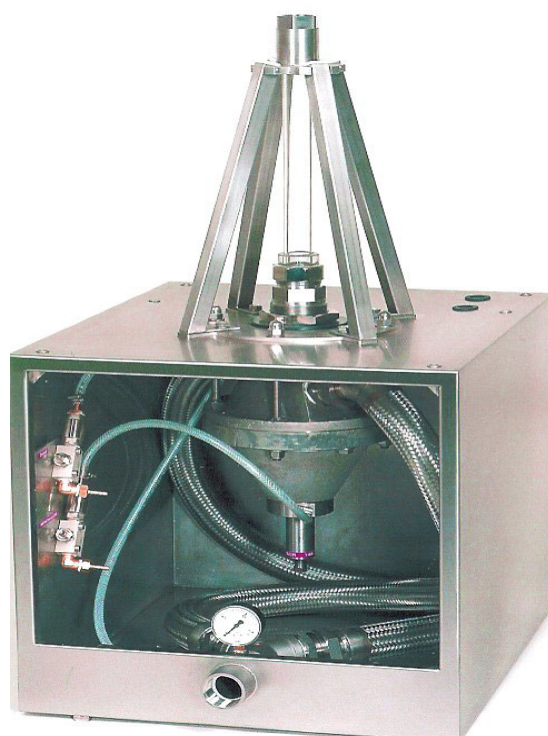


Estudio de la inactivación microbiana por el equipo Aqua Hydro Physical System TM



Barcelona, julio de 2003

Este informe corresponde a la memoria final del trabajo **“Estudio de la inactivación microbiana por el equipo Aqua Hydro Physical System™”**, correspondiente al acuerdo de colaboración establecido entre la empresa Heck Trade, S.L. y los Sres Joan Jofre Torroella y Francisco Lucena Gutiérrez, catedráticos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona.

Además han participado en la realización del presente estudio:

- Dr. Xavi Méndez
- Dra. Maite Muniesa

Ambos adscritos al Dpto. de Microbiología

Barcelona, julio de 2003

INFORME PRELIMINAR DE LOS ENSAYOS CON EL EQUIPO AQUA-HP-SYSTEM EN LABORATORIO

1 INTRODUCCIÓN.

El presente informe pretende definir unas condiciones básicas, para la realización de pruebas y ensayos preliminares con el equipo Aqua Hydro Physical System™ (en adelante Aqua HPS™), con el fin de poder valorar la inactivación microbiana debida a su funcionamiento en un circuito cerrado de agua.

El principio de funcionamiento del equipo, que se describe a continuación es el que se recoge en la web de la empresa que lo fabrica y realiza su distribución:

<http://www.aqua-correct.dk/hps/hps-press-uk.html>

Nielsen Technical Trading

P.O.Box 10, DK-4621 Gadstrup, Denmark

The Technology

The central unit in the hydro physical development is a highly effective water reactor, which as its function principle utilise the forces of water and the oxidation potential of the dissolved oxygen in water.

Supplied with water from a pump with an operation pressure between approx. 5 to 8 bar (72,5 to 116.0 psi) the reactor creates internal extremely high sup- and sub-water pressures as well as powerful centrifugal and centripetal water friction forces. Simultaneously also the dissolved oxygen in the water is set free.

The sup/sub pressure conditions and the created friction forces have a magnitude of some thousands G that totally will kill and destroy all bacteria's, agae and fungus spores, germs and other organic substances in the water.

In a second treatment phase and, due to the sub-pressure conditions, oxygen from the surrounding is sucked into the water reactor and being integrated as part of the conditioning process. The presence of free oxygen from the water and the 21% added surrounding oxygen acts as a natural cold-combustion oxidation process. In this step, the destroyed micro-organism and impurities are finally exterminated by oxidation.

This combination of sup/sub pressure, extreme high friction forces and the natural oxidation process inside the reactor eliminates all micro-organic impurities in the water and exclude effectively any re-activation or breeding possibility.

Improved Water Properties

An additional advantage of the AQUA HP System technology and by influencing the molecular structure, is the change of the water surface tension and viscosity of the water. This improves the water properties, which in industrial applications, like washing and cleaning systems, contributes to optimise the process.

2 OBJETIVO DEL ENSAYO.

El objetivo de las pruebas y ensayos realizados fue comprobar la capacidad de inactivación de microorganismos presentes en un circuito cerrado de agua por el equipo Aqua HPS™. Previamente se determinaron las condiciones de funcionamiento del equipo de desinfección Aqua HPS™ para la realización de las pruebas en cuestión.

De acuerdo a las referencias del fabricante el equipo ha sido instalado en numerosos circuitos de agua caliente sanitaria (ACS), torres de refrigeración, fuentes ornamentales, y demás aplicaciones donde se requiere la eliminación de bacterias, esporas, hongos, etc.

En caso de que esta capacidad de inactivación quede comprobada, y aprovechando la experiencia y los resultados obtenidos, podrán planificarse nuevas pruebas y ensayos, los cuales quedan fuera del alcance de este informe preliminar.

3 EQUIPO DE PRUEBAS.

Las pruebas se han realizado con un equipo Aqua HPS™ modelo K0 Junior, el cual consiste en un equipo compacto compuesto por una bomba centrífuga y el reactor HP, todo ello montado en una estructura soporte, disponiendo de esta forma de un equipo muy compacto, al cual solo hay que conectarle la tubería de entrada y de salida de agua. Las medidas externas del equipo K0-Junior son las siguientes: longitud: 350 mm, anchura: 480 mm, altura: 620 mm, peso: 40 kg.

4 CAUDALES DE ENSAYO.

El equipo permite un caudal de tratamiento de 0,5 a 2,5 m³h⁻¹. Se eligió para las pruebas un caudal de trabajo de 1 m³h⁻¹ con el fin de evitar la acumulación de grandes volúmenes de agua.

5 MUESTRAS PARA EL ENSAYO.

Las muestras para los ensayos han sido de 200 litros de agua de la red de Barcelona, tratadas con tiosulfato con el fin de neutralizar el efecto del cloro.

Las muestras han sido “dopadas” con diferentes tipos de microorganismos (bacterias y bacteriófagos), por separado y uno por ensayo. Así, tras su homogenización se ha separado una fracción de un litro de muestra ya dopada que colocada al lado del circuito ha servido como muestra control del ensayo.

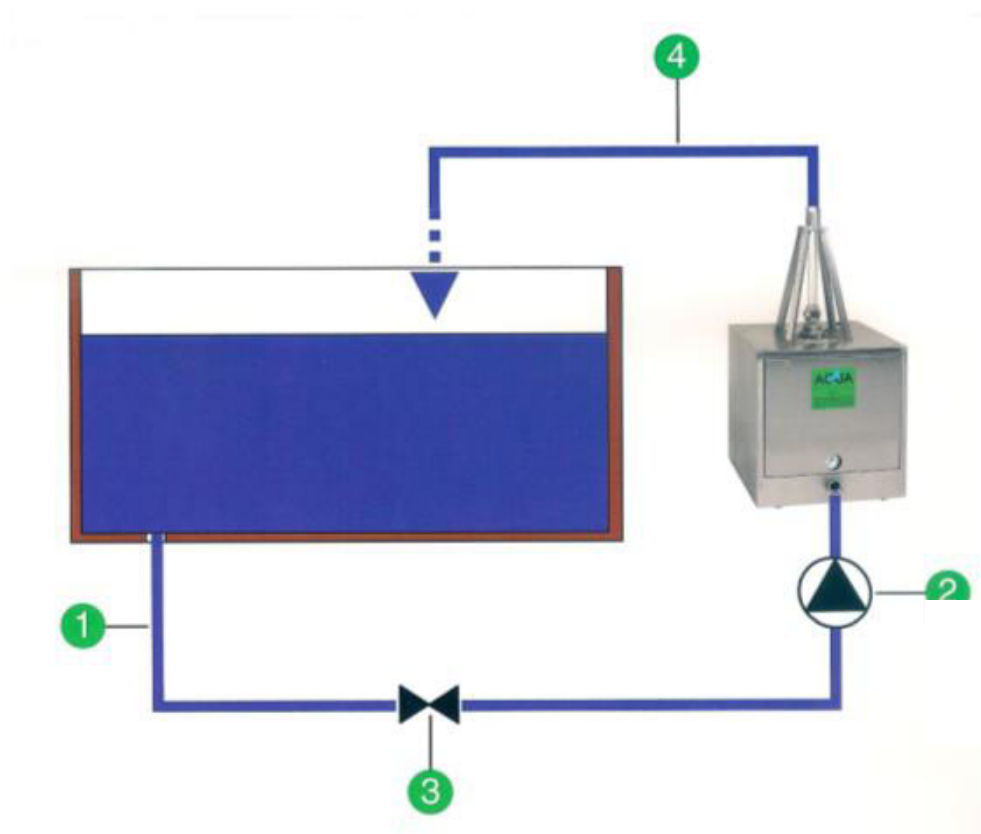
Las muestras de agua, de 200 litros, se han hecho pasar por el equipo Aqua HPS™, con unas secuencias de paso tal como se indica en el “Protocolo de ensayo”.

6 CIRCUITO DE ENSAYO.

El ensayo se realizará con un circuito hidráulico compuesto por los siguientes elementos:

- Depósito de 200 litros.
- Manguera flexible con accesorios para aspiración del agua hasta la entrada del equipo Aqua HPS™.
- Equipo Aqua HPS™ modelo K0 Junio con bomba centrífuga incluida.
- Manguera flexible con accesorios para impulsión a la salida del equipo.
- Medidor de caudal.

En el siguiente esquema se representa la configuración de los equipos para la realización de los ensayos.



7 MICROORGANISMOS ENSAYADOS.

Cepas bacterianas, bacteriófagos y medios utilizados.

7.1.1 Cepas bacterianas. Se han elegido una bacteria gram+ y otra gram- que representan los tipos “estructurales” más frecuentes.

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Escherichia coli* WG5 (ATCC 700078) (Grabow & Cobrough 1986).

7.2 Bacteriófagos. Se han elegido dos virus bacterianos con estructuras muy bien diferenciadas.

- MS2 (ATCC 15597-B1) ISO 10705-1. (Anonymous 1995)
- B56-3 (ATCC700786-B1) ISO 10705-4 (Anonymous 2002)

7.3 Medios de cultivo.

- mFC-agar (Difco, Becton Dickinson,US). Ref: 267720.

- Chromocult coliforme agar (Merck Darmstadt, Germany). Ref:1.10426.
- m Enterococcus agar (Difco, Becton Dickinson,US). Ref: 274620.

8 PROTOCOLO DE ENSAYO.

Los diferentes ensayos se han realizado siguiendo los siguientes pasos:

- a) Preparación del equipo con las mangueras de entrada y salida conectadas convenientemente al depósito.
- b) Preparación de un volumen de 200 litros de agua con adición de tiosulfato.
- c) Puesta en marcha de la bomba y ajuste del caudal ($1 \text{ m}^3/\text{h}$). A este caudal y con un volumen de 200 litros, el tiempo máximo de prueba será de 12 minutos/ciclo.
- d) Contabilizar un tiempo de estabilización de al menos 60 segundos. Comprobar el caudal circulante. Rechazar el agua tratada durante este periodo.
- e) Añadir el microorganismo a ensayar a razón de 1000 ufc/ufp por ml de agua de muestra.
- f) Homogeneizar.
- g) Toma de una muestra de un litro para utilizarla como control.
- h) En paralelo al inicio de los ensayos se ha dispuesto un depósito de 200 litros, similar al empleado con el reactor el cuál es inoculado con el mismo nº de microorganismos, con el fin de realizar unos ensayos control con el fin de comprobar la no adsorción de los microorganismos al circuito. El volumen de agua que puede haber en los tubos y el reactor

no supera los 4 L, lo que representa como máximo un 2% del volumen total de la muestra.

- i) Realizar la toma de muestras, a tiempo cero o inicio del ensayo y a diferentes tiempos, tanto del agua del circuito como del agua control.
- j) Realizar las titulaciones de los diferentes microorganismos según protocolos estandarizados.
- k) Se realizan en todo momento controles de temperatura del agua. Esta se mantuvo durante los ensayos por debajo de los 27 °C.
- l) Durante la realización de los ensayos la secuencia de tratamiento ha sido la siguiente: 8 horas de funcionamiento a partir del tiempo cero, seguido de 16 horas de reposo. Esta secuencia se ha repetido cada 24 horas.

9 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Con el fin de facilitar la comprensión de los resultados de cada uno de los ensayos realizados, estos se han representado mediante el empleo de gráficas. En estas gráficas se representa los resultados de las concentraciones de microorganismos a lo largo del tiempo tanto del agua control como del agua del circuito que ha pasado a través del reactor.

Las “cinéticas de inactivación”, obtenidas se aproximan a rectas, con R^2 mayores a 0,70; en la mayor parte de las ocasiones.

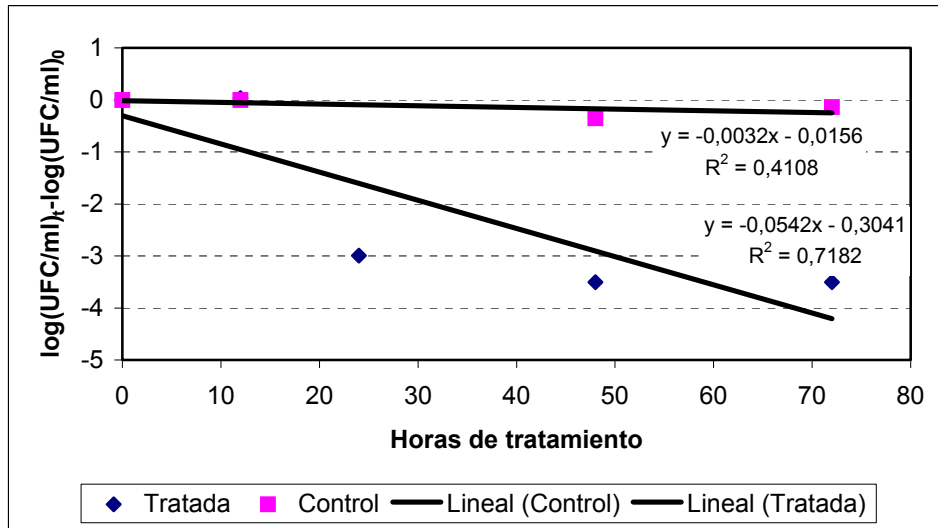
Este modelo sencillo, nos permite calcular las T90, el tiempo para eliminar el 90 de los microorganismos presentes en la muestra. Este valor nos sirve para valorar las inactivaciones de los distintos microorganismos, en nuestro caso todas inferiores a 100 horas.

En los distintos ensayos en el agua control también se ha producido un decaimiento o inactivación de los microorganismos, las T90 obtenidas han sido superiores a 100 horas, es decir, se ha dado un decaimiento debido a la inactivación natural, pero que esta ha sido mucho menor que la producida por el efecto del reactor.

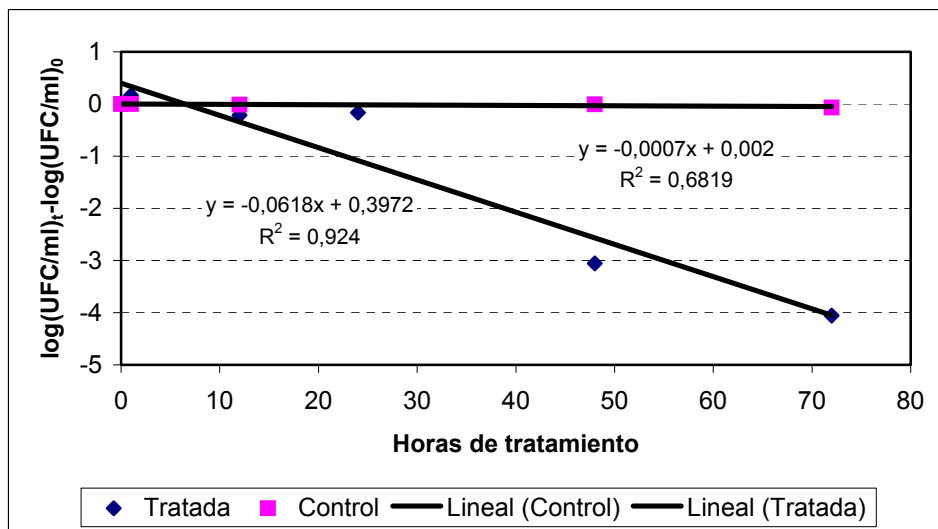
10 RESULTADOS.

10.1.- Inactivación de enterococos.

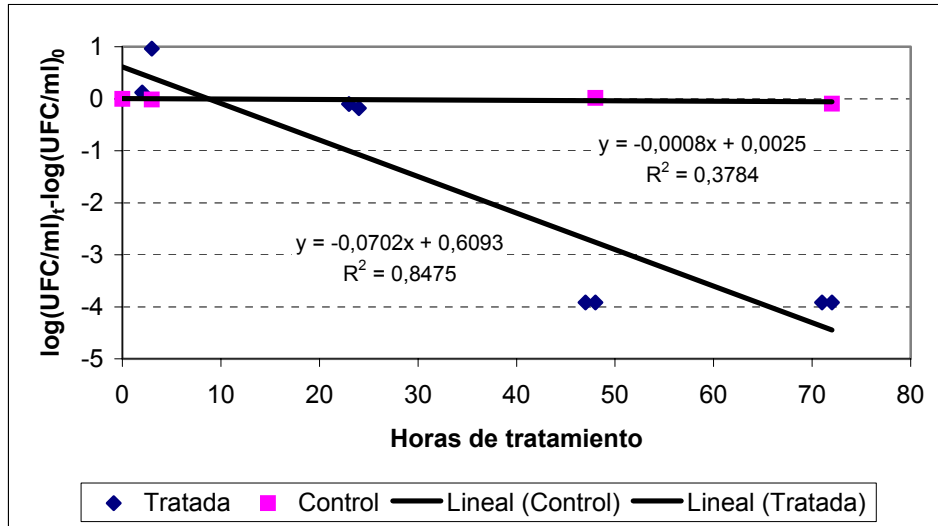
Experiencia 1



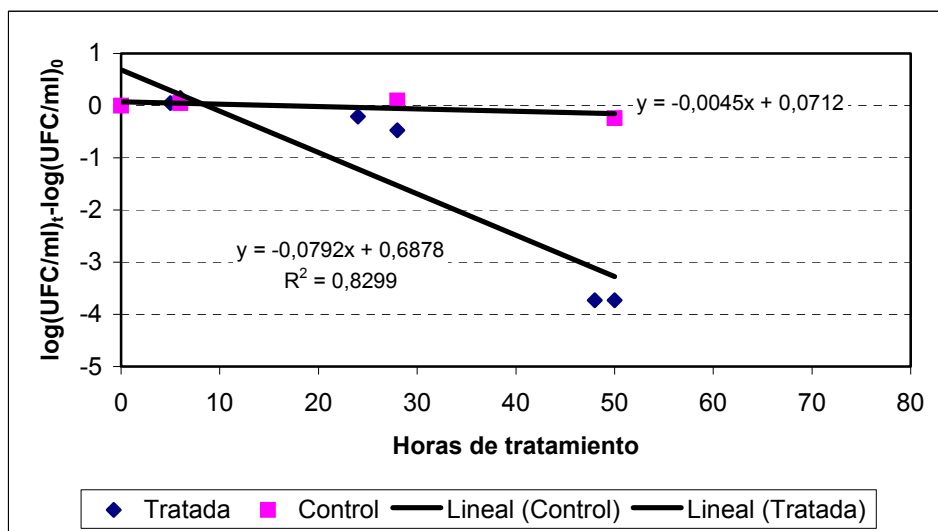
Experiencia 2



Experiencia 3

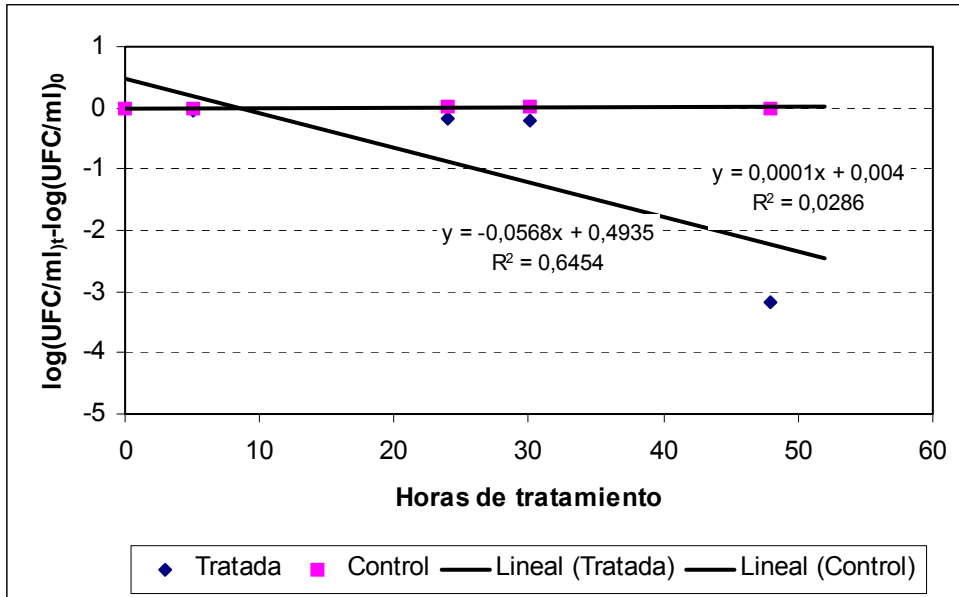


Experiencia 4

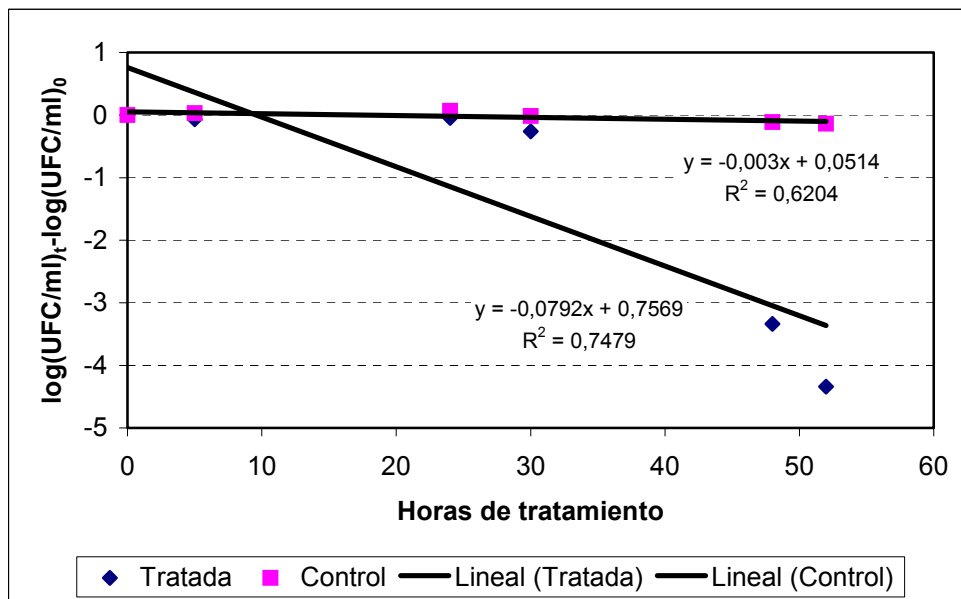


10.2.- Inactivación de *Escherichia coli*

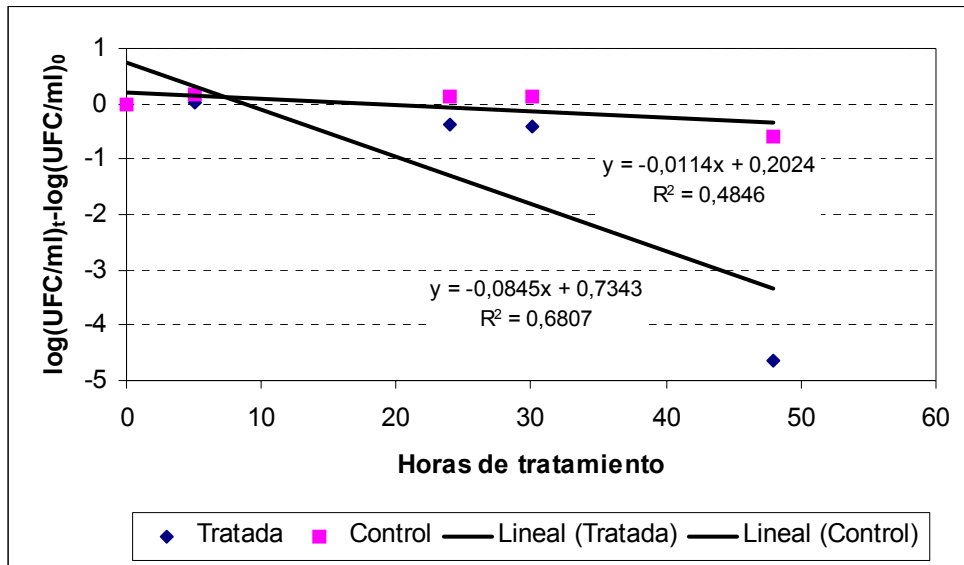
Experiencia 1



Experiencia 2

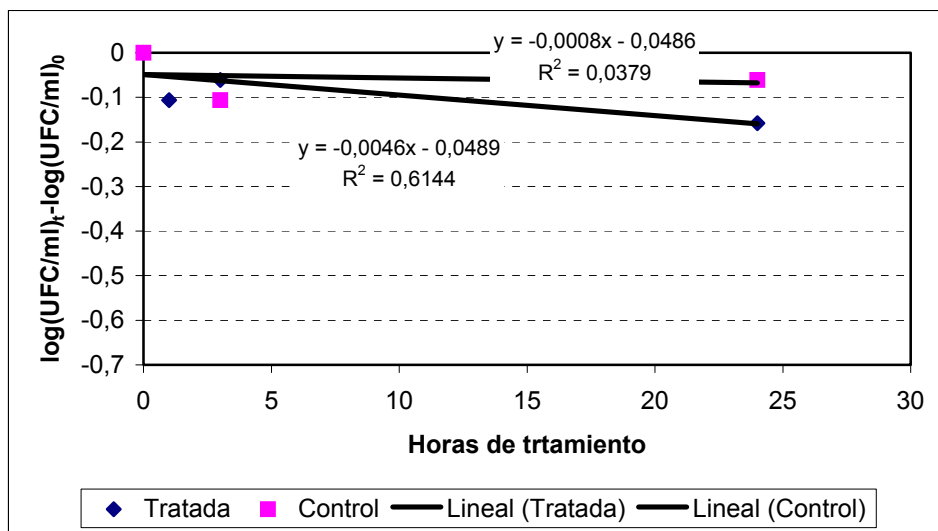


Experiencia 3

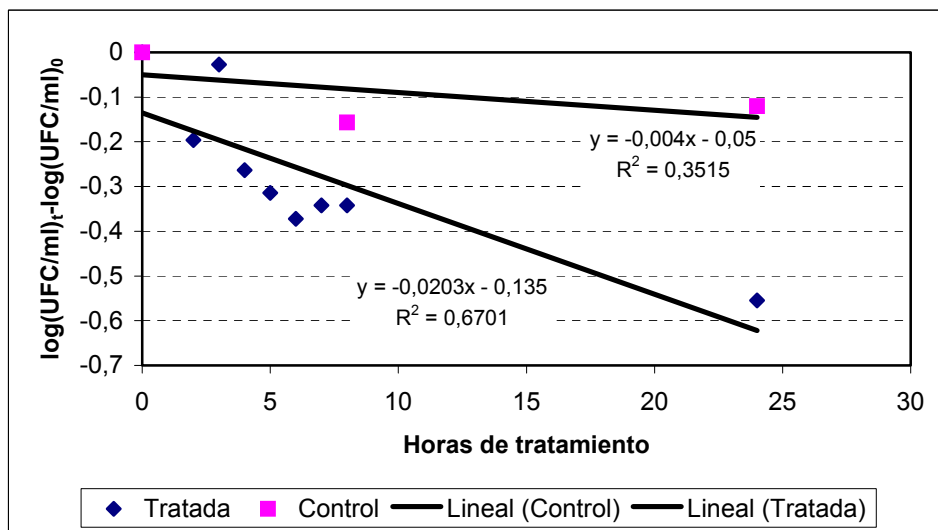


10.3.- Inactivación de bacteriófago B56-3.

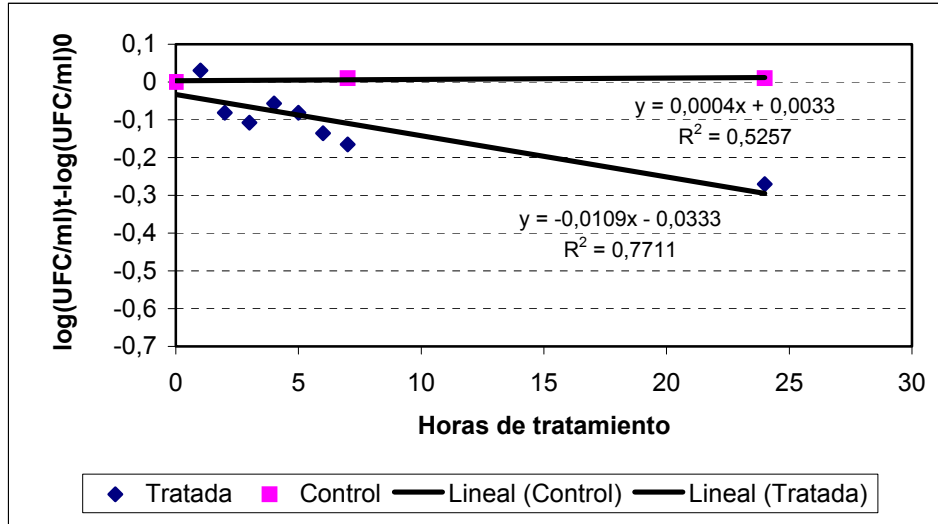
Experiencia 1



Experiencia 2

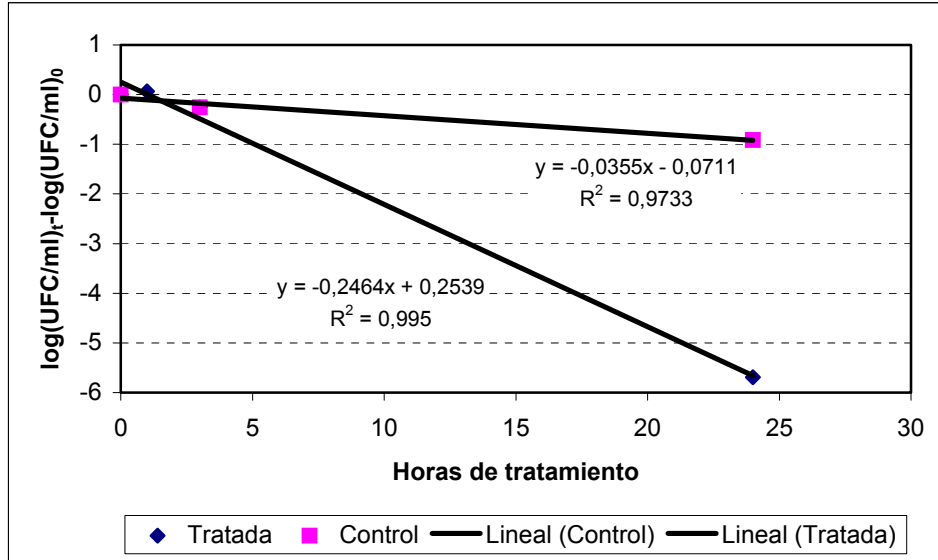


Experiencia 3

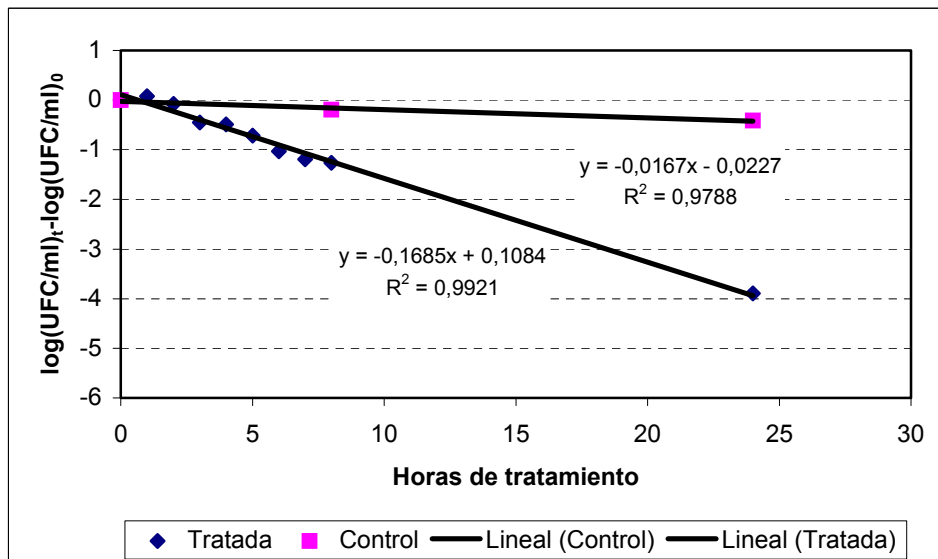


10.4.- Inactivación del bacteriófago MS2.

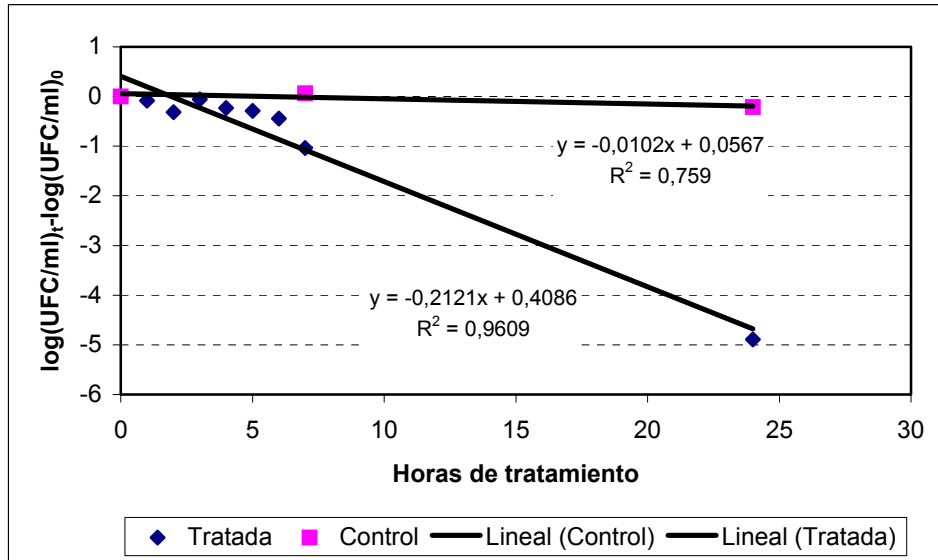
Experiencia 1



Experiencia 2



Experiencia 3



Resultados

A partir de las cinéticas de inactivación se han calculado las T90 y T99 (en horas) de los diferentes microorganismos ensayados.

Resultados de las T90 y T99 en las diferentes experiencias:

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1		Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1	
T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
12,8	31,2	26,3	43,9	5,1	9,1	20,8	42,5
22,6	38,8	22,2	34,8	6,6	12,5	42,6	91,9
22,9	37,2	20,5	32,4	6,6	11,4	88,7	180,4
21,3	33,9	-	-	-	-	-	-

Estadística de las T90 y T99, de los microorganismos ensayados:

	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1		Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1	
	T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
Media	19,9	35,2	23,0	37,0	6,1	11,0	50,7	104,9
Des.est.	4,7	3,3	2,9	6,0	0,8	1,7	34,6	69,9
I.C. 95%	7,6	5,4	7,3	15,0	2,1	4,3	85,9	173,2
I.C. 99%	13,9	9,9	16,8	34,2	4,8	9,7	195,7	394,5
V. mín.	12,8	31,2	20,5	32,4	5,1	9,1	20,8	42,5
V. máx.	22,9	38,8	26,3	43,9	6,6	12,5	88,7	180,4

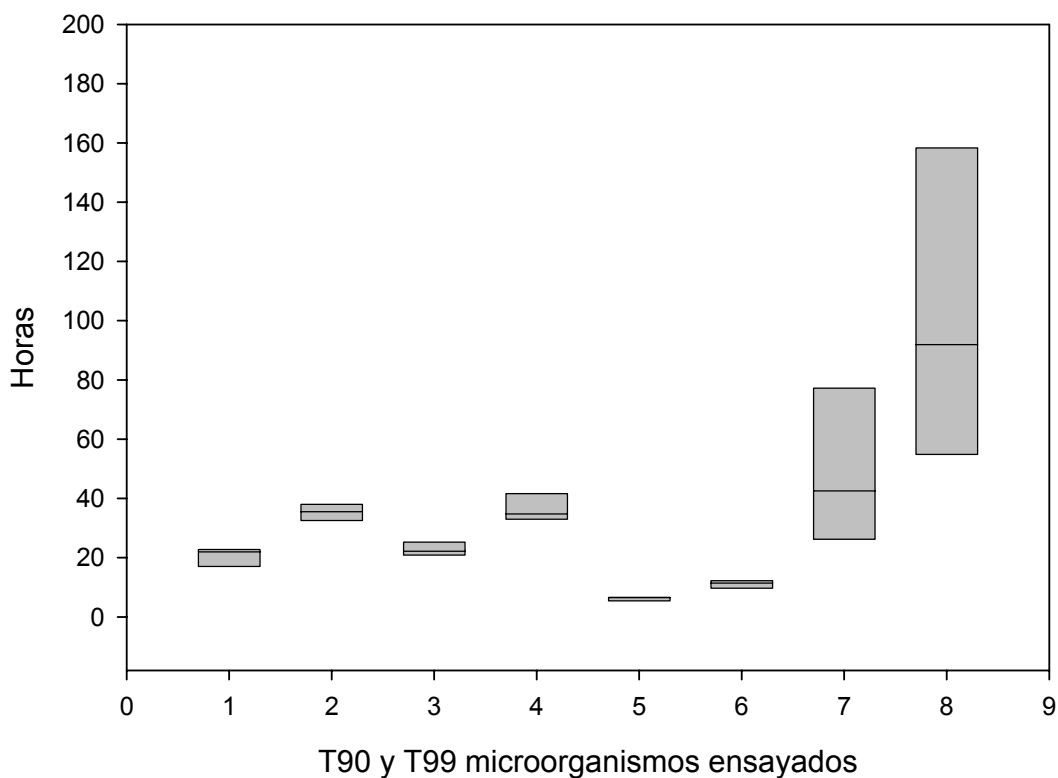
Des.est. : Desviación estándar

I.C. Intervalos de confianza

V. mín : Valor mínimo

V.máx. : Valor máximo

Diagramas de caja de las T90 y T99 de los distintos microorganismos ensayados:



1: T90 de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
2: T99 de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

3: T90 de *Escherichia coli* ATCC 7000078
4: T99 de *Escherichia coli* ATCC 7000078

5: T90 de Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1
6: T99 de Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1

7: T90 de Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1
8: T99 de Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1

11 Discusión

En el presente trabajo se han realizado unas experiencias de inactivación, en circuito cerrado de 200 litros de agua de red, por parte del equipo Aqua Hydro Physical System™, con diferentes microorganismos, (dos bacterias: *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*; y dos bacteriófagos: MS-2 y B56-3)

En las condiciones ensayadas se han podido calcular las T90, es decir el tiempo necesario para inactivar el 90% de la población, o lo que es lo mismo reducir la contaminación presente en una unidad logarítmica.

Las T90 dependen de las características del microorganismo ensayado, así en valor medio tenemos una T90 de 20 horas para *Enterococcus faecalis*; de 23 horas para *Escherichia coli*, de 6 horas para el bacteriófago MS2 y de 51 horas para el bacteriófago B56-3. Los resultados de inactivación de los bacteriófagos propuestos como indicadores de virus nos indican que los virus también son inactivados por el Aqua HPS™.

Estos resultados ponen en evidencia la inactivación microbiana, en las condiciones de ensayo, producida por la acción del reactor, ya que todos los controles realizados en paralelo a las experiencias presentaban unas T90 superiores a las 100 horas. Es decir la inactivación producida por el reactor es significativamente mayor que la inactivación que los microorganismos sufren naturalmente al estar en el seno del agua.

Las experiencias realizadas en las condiciones descritas en materiales y métodos dan unos datos de supervivencia que en cada caso dan una recta de regresión, que simplificando el modelo indicaría una cinética de primer orden. Ello permite calcular las T90 y T99. No se puede excluir la posibilidad de que en un estudio mucho más detallado se pudiera ajustar a otra cinética de inactivación.

Las T90 de las bacterias ensayadas son muy próximas entre sí y cercanas a las 20 horas (20 y 23 horas), al igual que ocurre con la T99 que son de 35 y

37 horas para enterococos y *E.coli* respectivamente. Como son microorganismos modelo, pueden ser indicativos de los procesos de inactivación de un amplio espectro de bacterias, debidos a la acción del reactor en las mismas. Dentro de este espectro cabe pensar que se encontrarían las bacterias tipo *Legionella*. Se cumplirían así las indicaciones del fabricante en cuanto a la inactivación de este tipo de bacterias y su aplicación en diversos tipos de instalaciones de agua.

No ocurre igual para los bacteriófagos ensayados, ambos microorganismos modelo. Así, la T90 de MS2 es de 6 horas frente a las 51 horas de la T90 del bacteriófago B56-3. Esta disparidad de los resultados puede deberse a las distintas características tanto de las bacterias frente a los bacteriófagos, como de estos entre sí.

En resumen, los resultados presentados ponen en evidencia la efectividad del aparato en la eliminación de bacterias y de virus en las condiciones ensayadas. A partir de estos resultados cabe suponer que este equipo (Aqua Hydro Physical System™) debería de ser capaz, con regimenes de funcionamiento adecuados, de minimizar los recrecimientos bacterianos en circuitos cerrados de agua y mantener las concentraciones de cualquier microorganismos a niveles bajos, tal como expone el fabricante en su información de producto.

12 REFERENCIAS

Anonymous (1995) ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 1: Enumeration of *F-specific RNA bacteriophages*. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.

Anonymous (2000) ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 2: Enumeration of somatic coliphages. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.

Anonymous (2002) ISO 10705-4: Water quality Detection and enumeration of bacteriophages -part 4: Enumeration of Bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.

Grabow WO & Cobrough P (1986) Practical direct plaque assay for coliphages in 100-ml samples of drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 52: 430-433.