad de abastecer animales libres de gérmenes patógenos (SPF) que se crían en condiciones de barrera y necesitan del suministro de agua estéril, no solo para su consumo directo, sino también para la limpieza y cualquier otra operación que requiera del empleo de agua.

El trabajo tuvo como objetivo fundamental, valorar la calidad microbiológica del agua tratada con ozono para su uso en la cría de animales Libres de Gérmenes Patógenos Específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El agua destinada a recibir el tratamiento es de procedencia subterránea, presentó una mineralización de baja a media (0.5 a 1 g/L de sólidos totales) y es de elevada dureza (250-300 mg de CaCO₃).

Con el fin de garantizar un funcionamiento eficiente del sistema diseñado, el mismo debe recibir aguas que cumplan con las normas vigentes de calidad para aguas potables (16).

Tratamiento del agua con ozono

El ozono se produce mediante equipos del tipo OZOCENIC, diseñados y construidos en Cuba. El utilizado en este trabajo está compuesto por un transformador capaz de elevar la tensión de línea de 220 a 15 000 volt., un regulador de voltaje que controla la tensión de entrada al transformador, un tubo de descarga donde se produce el ozono a partir de oxígeno de balón por el principio de descarga eléctrica silente, un rotámetro para el control y medición del flujo de oxígeno, así como elementos electrónicos de protección, control y enfriamiento por agua.

La producción de ozono depende del flujo de oxígeno y de la tensión aplicada al tubo de descarga, la que a su vez depende de la tensión de entrada al transformador, que se controla con el regulador de voltaje. De esta manera, en función de los requerimientos del caso, es posible controlar la producción y concentración de ozono con la variación del flujo de oxígeno y voltaje de entrada al transformador.

Las características del sistema fueron: flujo de agua, 700 L/h; flujo de oxígeno, 100 L/h; concentración de ozono, 55 mg/h; dosis ozono, 7.8 mg ozono/L; y tiempo contacto, 8.5 minutos.

Automatización del sistema de ozono

Para garantizar el adecuado funcionamiento del sistema, se acopló a un autómata programable, que tiene capacidad para 24 señales de entrada y salida, además que una vez introducidos los parámetros de trabajo, dirige y controla automáticamente el proceso.

Para la medición de la concentración del ozono, disuelto en el agua a la salida de la columna de contacto, se instaló un equipo Depolox-4, capaz de trabajar en línea con el sistema y enviar la información del autómata. El agua se empleó para la cría de ratones libres de gérmenes patógenos (SPF).

Evaluación microbiológica del agua

Para corroborar la calidad del agua tratada, se realizó un chequeo de la misma durante aproximadamente, un mes de funcionamiento del sistema; se tomaron muestras de agua en frascos con tapa, esterilizados en seis puntos seleccionados, tres de ellos fuera de la barrera y los restantes dentro de la zona protegida (Tabla 1).

TABLA 1. Puntos para la toma de muestras de agua./ *Checkpoints of water samples*

Muestra	Punto de muestreo
M-1	Tanque depósito
M-2	Salida de filtro de carbón
M-3	Salida de la columna
M-4	Válvula de tanque de servicio
M-5	Ducha
M-6	Fregadero

Las muestras fueron sometidas a análisis microbiológicos con siembra, aislamiento e identificación de microorganismos. Todas se inocularon en tubos de cultivo con Caldo Tioglicolato y Caldo Tryptona Soya, para el control de bacterias y hongos.

Los tubos con Caldo Tioglicolato se incubaron a 30-35°C, y los de Caldo Tryptona Soya, a 20-22°C durante 7 días. Se realizó la observación diaria y los tubos que mostraron turbidez se transfirieron a placas con medios agarizados. Los que presentaban Caldo Tioglicolato, se subcultivaron en placas con Agar Sangre y Agar Mac Conkey; de igual forma se realizó con Caldo Tryptona Soya, que tenían sospecha de positividad típica de bacterias (de crecimiento lento). Los tubos con Caldo Tryptona Soya, con sospecha de hongos se reportaron como tal. Todas las placas fueron incubadas a 37°C por 24-48 horas. Posteriormente, los crecimientos positivos se identificaron según los métodos standards bacteriológicos (17-22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para garantizar el funcionamiento continuo del equipo productor de ozono y la columna de contacto, se instalaron por duplicado, como es práctica usual en este tipo de trabajo.

El agua a tratar se recibe en un depósito, del que se bombea, pasa por un filtro de carbón granular activado y llega a una de las columnas, donde recibe el tratamiento con ozono. De aquí, el agua traspasa la barrera y pasa a un tanque de reserva en la sala de cría, en el que se descomponen los restos de ozono residual y, finalmente, llega al tanque de consumo para su distribución en la sala.

Una vez establecido el régimen estacionario en el tratamiento del agua, el sistema funciona dirigido por el autómata programable.

En las muestras de los puntos M-1 al M-3 (fuera de la zona protegida), solo se les realizó el análisis de coliformes totales y fecales (23), resultando el NMP < 2.2. Las muestras después de su salida del filtro de carbón, daban positivas a *Pseudomona aeruginosa* y levadura. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Los resultados fueron satisfactorios, de 21 muestras analizadas en puntos posteriores al tratamiento de ozono, 20 resultaron estériles (ausencia de bacterias, hongos filamentosos y levaduras). En el primer muestreo, el resultado positivo a hongo y *S. aureus* en la ducha se debe, evidentemente, a que el sistema había comenzado a funcionar y estaba en condiciones de arrancada, este microorganismo no tiene importancia sanitaria en el análisis de las aguas.

Después, estos resultados se verificaron en tres muestras de agua al azar dentro de la zona protegida, las mismas resultaron libres de hongos y bacterias.

CONCLUSIONES

Resulta posible obtener, en condiciones reales, agua de elevada calidad microbiológica, mediante el empleo del ozono.

TABLA 2. Resultados de los análisis microbiológicos./ *Results of the microbiological analyses*

Muestreros	1	2	3	4	5	6	7
M4	(-) bact. (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo
M5	(+) <i>S.aureus</i> (+) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo
M6	(-) <i>S. aureus</i> (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo	(-) bact (-) hongo

NMP: número más probable de coliformes totales
(O3) residual en M-3: de 1,7 a 2,4 mg/L

REFERENCIAS

1. Katzenelson, E.; Shuval, H.I. (1975): Studies on the disinfection of waters by ozone and bacteria. Proc. 1st. Inst. Sym. on Ozone for Water and Wastewater Treatment. New York. 296-316.
2. Kaur, K.; Curran, T.; Bott, R. (1991): The effect of ozone on *Pseudomonas fluorescens*. Proc 10 th Ozone World Congress Monaco. 1: 347-356.
3. Labatiuk, C.; Finch, G. (1991): Ozone inactivation of Giardia using quantal response in animals models as a measure of disinfection performance. Proc. 10 th Ozone Worl Congress. Monaco. 2: 49-5.
4. Kutz, S.M. (1989): Impacts of ozone treatment on selected microbiological parameters in Colorado river water. Proc. 9 th Ozone Worl Congress. New York. 1: 45-69.
5. Wikranamayaque, G.B.; Sproul, O.J. (1988): Ozone concentratrion and temperature effect on disinfection kinetics. *Ozone Sci. Eng.* 10: 123-135.
6. Labatiuk, C.W.; Belosevic, M.; Finch, G.R. (1992): Evaluation of high-level ozone inactivation of *Giardia muris* using an animal infective model. *Ozone Sci. Eng.* 14: 1-12.
7. Melia, C.R.O. (1991): Practice, theory and solid-liquid separation. *J. Water Supply Res. Tecchnol.-Aqua.* 40 (6): 371-379.
8. Rook, J.J. (1974): Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Wat. Treat. Examn.* 23: 234-243.
9. Bellar, T.A.; Lichtenberg, J.J.; Kroner, R.C. (1974): The occurrence of organic halides in clorinated drinking water. *J. Am. Water Works Assocn.* 66: 703-706.
10. Fernandez, L.A.; Bataller, M.; Pérez Rey, R. (1989): Humic substance removal through surface water potabilization processes. *Sci. Tot. Env.* 81/82: 271-278.
11. Wardlaw, V.E.; Perrry, R. y Grahm, J.D. (1991): The role of algae as trihalomethane precursors-a review. *J. Water Supply Res. Technol. Aqua.* 40 (6): 335-345.
12. Kool, H.J.; Kreikl, C.F. (1984): Formation and removal of mutagenic activity during drinking water preparation. *Water Res.* 8: 1011-1016.
13. Weisburger, E. (1977): Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Env. Health Persp.* 21: 7-16.
14. Ramos, R.; Pérez Rey, R.; Gómez, M. (1987): Disinfection of mineral waters by ozonation in Cuba. *Proc. 8th Ozone Wold Congress. Zurich.* 2: 622-629.
15. Bataller, M.; Pérez Rey, R.; Molerio, J. (1991): First Cuban experience of full- scale water ozonation. *Proc. 10th Ozone Worl Congress. Monaco.* 2: 395-399.
16. Ministerio de Salud Pública. (1984): Anexo a la Resolución Ministerial 67. Calidad sanitaria del agua potable. *Gaceta Oficial (Cuba)*: 29 de mayo 540-544.
17. Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring (1990): Program PDA Environmental Task Farce. Parenteral Drug Association. *Journal of Parenteral Science & Tecnology.* 44: Supplement: S3-S15.
18. Programa del VRB (1976): Aseguramiento del Monitoreo microbiológico y vigilancia de las enfermedades de los animales pequeños. Abril 2.
19. Validation and Enviromental Monitoring of Aseptic Processing (1990): Committee on Microbiol Purity. *Journal of Parenteral Science & Tecnology.* 44(5): 272-277.
20. Catálogo, E.; Merck, Frankfurter Strasse (1982): Análisis microbiológico del agua. Medios de cultivo MERCK. 250. D-6100 Darmstadt 1. Alemania.
21. APHA (1989): Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th Ed.
22. Standard Methods (1990): The Examination of Water and Wastewater. 14ª edición. Washington. Denominados abreviadamente "Standard Methods". USP XXII, USA.
23. APHA, AWWA; WPCF (1985): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition. Washington.

(Recibido 7-9-2001; Aceptado 5-3-2002)