



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Instituto Universitario del Agua  
y de las Ciencias Ambientales

Informe sobre el trabajo de investigación:

## EFFECTO DEL ELECTROMAGNETISMO SOBRE LA DUREZA, BACTERIAS Y ALGAS EN AGUA

Autores:

Daniel Prats Rico, coordinador

Noemí González Durán, realización de Trabajo fin de máster

# Índice de contenidos

Índice de contenidos .....	3
Resumen .....	5
Abstract.....	5
Palabras clave/Keywords.....	6
1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos .....	12
3.1 Montaje experimental.....	12
3.2 Metodología.....	14
3.3 Caracterización del aragonito y de la calcita .....	15
3.4 Determinación de la dureza .....	19
3.5 Presencia de Enterococos, E. coli y coliformes fecales.....	19
3.6 Estudio del potencial de oxidación reducción .....	21
4. Resultados y discusión .....	21
4.1. Tratamiento antical .....	21
Caracterización del agua y ORP .....	21
Test de Meigen.....	22
Microscopia electrónica de barrido .....	23
4.2. Crecimiento de bacterias.....	28
5. Conclusiones.....	34
6. Continuación de la presente investigación .....	34
7. Bibliografía y referencias .....	34
Agradecimientos.....	38

Anexos.....	39
Anexo 1: Preparación de los medios de cultivo .....	39
Anexo 2: Características de los medios de cultivo utilizados .....	40

## Resumen

La dureza del agua es una característica muy estudiada por investigadores ya que donde es muy elevada puede afectar a la integridad de las conducciones y equipos de los hogares e industrias. El objetivo de este trabajo es estudiar la transformación de calcita en aragonito mediante pulsos electromagnéticos y con cambios de temperatura, y comprobar la eficacia del equipo industrial Antical RF Plus como bactericida y alguicida. Para llevarlo a cabo se ha realizado un montaje experimental donde se ha estudiado el comportamiento de agua de red y agua de estanque. Las muestras se han evaluado mediante el test de Meigen y micrografías SEM. Por otra parte se han realizado cultivos bacterianos para comprobar el efecto desinfectante. Los resultados obtenidos en relación a la transformación de los alótropos del  $\text{CaCO}_3$  no fueron concluyentes. En el caso de los test de Meigen pudo haber interferencias con otros iones. En relación a las micrografías del SEM es posible la influencia del tiempo de magnetización o la velocidad de crecimiento del cristal. Los resultados relacionados con la eficacia del dispositivo como desinfectante fueron satisfactorios, observando altos porcentajes de reducción de las colonias de microorganismos en algunas muestras, debido posiblemente tanto a los propios pulsos electromagnéticos como el efecto que producen estos pulsos sobre el potencial de oxidación-reducción que parece aumentar.

## Abstract

Water hardness is a feature of water well studied by researchers because where it is very high it can affect the integrity of the pipelines and equipment in households and industries. The objective of this work is to study the transformation of calcite in aragonite by electromagnetic pulses and temperature changes, and to check the efficacy of the Anti-lime RF Plus equip as bactericide and algaecide. To carry out it there has been realized an experiment where there has been studied the water behavior of network and water of pond. Samples have been evaluated using the Meigen test and SEM micrographs. On the other hand, bacterial cultures have been performed to check the disinfectant effect. The results obtained related to the transformation of the allotropes of  $\text{CaCO}_3$  haven't been conclusive.

In the case of Meigen tests could have interference with other ions. In relation to micrographs of the SEM it is possible the influence of the magnetizing time or the speed of crystal growth. The results related to the effectiveness of the device as a disinfectant were satisfactory observing high percentages of reduction of the colonies of microorganisms in some samples, possibly due to the own electromagnetic pulse the effect that these pulses produce on the oxidation-reduction potential that seems to increase.

## Palabras clave/Keywords

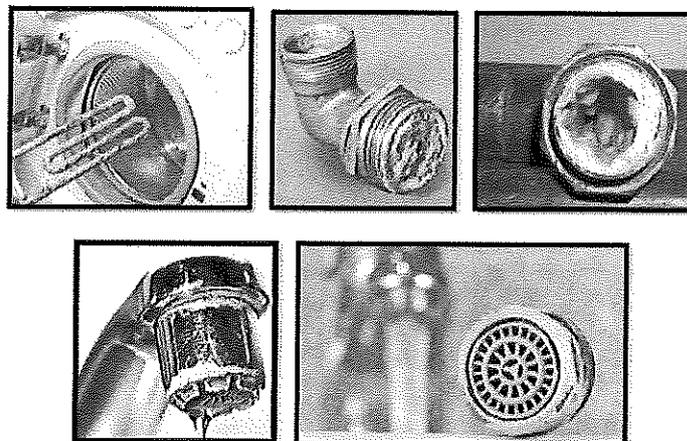
Dureza del agua, electromagnetismo, desinfectante, potencial de oxidación-reducción, E.coli

Water hardness, electromagnetism, disinfectant, oxidation-reduction potential, E.coli

# 1. Introducción

La dureza del agua ha sido siempre un tema muy estudiado por sus repercusiones en distintos aspectos relacionados con el uso del agua. El agua dura se caracteriza por un alto contenido de sales disueltas de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ). Se ha comprobado que estas características químicas del agua pueden producir problemas cutáneos, ya que el carbonato cálcico es un irritante conocido de la piel (Wang and Tsai, 2014), que puede perjudicar sus funciones de barrera (Warren *et al.*, 1996). También influye en la necesidad de usar más productos relacionados con la higiene personal (jabones, geles, champús) y detergentes por el pobre rendimiento de éstos en comparación con el agua blanda. Esto es debido a que la producción de espuma se ve comprometida por una mayor concentración de carbonato cálcico. Esta necesidad de usar mayor cantidad de productos químicos sobre la piel puede agravar las irritaciones y enfermedades cutáneas (Engebretsen *et al.*, 2017).

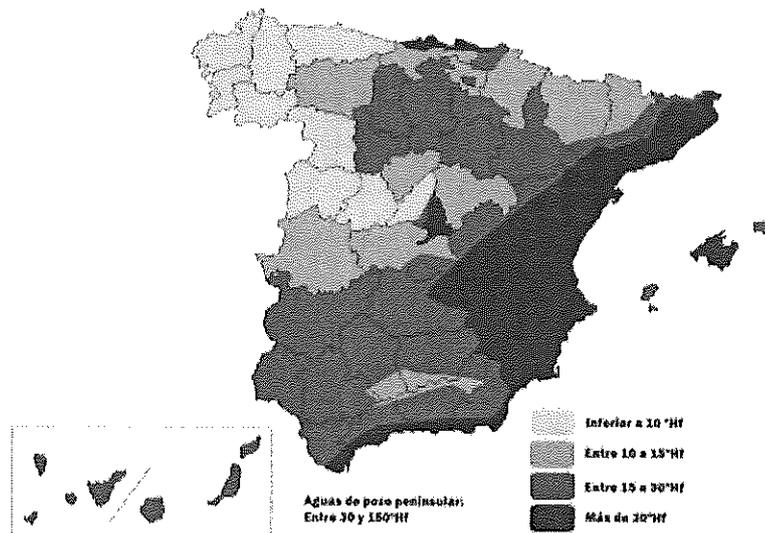
Otros problemas derivados de la dureza del agua, son los relacionados con las incrustaciones de precipitados de carbonato que producen serios problemas técnicos y económicos (Ghizellaoui *et al.*, 2017) en las conducciones y equipamiento de los hogares e industrias. La formación de estos precipitados afecta a cualquier conducción por la que pase agua, desde tuberías, electrodomésticos y maquinaria hasta incluso superficies (**Figura 1**). Es una afección común en sistemas de refrigeración de agua, sistemas de calefacción y alimentación de calderas, plataformas petrolíferas y unidades de desalinización (Menzri *et al.*, 2017). Estos depósitos también originan problemas en las redes de abastecimiento.



**Figura 1:** Incrustaciones de carbonato cálcico

Otro problema producido por los depósitos de carbonato cálcico en las paredes es que influye en el intercambio de calor, ofreciendo más resistencia, por lo que aumenta el consumo eléctrico al necesitar más energía para calentar o enfriar. Por último, las incrustaciones de cal favorecen la corrosión de las conducciones.

Los inconvenientes asociados a la composición química del agua son más visibles en aquellos lugares donde el agua es más dura, es decir, terrenos de naturaleza calcárea que cargan las aguas del subsuelo de este mineral (Ghizellaoui and Ghizellaoui, 2015). En el caso de España la situación de dureza de las aguas distribuidas por las empresas de suministro, muestra que prácticamente toda la costa mediterránea (este y sur de España), además de las islas poseen aguas duras en diferentes grados (**Figura 2**) mientras que parte del norte (Galicia) y de Castilla y León, poseen una calidad de aguas excelente en términos de dureza, es decir, son aguas blandas. Según la escala francesa de dureza, en la que se basa el mapa de la **Figura 2**, las aguas muy blandas y moderadamente dulces corresponderían a aguas con menos de 22°f (equivalencia a 220 mg/L), las aguas moderadamente duras y duras están comprendidas entre 22 y 54°f (220-540 mg/L), a partir de 54°f ya se considerarían aguas muy duras.



**Figura 2:** Mapa de España con la distribución de la calidad del agua en relación a la dureza en la escala de grados franceses (servicios de distribución de agua de las compañías, no pozos)

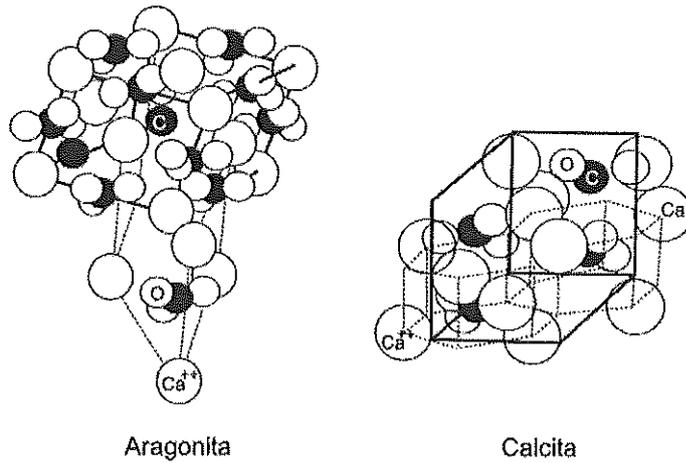
Existen distintos tipos de tratamientos que se pueden aplicar al agua para evitar la aparición de precipitados e incrustación de carbonato cálcico en las conducciones, y

también métodos de ablandamiento del agua. Los más utilizados han sido siempre los métodos químicos, es decir, adicionar un producto químico que tenga un efecto de inhibición de la incrustación (modifica la solubilidad de las sales). En cada caso se emplea el antiincrustante comercial más adecuado. El uso de antiincrustantes es un pretratamiento muy utilizado y necesario en procesos de filtración por membranas (Medina San Juan, 1999; Ibáñez Mengual, 2009; Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Otros métodos utilizados son electroquímicos, es decir, la creación de un campo eléctrico que actúe sobre la formación de los cristales de calcita (Catli, 2009; Al Nasser *et al.*, 2011).

Alternativamente a los procedimientos clásicos anteriores, otros métodos para tratar el agua, se basan en la creación de un campo magnético. Los primeros experimentos sobre este tema se realizaban con imanes permanentes, como los de Coey and Cass, 2000 y Gabrielli *et al.*, 2001. Actualmente las tecnologías de resonancia magnética están sustituyendo cada vez más esta metodología por electroimanes, como podemos encontrar en los trabajos de Chang and Tai en 2010, Dobersek and Goricanec en 2014 y Simonič and Urbanč en 2017. Concretamente la técnica consiste en dispositivos que emiten ondas de radio electromagnéticas de alta o baja frecuencia, que crean un campo magnético capaz de inhibir la formación de cristales de calcita, haciendo que precipite como aragonito, el cual es un polimorfo del  $\text{CaCO}_3$ , que no se adhiere a las conducciones.

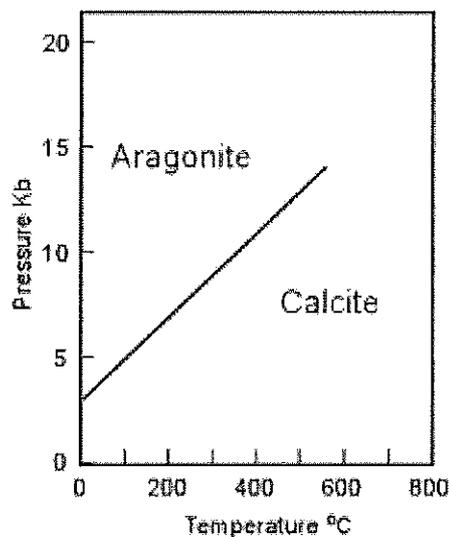
Con este tratamiento se pretende conseguir una transformación de un agua dura para que se comporte como un agua blanda, es decir, que sin cambiar las propiedades químicas del agua, obtener unas propiedades físicas diferentes, gracias a un cambio en la estructura cristalina de la calcita, transformándola en aragonito.

La calcita y el aragonito, como se ha comentado anteriormente, son alótropos del carbonato cálcico, o sea que aunque tengan la misma fórmula molecular poseen estructuras diferentes.



**Figura 3:** modelo molecular de la estructura cristalina de la calcita y la aragonito.

Las diferencias que existen entre ambos minerales son varias, principalmente hay un cambio en la estructura. Mientras que la calcita presenta una estructura hexagonal-romboédrica, el aragonito tiene una estructura ortorrómbica (**Figura 3**). Esta transformación además confiere a cada cristal determinadas propiedades físicas. En el caso del aragonito tiene las características de ser más denso y más duro que la calcita. (Verdú, 2016). En la **Figura 4** se puede observar un diagrama con la relación que hay de ambos minerales con la presión y temperatura del medio, de forma que se puede saber en qué condiciones se pueden formar o no. Como se puede observar en condiciones habituales de temperatura y presión la forma más estable es la calcita (Catli 2009).



**Figura 4:** Diagrama P-T del aragonito-calcita

Los nuevos dispositivos capaces de reducir las incrustaciones, e incluso eliminar las ya existentes, parece que pueden tener otras aplicaciones. Empresas especializadas como ESALTIA<sup>1</sup>, indican que pueden tener efectos sobre el crecimiento de bacterias como *E.coli* y otros coliformes y *Legionella* o incluso algas unicelulares (ESALTIA, 2017), de forma que pueden ayudar a una esterilización del agua. Soghomonyan *et al.*, 2016, estudiaron cómo afectan las ondas milimétricas (campos electromagnéticos de muy alta frecuencia) sobre las bacterias. Sus resultados mostraron que una radiación directa en un medio sólido inhibía el crecimiento y disminuía su actividad, sin embargo, en medio líquido los resultados eran distintos, y la disminución del crecimiento no era tan marcada como la radiación directa. La radiación electromagnética afectaba a las propiedades de la membrana de las bacterias haciéndolas más permeables. Las bacterias mostraban efectos sobre las propiedades de la membrana, siendo más permeable, también se encontró que las bacterias eran más sensibles a los antibióticos aumentando el efecto bactericida de los mismos. Otros resultados los obtuvieron Barabas *et al.*, 2016, usando un generador de ondas de baja frecuencia directamente sobre los cultivos de bacterias, observando una reducción considerable del número de colonias.

Respecto al agua potable de España, independientemente de su dureza debe cumplir el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Esta norma regula la cantidad de bacterias que puede o no haber en el agua potable, además de otros parámetros, de forma que se garantiza que no hay ninguna UFC (unidad formadora de colonias) en 100 mL de agua de estos microorganismos (BOE, 2003). Por otra parte, no es previsible que existan algas en el agua potable pues el agua se filtra en las potabilizadoras.

En países donde las leyes sobre calidad del agua potable pueden ser más laxas, podría ser interesante la utilización de estos procedimientos para ayudar a esterilizar el agua, por su probable efecto bactericida y alguicida.

Este trabajo se ha desarrollado como continuación de la investigación y experimentación que realizó David Verdú en 2016 para su estudio “Efecto del electromagnetismo sobre la dureza del agua”. En ese estudio no se utilizó el mismo dispositivo que se ha usado en el presente trabajo, sin embargo, el dispositivo antical RF Plus que se ha empleado tiene las mismas funciones que el que utilizó Verdú, únicamente se diferencian en que, según la

---

<sup>1</sup> <http://www.esaltia.com>

empresa suministradora, el dispositivo empleado en la presente investigación tiene más capacidad bactericida (lo que se pretende comprobar). En cuanto a las diferencias en las condiciones de experimentación, en el este caso se ha utilizado un caudal de 500 L/h, en el caso del estudio de Verdú fueron de 1000 L/h.

## 2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son, por una parte estudiar la transformación de los alótropos del carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ), calcita y aragonito, cuando se encuentran en disolución acuosa y se someten a pulsos electromagnéticos, estudiando cuales son las mejores condiciones de temperatura para un mejor rendimiento del dispositivo. Por otra parte, se quiere comprobar la eficacia del dispositivo Antical RF Plus suministrado por ESALIA como tratamiento bactericida y alguicida.

## 3. Material y métodos

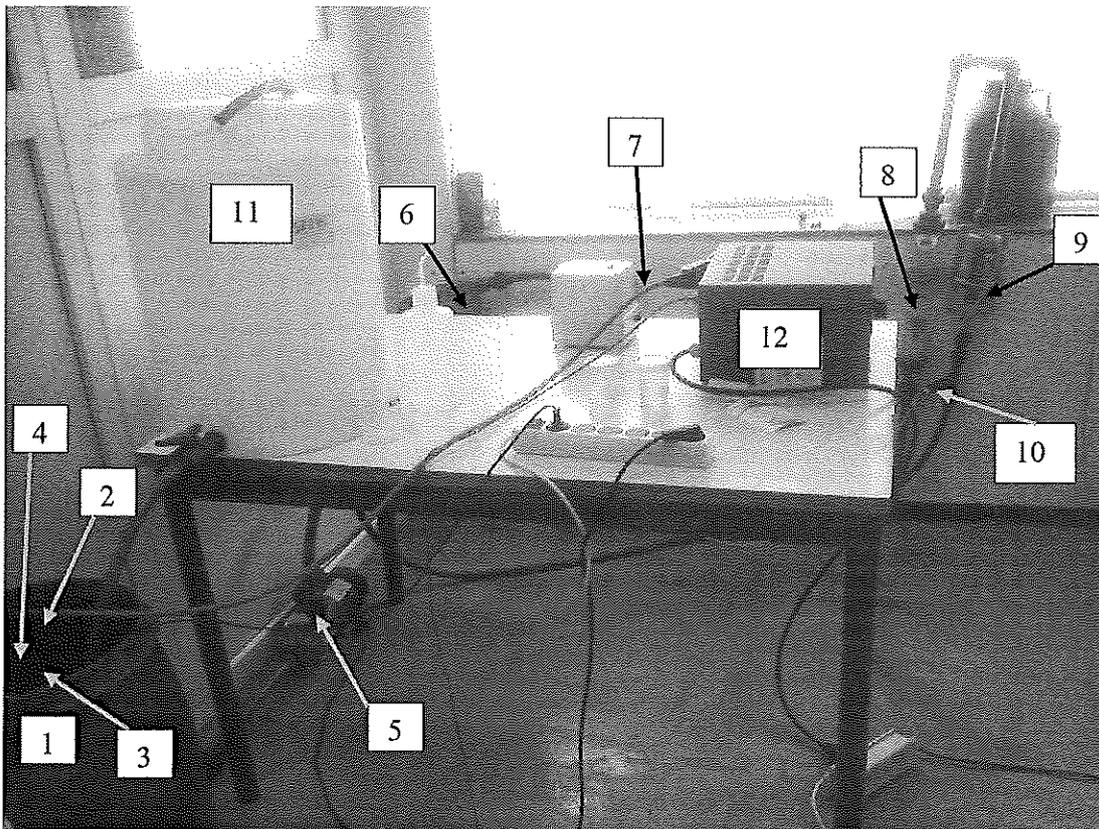
### 3.1 Montaje experimental

Para realizar los experimentos se ha montado un circuito hidráulico que consta de las siguientes partes:

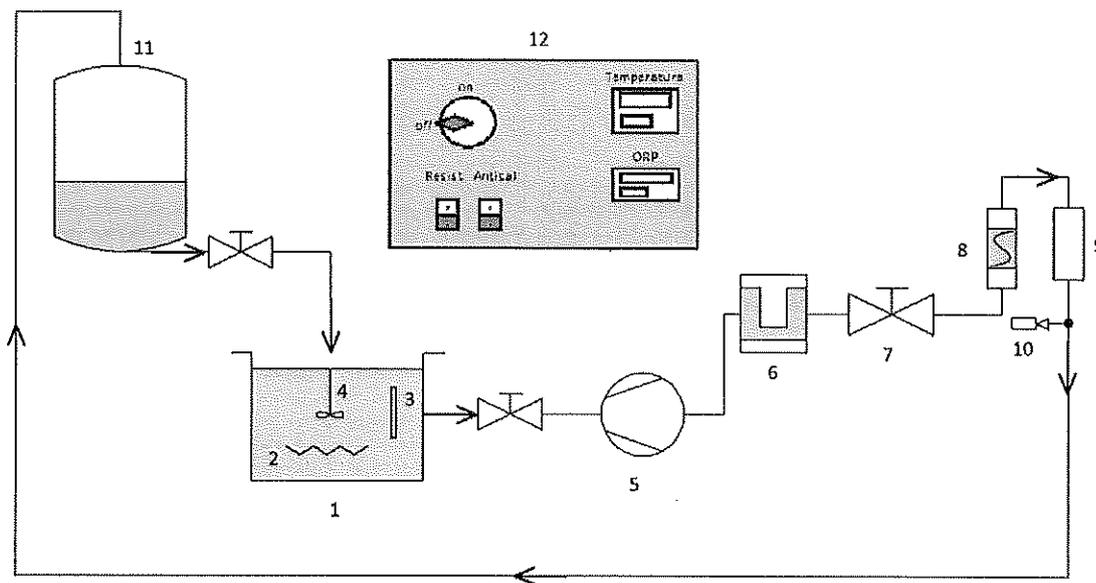
1. Bidón de alimentación (50 L)
2. Resistencia para calentar el agua
3. Sonda de temperatura
4. Agitador para crear turbulencia (bomba pequeña)
5. Bomba impulsora (500 L/h)
6. Filtro de seguridad (50  $\mu\text{m}$ )
7. Válvula manual de paso
8. Rotámetro
9. Dispositivo Antical RF Plus (dispositivo comercial electromagnético con ondas de baja frecuencia, concretamente 50 Hz y 230 V de alimentación)
10. Sensor del potencial de oxidación reducción (ORP)
11. Bidón de recogida (50 L)
12. Panel de control para la temperatura, ORP y antical

Todos los elementos están interconectados por tuberías de PVC de 20 mm de diámetro, con su racor correspondiente a cada extremo para unirlos a los componentes. Estas conducciones son semirrígidas excepto en la entrada y salida del rotámetro, antical y electrodo ORP donde son rígidas. Los bidones poseen una llave de paso a la salida de los mismos. El montaje experimental es muy similar al utilizado en el estudio de Verdú (2016).

En la siguiente imagen (**Figura 5**) podemos observar donde está situado cada componente dentro del montaje experimental. En la **Figura 6** se puede observar el esquema del circuito hidráulico y los sensores.



**Figura 5:** Montaje experimental con el que se ha realizado el trabajo



**Figura 6:** Esquema del circuito hidráulico y los componentes del experimento

Para incorporar el sensor ORP al experimento primero se tuvo que calibrar con dos buffers de 240 y 470 mV específicos del fabricante, este procedimiento se realizó todos los días que se utilizó el montaje para evitar errores de calibración.

### 3.2 Metodología

El procedimiento habitual para obtener las muestras y resultados fue el siguiente: utilizando el montaje anteriormente expuesto (**Figura 5 y 6**) se hizo pasar el agua por todo el circuito a caudal constante de 500 L/h (8.33 L/min), primero sin aplicar ningún tratamiento, hasta que se estabilizaba el caudal y el valor del potencial de oxidación-reducción (ORP), después se conectaba el Antical RF Plus desde el panel de control general para que ejerciera su efecto (tratamiento). Se tomaban muestras sin y con tratamiento, en volúmenes de 500 mL para el test de Meigen, 2 gotas para el SEM y 300 mL para el cultivo de bacterias. Se repitió este procedimiento a diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55 y 65 °C), para ello desde el panel general se fijaba la temperatura consigna y se conectaba y controlaba una resistencia que estaba introducida en el tanque y que calentaba el agua. También se tomaban datos del ORP en todo momento.

Se emplearon dos tipos de agua. Por una parte, agua potable proveniente de la red de abastecimiento de San Vicente del Raspeig, tomada en los laboratorios de IUACA (Instituto Universitario del Agua y las Ciencias Ambientales, Universidad de Alicante) con

un pH medio de 7.85 y conductividad eléctrica promedio de 1488  $\mu\text{S}$ . Esta agua potable fue tomada en diferentes días y se utilizó para realizar los experimentos de dureza y efecto del antical sobre los alótopos del  $\text{CaCO}_3$ .

Por otra parte, para ver el efecto bacteriológico y desinfectante del dispositivo se utilizó agua procedente de un estanque ornamental y de regulación de agua de regadío situado en la Universidad de Alicante. Esta agua procede de una pequeña planta de ósmosis inversa de la propia universidad que se conduce a un lago adyacente donde se mezcla con agua salobre de pozo. El agua muestreada presenta un bajo contenido en cloro, a pesar de la adición de hipoclorito sódico en la planta, ya que estas lagunas tienen suficiente superficie y poca profundidad como para que desaparezca el cloro con facilidad. Además, en la planta el permeado procedente de la ósmosis inversa recibe un post tratamiento dosificando cal después de salir de la OI para remineralizarla<sup>2</sup>. El resultado final que recogemos para la experimentación es un agua con un pH medio de 8.23 y una conductividad de 2128  $\mu\text{S}$ , además tiene un alto contenido microbiológico, tanto por algas como protozoos y bacterias, debido a que dentro del estanque conviven carpas, tortugas y varios tipos de ánades.

### 3.3 Caracterización del aragonito y de la calcita

Varios métodos han sido descritos por diferentes autores para distinguir los dos minerales aragonito y calcita. Hay varios procedimientos de tinciones específicas del aragonito. Los más comunes son el test de Feigl, desarrollado por Feigl en 1937, que utiliza una solución fruto de la mezcla de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y agua destilada; el test con ácido rhodizónico (también descrita por Feigl) que utiliza una solución con este ácido y por último el test de Meigen, explicado por Meigen en 1901, en el cual se utiliza una solución de nitrato de cobalto. Este último test es el que se ha elegido y se utilizará para este trabajo por su sencillez y rapidez (Verdú, 2016).

Para el test de Meigen se realizó el siguiente procedimiento según lo describen Ayan (1965) y más tarde Pueyo (1991). Se prepara una disolución 0.1N de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  en agua destilada, teniendo en cuenta que el nitrato de cobalto está hexahidratado.

Se tomaron muestras de 500 mL de agua con cada temperatura antes y después del tratamiento con el Antical RF Plus y se secaron en la estufa a 105 °C, de esta forma se

---

<sup>2</sup> <https://ssti.ua.es/es/infraestructuras-de-apoyo/planta-de-tratamiento-de-aguas.html>

obtuvo una cantidad de residuo seco adecuada para el test. Aproximadamente se obtienen 0.2 g de residuo seco.

Se añadieron 2 mL de la solución por cada 0.2 g de muestra, después se hirvió la muestra y se mantuvo en ebullición durante 20 minutos, en un dispositivo tal como se muestra en la **Figura 7**. El resultado que se debe obtener dependerá de la forma alotrópica del carbonato cálcico. Si la estructura cristalina es de aragonito, la muestra se teñirá de un color lila o violáceo, ya que el cobalto es capaz de depositarse en esta estructura (Verdú, 2016), si por el contrario es calcita esto no ocurre por lo que permanecerá sin modificaciones en el color.



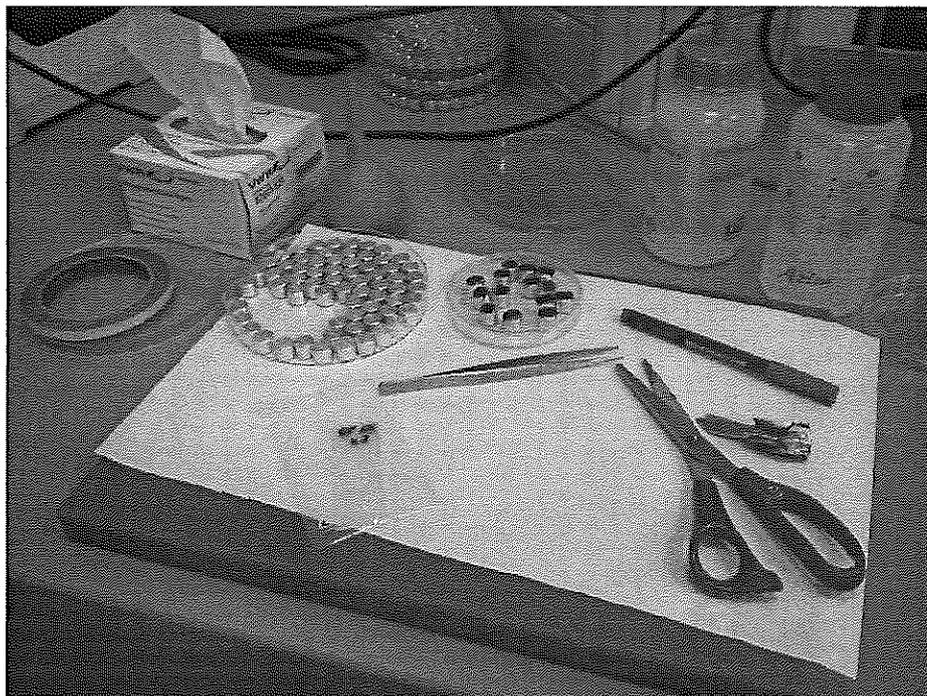
**Figura 7:** Dispositivo para calentar tubos de ensayo

- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Otro procedimiento para distinguir aragonito y calcita es mediante su visualización por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recogieron con una pipeta pasteur del bidón antes y después de aplicar el tratamiento con el antical, se depositaron dos gotas sobre un cubreobjetos circular de 15 mm de diámetro o directamente en el portaobjetos y se dejó secar en la estufa a 105 °C.

A continuación, se procedió a prepararlas para la microscopía electrónica. Para ello se usaron unos cilindros metálicos como portamuestras, después una cinta adhesiva (por

ambas caras) de carbón se colocaba encima del portamuestras y sobre este adhesivo se depositaba la muestra. Se pegaba directamente en el caso de los cubreobjetos (el portamuestras es del mismo diámetro aprox.) o se rascaba la muestra con una cuchilla (en los casos donde se encontraba en un portaobjetos) e igualmente se pegaba al adhesivo. Todos estos materiales se muestran en la **Figura 8**. Estas muestras finalmente se recubrían con una capa de oro con un metalizador para que fueran conductoras y así poder visualizarlas con el SEM (**Figura 9**).



**Figura 8:** Materiales para preparar muestras para el SEM



**Figura 9:** Metalizador para recubrir las muestras de oro

Antes de visualizar las muestras en el SEM se limpiaban soplando con una pera de vacío para evitar ensuciar el microscopio con pequeñas motas de polvo o fibras. Se empleó un equipo de marca JEOL modelo JSM-840 (**Figura 10**). Se trabajó a una distancia de trabajo constante (WD15) y utilizando un zoom x1000, x2000 y x5000, lo que permite alcanzar tamaños de entre 10  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$ .

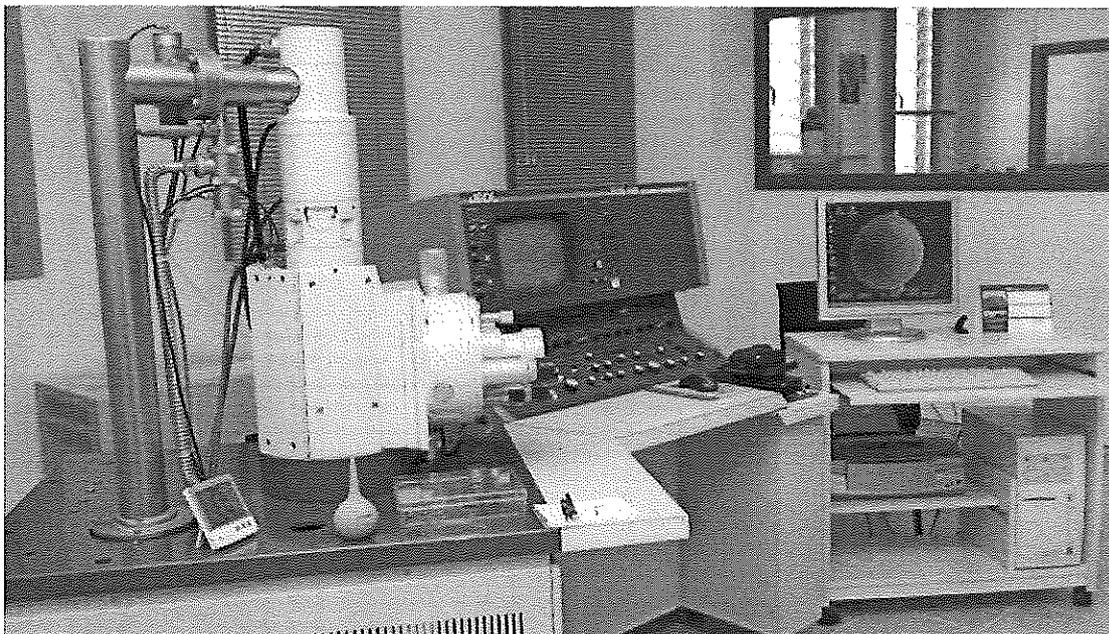


Figura 10: Microscopio electrónico de barrido

### 3.4 Determinación de la dureza

La caracterización de los cationes de calcio y magnesio en el agua se realizó por el método de espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Previamente se realizó una recta de calibrado con 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 mg/L de cada elemento. La muestra de agua potable se midió con dilución 1:10, 1:5 y sin diluir.

Para calcular la dureza del agua se utilizaron los valores de las concentraciones de calcio y magnesio, empleando la siguiente ecuación (Weiner, 2012):

$$\text{Dureza total (mg equivalentes de CaCO}_3\text{/L)} = 2.497(\text{Ca}^{2+}, \text{mg/L}) + 4.118(\text{Mg}^{2+}, \text{mg/L})$$

El resultado de esta ecuación puede expresarse en la escala francesa de dureza si se divide entre 10.

### 3.5 Presencia de Enterococos, E. coli y coliformes fecales

Se prepararon los medios apropiados para el cultivo de cada bacteria. El medio Chromocult Coliform Agar para *E.coli* y otros coliformes y membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley para enterococos (más información en ANEXO 1 y 2).

Se filtraron 100 mL de agua del grifo (agua potable de San Vicente) por un sistema de filtración por membranas (**Figura 11**), de forma que las bacterias se quedan en la membrana, en la cual después se pondrá el medio. Este procedimiento se repitió por triplicado para cada medio de cultivo. En todo momento se mantuvieron las condiciones asépticas de la zona de trabajo utilizando un mechero de alcohol, también se esterilizaban los soportes de las membranas flambeando con alcohol después de cada uso para evitar la contaminación.



**Figura 11:** Equipo de filtración por membranas

Por otra parte, el agua del estanque se dejaba decantar durante unas horas para que sedimentara toda la materia orgánica y así no ensuciar y colmatar el filtro del sistema. También se mantuvo en el agua la temperatura seleccionada (a partir de 45°C) durante varias horas para evitar errores en el conteo derivados de un posible efecto de la temperatura sobre las bacterias, antes de conectar el dispositivo Antical RF Plus. Se procedió de la misma forma que en el caso anterior, utilizando muestras de 100 mL y filtrándolas con el equipo de vacío, también por triplicado. Las membranas también se cultivaron en los medios adecuados, esta vez con la certeza de que crecerán organismos.

as placas se incubaron a 37 °C, 24 h para los coliformes totales y 48 h para los cultivos de enterococos. Después del tiempo de incubación se realizaba un conteo de las colonias que se habían formado.

### 3.6 Estudio del potencial de oxidación reducción

Para estudiar los cambios en el potencial de oxidación reducción con el tratamiento antical a lo largo del tiempo, se realizó primero una prueba control con 50 L de agua de grifo a 25 °C sin someterla a tratamiento antical. La primera media hora se dejó sin conectar el dispositivo antical hasta estabilizar el caudal, después se encendió y se fueron anotando los valores que marcaba en el panel cada media hora. El dispositivo Antical RF se mantuvo encendido durante 5,5 h. Para el agua del estanque primero se hizo una muestra control con agua destilada y se procedió de la misma forma que el caso anterior, pero manteniendo el dispositivo encendido durante 5 h.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Tratamiento antical

#### Caracterización del agua y ORP

En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se muestran los datos de pH y conductividad que presentaba el agua de la red en los distintos experimentos,

**Tabla 1:** pH y conductividad eléctrica del agua de red

pH	CIE ( $\mu\text{S}$ )
7,85	1530
7,88	1275
7,86	1611
7,83	1521
7,8	1346

Según el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, las aguas no pueden superar los valores de CE de 2500  $\mu\text{S}$  y el pH debe estar comprendido entre 6,5 y 9,5, y cumpliendo

además que el agua no sea ni agresiva ni incrustante. Los valores determinados, como eran de esperar se encuentran dentro de los rangos establecidos.

En cuanto a la dureza del agua se procesaron los resultados del ICP-OES dando los siguientes valores en los cationes de calcio y magnesio (**Tabla 2**). Los valores de concentración se ajustaban correctamente a la recta de calibrado preparada.

**Tabla 2:** Resultados del ICP-OES

	Ion	Concentración (mg/L)	Dureza (°f)	Dureza total (°f)
Sin dilución	Ca	120,0	57,3	57,3
	Mg	66,5		

El valor de la dureza total se ha calculado con la fórmula mencionada anteriormente. Según la escala francesa de dureza (grados franceses, °f), por encima de 54 °f el agua se puede considerar muy dura (como se ve en la **Tabla 3**) como en este caso (57 °f). A pesar de esto, la muestra de agua potable cumple la calidad que exige la ley.

**Tabla 3:** Escala francesa de dureza

Características del agua	Grados (°f)
Muy dulce	< 7
Dulce	7-14
Medianamente dulce	14-22
Medianamente dura	22-32
Dura	32-54
Muy dura	> 54

Durante el experimento con el Antical RF Plus se tomaron los datos del potencial de oxidación-reducción (ORP) y temperatura para el agua de la red de San Vicente del Raspeig cuando no lleva tratamiento y cuando es tratada con el dispositivo electromagnético.

Los resultados de ambos experimentos se resumen en la **tabla 4 y 5**.

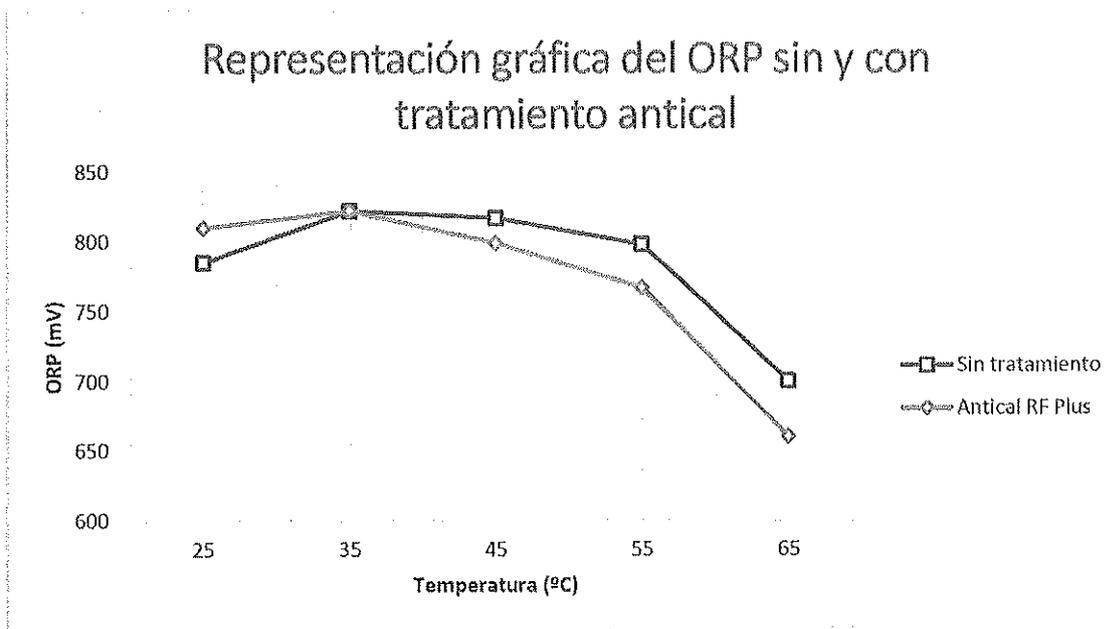
**Tabla 4:** Resultados experimentales de ORP a diferentes temperaturas sin tratamiento

Temperatura (°C)	ORP (mV)
25	785
35	822
45	817
55	798
65	700

**Tabla 5:** Resultados experimentales de ORP a diferentes temperaturas con tratamiento antical

Temperatura (°C)	ORP (mV)
25	810
35	822
45	799
55	767
65	660

Y se puede ver la diferencia entre ambos tratamientos representado en la **Figura 12**.

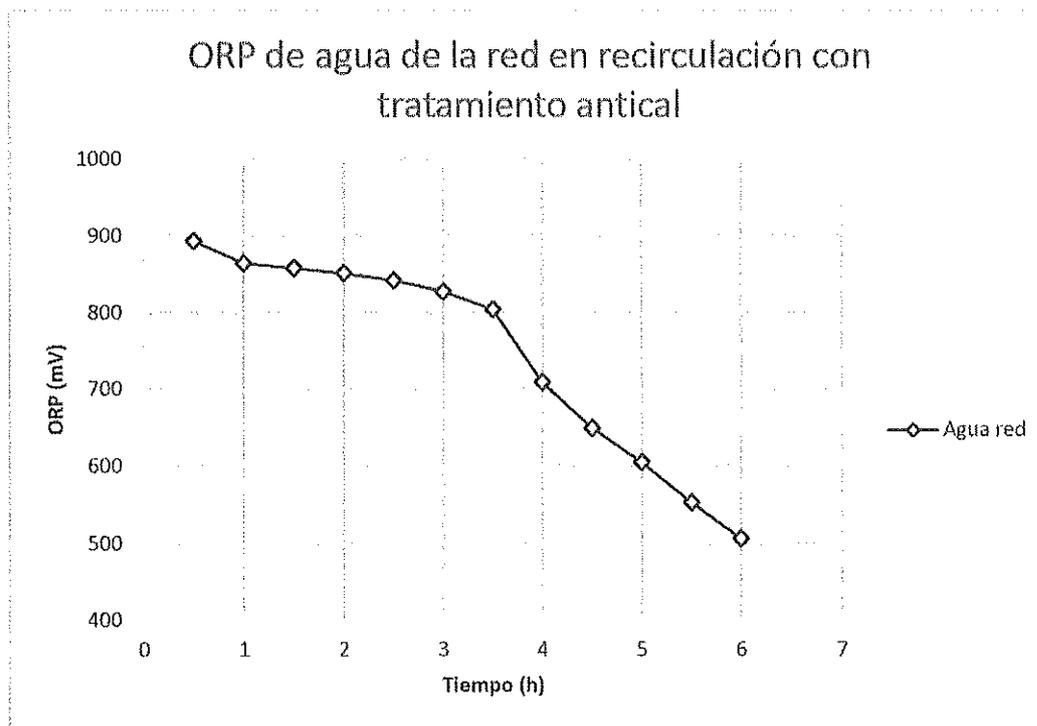


**Figura 12:** Comparación del potencial de oxidación-reducción con y sin tratamiento en agua de la red

Como se puede observar en la figura anterior, los datos de las **tablas 4 y 5** muestran que a medida que aumenta la temperatura, el potencial de oxidación-reducción disminuye en ambos tratamientos, siendo más acusado el cambio a mayores temperaturas. Esto se puede justificar porque a medida que se aumenta la temperatura el cloro libre va desapareciendo ya que se evapora, el agua, al perder este fuerte oxidante disminuye su potencial de oxidación-reducción y su efecto desinfectante.

En este proceso también tiene influencia el movimiento del agua en recirculación, la turbulencia también facilita la evaporación. En el gráfico además se puede observar que a temperatura ambiente el ORP es menor que a 35 °C, esto puede ser debido a que como no se hizo el experimento en el mismo día para todas las temperaturas, la cantidad de cloro presente en el agua puede haber variado y con ello el valor de ORP.

Por último, también se encontraron diferencias entre el agua tratada con el antical y el agua que no llevaba tratamiento, a 25 °C parece ser que la utilización del antical electromagnético hace aumentar el potencial de oxidación-reducción, pero en cuanto aumentamos la temperatura a 35 °C no hay diferencias, y a mayores temperaturas el ORP del agua sin tratar es incluso mayor. Estos resultados a temperaturas elevadas se pueden explicar porque primero se tomaron los datos del agua sin tratar y después de dejar actuar unos minutos al dispositivo se tomaron los datos de ORP del agua tratada, sin embargo, durante ese tiempo la temperatura elevada sigue estando presente y actuando sobre el cloro favoreciendo su eliminación. A 35 °C no se ven diferencias porque no es una temperatura tan elevada como para que se evapore el cloro rápidamente y dispositivo no parece hacer efecto sobre el ORP. Los resultados de ORP obtenido a la temperatura de 25 °C mostraron un valor mayor con el tratamiento antical, se pensó, que el dispositivo electromagnético aumenta el valor del ORP porque vuelve al ambiente más oxidante y por lo tanto aumenta el potencial desinfectante del agua. A pesar de esta primera hipótesis, se decidió llenar un tanque con 50 L de agua de la red de San Vicente y mantenerla en recirculación durante unas horas con el dispositivo conectado, para observar si esta diferencia de ORP entre tratamientos era fortuito o se mantenía en el tiempo, se pueden ver los resultados de este experimento en **Figura 13**.

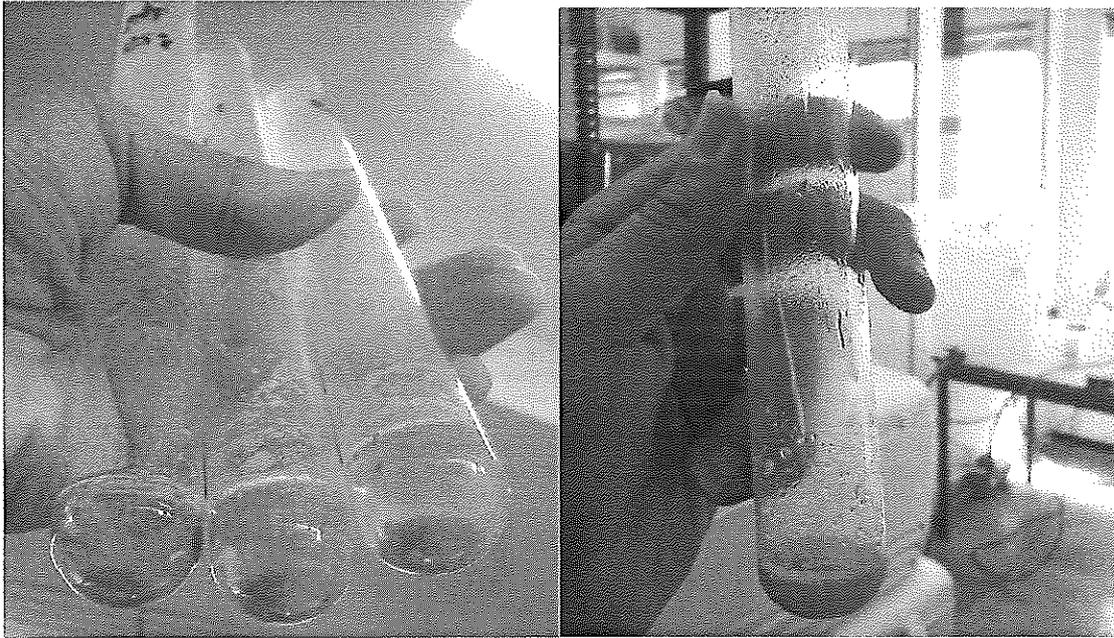


**Figura 13:** Variación del potencial de oxidación-reducción de agua de la red tratada con antical durante el tiempo

Al mantenerlo en recirculación se observa que a la media hora de estar actuando el antical (una hora de recirculación) el valor del ORP ha disminuido y sigue haciéndolo progresivamente durante las horas siguientes, debido al continuo movimiento del agua que facilita la evaporación del cloro. También es interesante comentar que ese día había valores muy elevados de ORP en el agua y que mucha concentración de oxidantes puede interferir en la medida (fuera del rango de calibración).

#### Test de Meigen

Los resultados obtenidos en los test fueron poco satisfactorios. Se obtuvieron resultados similares en todos los casos respecto al color del precipitado, tanto en las muestras sin tratamiento como las que si tenían tratamiento, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas. Aunque se repitió el experimento por si se hubieran cometido errores, se obtuvo el mismo resultado. Se pueden ver varios ejemplos en la **Figura 14**.



**Figura 14:** Resultados del test de Meigen. Izquierda, ejemplo a 25 °C con y sin tratamiento y a 35 °C sin tratamiento. Derecha, otra muestra de 25 °C sin tratamiento

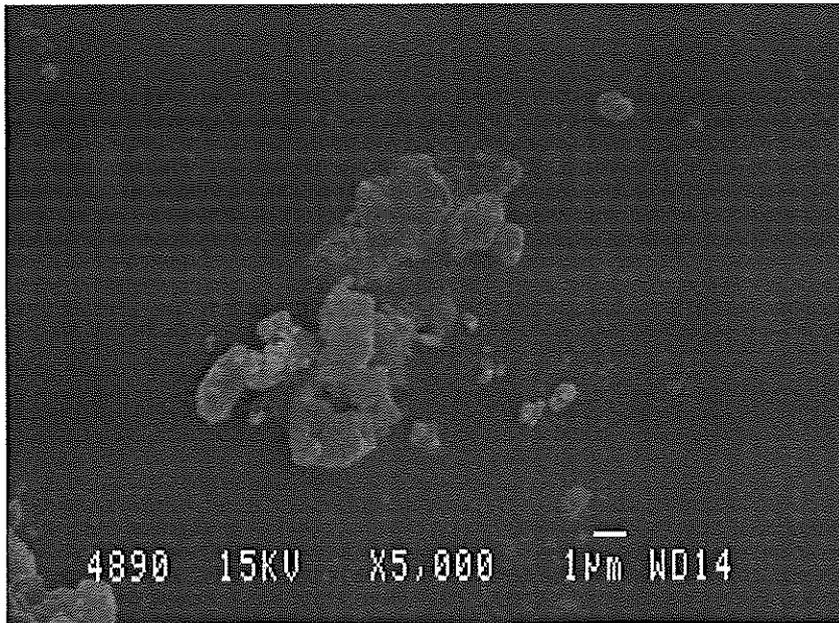
A pesar de que los resultados no son concluyentes en relación a si el dispositivo antical funciona, estas diferencias en el color del precipitado de carbonato cálcico respecto de los resultados esperados se pueden explicar. Verdú (2016), estudió la aplicación del test de Meigen a aguas sintéticas, contempló la posibilidad de que ciertos iones pueden crear interferencias con el test de Meigen, dando lugar a coloraciones distintas. Para estudiarlo realizó varios ensayos de agua destilada con  $\text{CaCO}_3$  puro disuelto con distintos ácidos. También puede ser que el tiempo de secado (largo, más de 48 h) influya en la reconversión del aragonito en calcita.

En el caso del ensayo con ácido clorhídrico sus resultados mostraron una coloración turquesa en el precipitado, tanto en el agua de red tratada con el Antical RF como sin tratar, igual que ocurre en nuestros resultados. Toma esa coloración debido probablemente a que un exceso de cloro en las muestras interfiere en el test formando otros complejos con el cobalto (II), en este caso con el cloro.

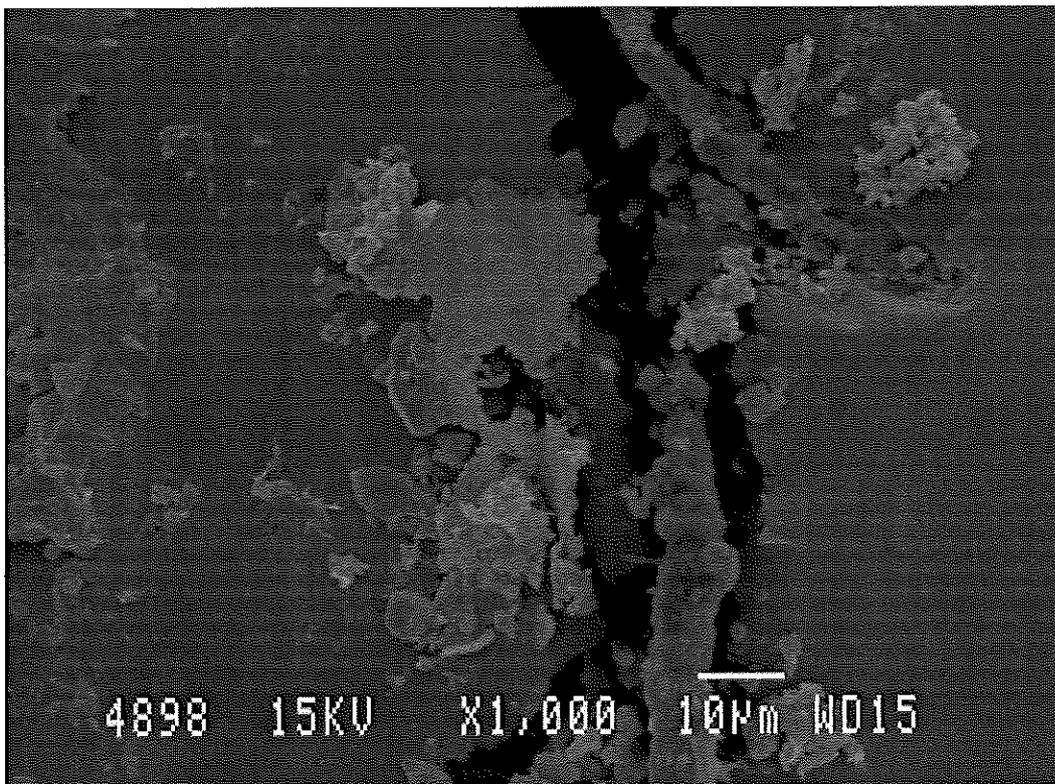
#### Microscopía electrónica de barrido

Los resultados obtenidos en el SEM, fueron muy variables, las muestras sin tratamiento mostraban similitudes en los cristales formados, tomando formas aglomeradas, sin embargo, los cristales aislados que se encontraron eran con certeza de calcita. Podemos ver

algunos ejemplos en la **Figura 15, 16 y 18**, también el detalle de cristales aislados en la **Figura 17**.



**Figura 15:** Aglomeración de cristales de calcita a 25 °C (sin tratamiento)



**Figura 16:** Aglomeración de cristales de calcita a 35 °C (sin tratamiento)

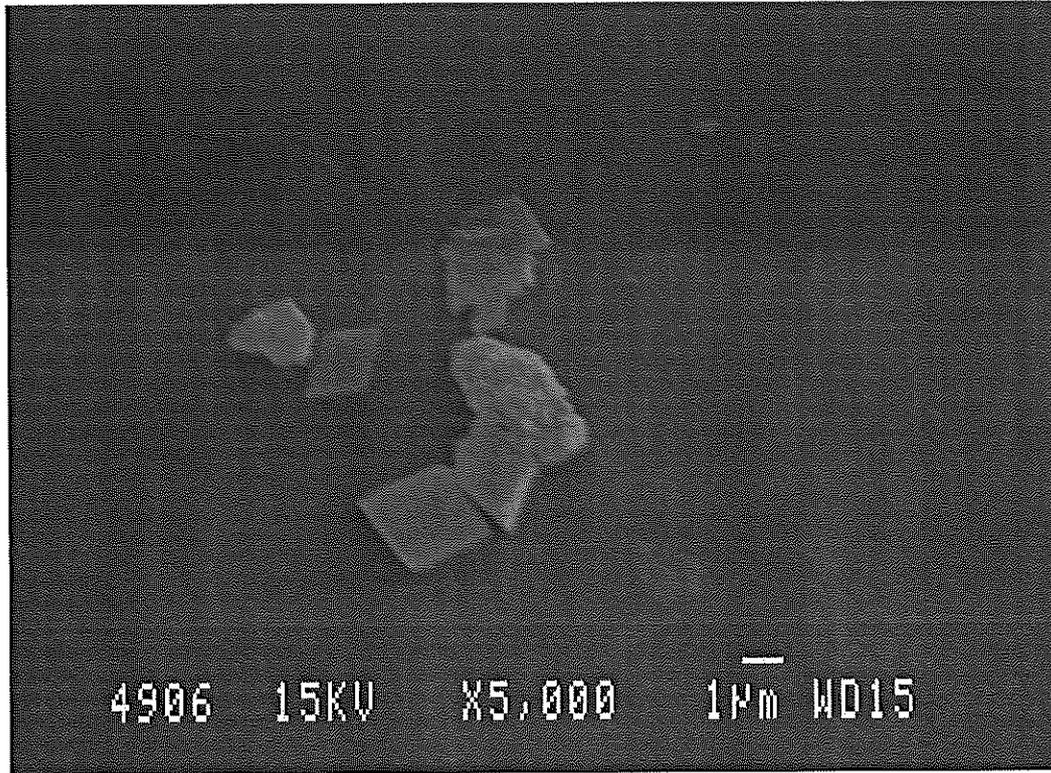


Figura 17: Detalle de cristal de calcita (sin tratamiento 45 °C)

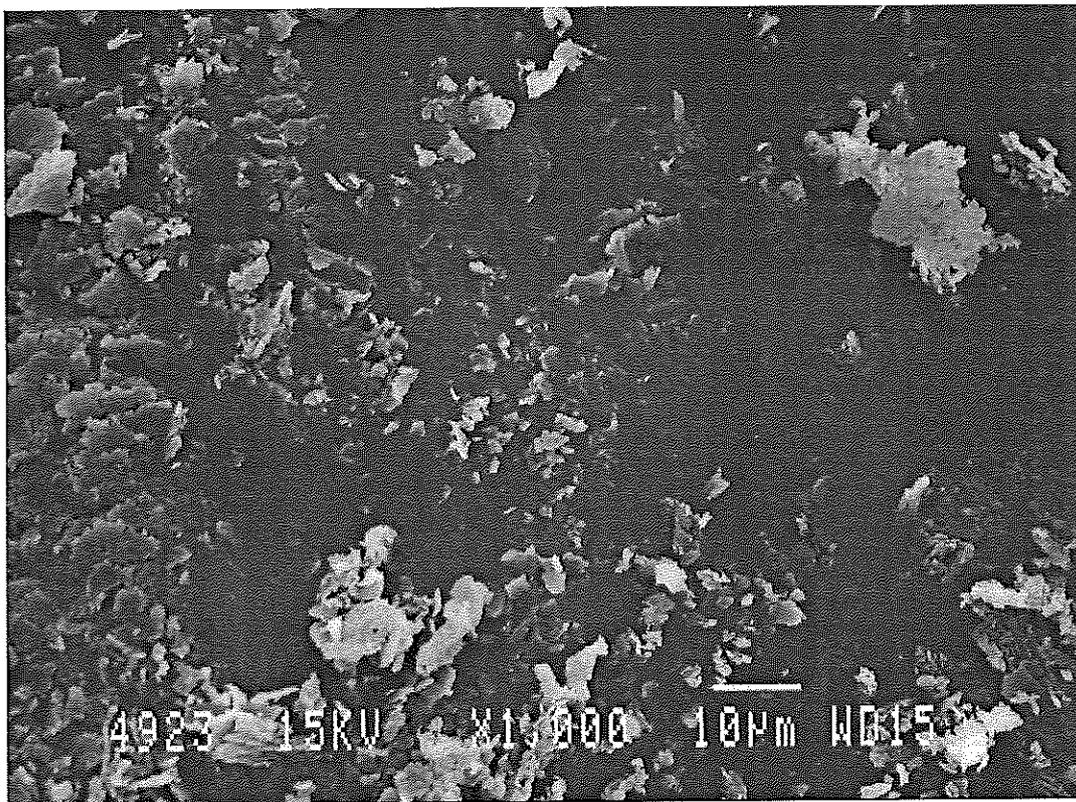
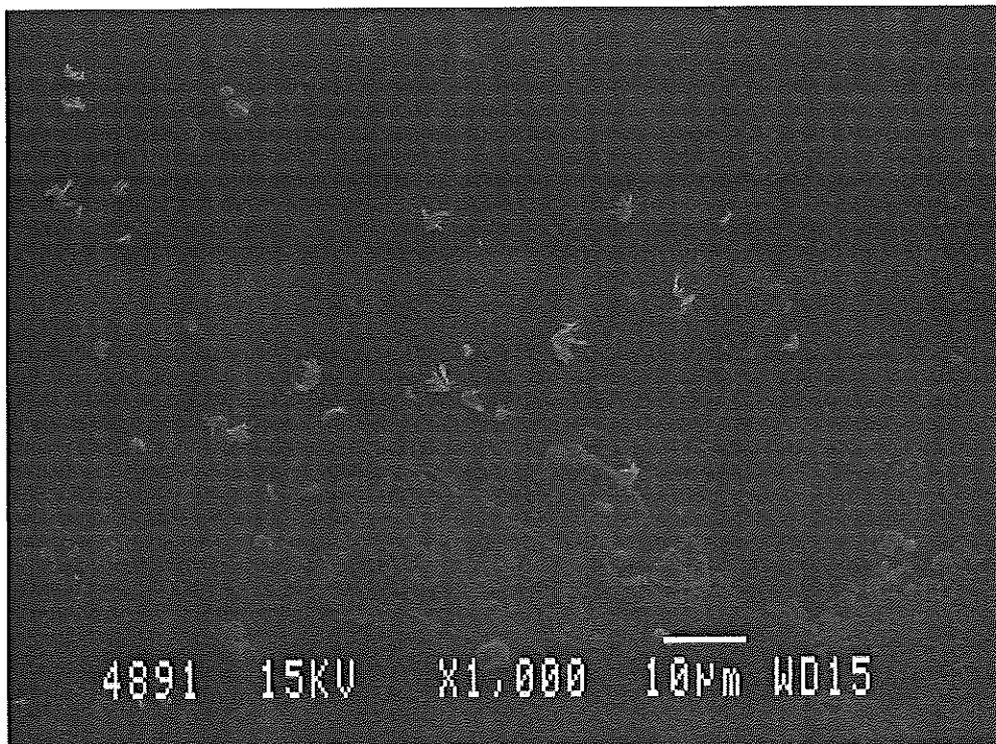
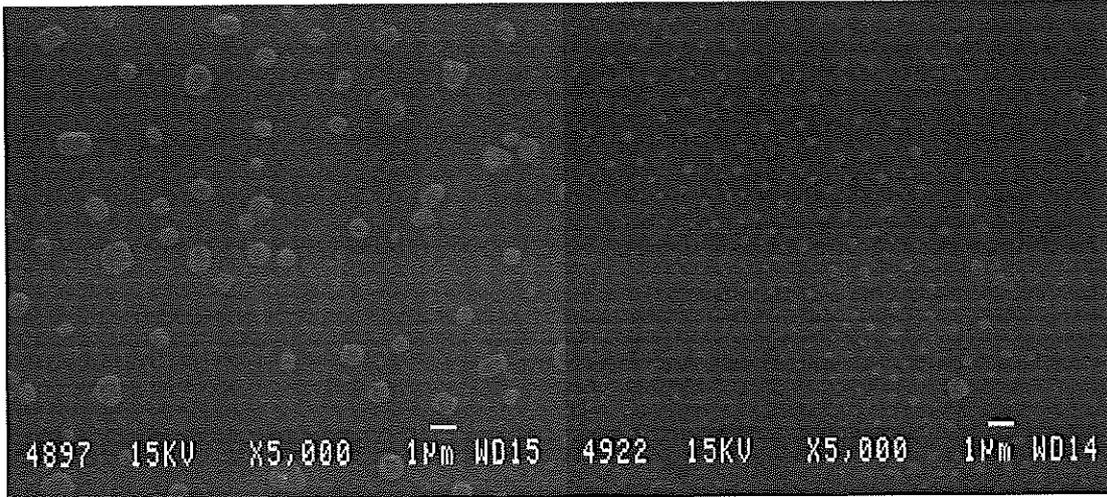


Figura 18: Cristales de calcita 65 °C (sin tratamiento)

En las fotografías correspondientes a las muestras tratadas con el Antical RF Plus se formaron cristales con figuras muy diversas, algunos tienen estructuras estrelladas y otros redondeadas, pero no se supo reconocer cuales pudieran ser de aragonito o si se trataba de otras sales, debido a que no se encontraron similitudes con la bibliografía consultada (Verdú, 2016), puede ser que dependiendo del tiempo de magnetización (mayor o menor caudal influye en el tiempo de exposición al tratamiento) o la velocidad de crecimiento del cristal (rápida o más lenta), influya en la forma que toman los cristales al crecer. Otro factor que puede influir en la formación del aragonito es la frecuencia y voltaje del campo electromagnético que se aplica, se pueden obtener diferentes resultados dependiendo si se usa alta o baja frecuencia o mayor o menor voltaje que el empleado. Algunas de las formas encontradas se pueden ver en las siguientes fotografías (Figura 19 y 20).

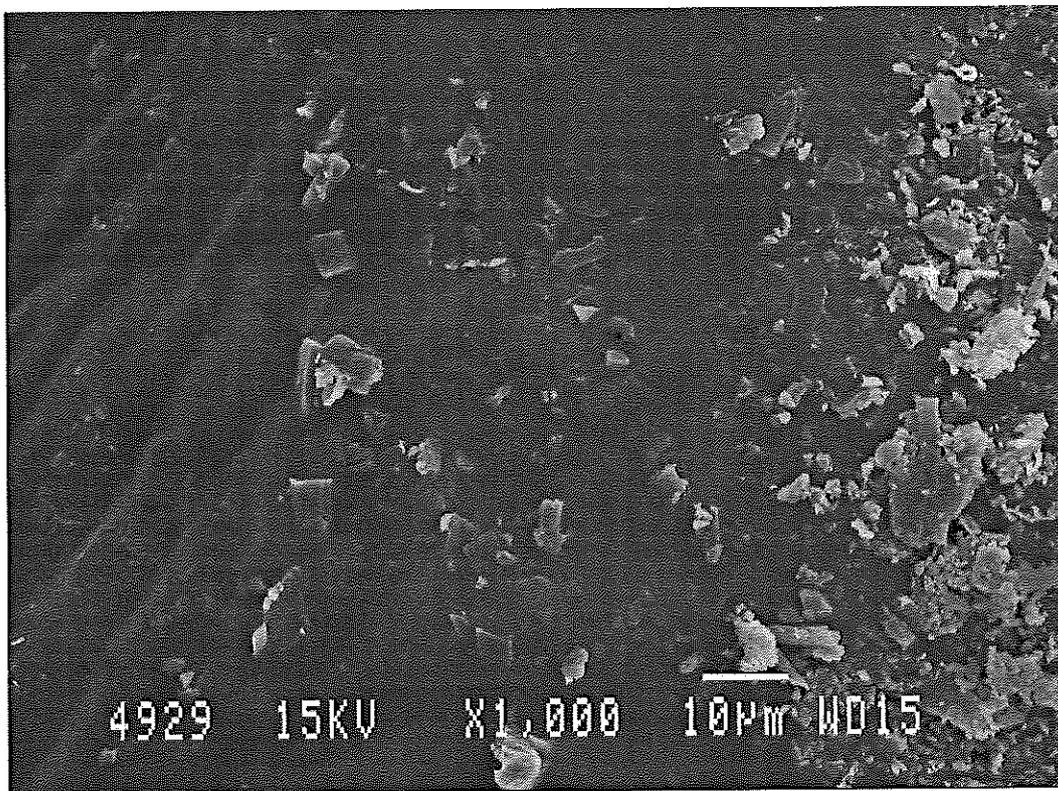


**Figura 19:** Cristales obtenidos a 25 °C con el tratamiento antical



**Figura 20:** Cristales obtenido a 35 °C y 55 °C con el tratamiento antical

A la temperatura de 65 °C, los resultados que se obtuvieron fueron muy similares a los de las muestras sin tratamiento (**Figura 21**), lo que nos hace suponer que el dispositivo no funciona tan eficientemente a esta temperatura y más elevadas, como se ha visto en trabajos similares en los que a la temperatura de 75 °C se observaba una mezcla de cristales de calcita y aragonito (Verdú, 2016).



**Figura 21:** Cristales de calcita en la muestra con tratamiento antical a 65 °C

## 4.2. Crecimiento de bacterias

Los resultados que se obtuvieron del cultivo de bacterias en placa esta resumido en la **Tabla 6**. Están separados por cada tipo de bacteria, por la temperatura a la que se trabajó y por tipo de tratamiento (sin tratamiento, ST; con Antical RF Plus, RF). También se calculó el porcentaje de reducción que se consiguió utilizando este dispositivo.

**Tabla 6:** Conteo de colonias diferenciadas por tratamientos en el agua de estanque

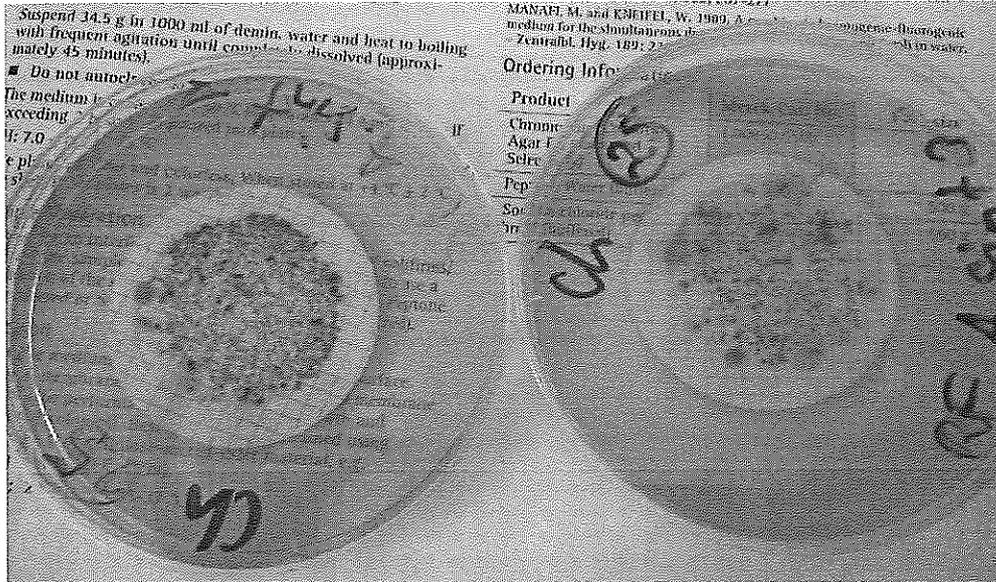
Temperatura de tratamiento	Bacteria	CFU/100.ml.						% de reducción medio
		M1		M2		M3		
		ST	RF	ST	RF	ST	RF	
25°C	<i>Citrobacter freundii</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-
	<i>Escherichia coli</i>	22	18	21	16	20	7	35
	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	5	19	8	15	10	54
35°C	<i>Citrobacter freundii</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-
	<i>Escherichia coli</i>	20	19	22	8	23	18	31
	<i>Enterococcus faecalis</i>	59	20	90	21	55	15	73
45°C	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	-
	<i>Escherichia coli</i>	4	1	1	1	1	3	17
	<i>Enterococcus faecalis</i>	11	1	8	1	4	3	78
55°C	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	-
	<i>Escherichia coli</i>	1	0	1	0	1	0	100
	<i>Enterococcus faecalis</i>	88	15	110	40	70	25	70
65°C	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	-
	<i>Escherichia coli</i>	3	1	4	2	2	0	67
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	-

En términos generales podemos observar que la temperatura y el tiempo al que los microorganismos están expuestos a una determinada temperatura pueden influir en el crecimiento de las colonias en los medios de cultivo, puesto que cada bacteria tiene una temperatura óptima de crecimiento y temperaturas límite que soportan, esto se explica más detalladamente en los siguientes párrafos.

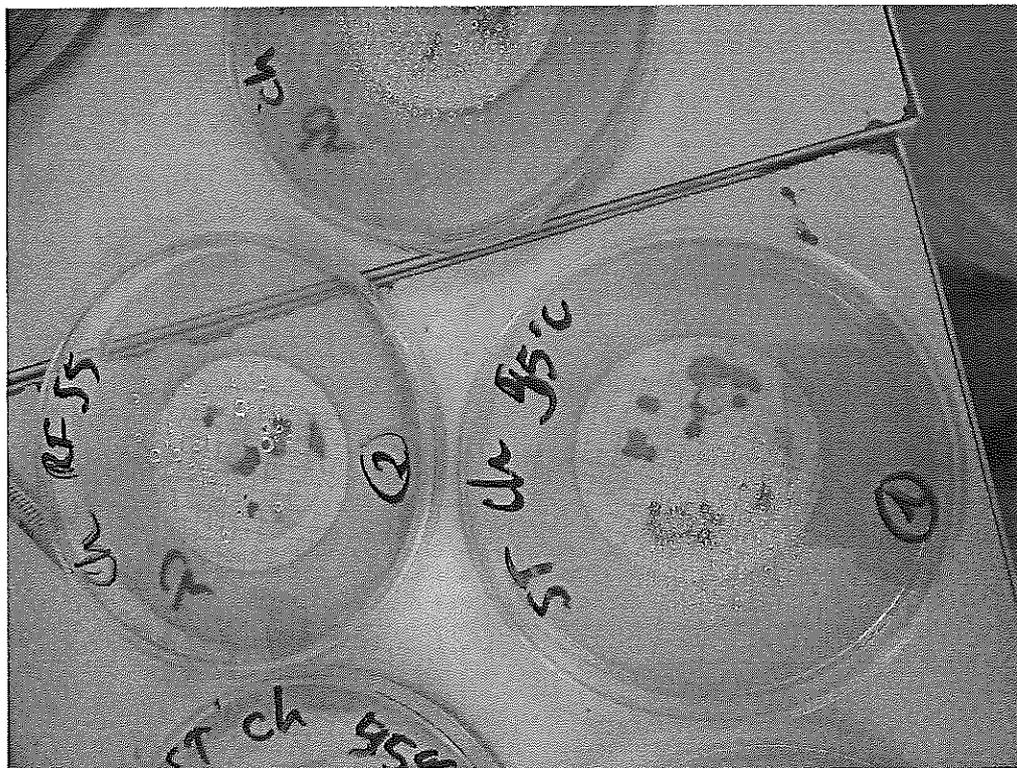
En las placas del medio Chromocult Coliform Agar se pueden observar (**Figura 22**) que la mayoría de colonias coloreadas corresponden a *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli*. En el caso *C. freundii*, las bacterias formaban colonias de pequeño diámetro (menores que las colonias de *E. coli*) de tonos rosáceos mezcladas con colonias incoloras. Se observaron un gran número de colonias de esta especie en ambos tratamientos, sin embargo, en conjunto había más cantidad en las placas de ST (sin tratamiento) que en las de RF (tratamiento antical), además en las placas con tratamiento antical también eran colonias de menor tamaño. Estas diferencias las podemos observar en la **Figura 22**.

A partir de los 45 °C prácticamente desaparecieron de las placas estas bacterias y fueron sustituidas por otro grupo sin coloración, o coloreadas, pero de formas distintas (amorfas,

asimétricas) como se ve en la **Figura 23**, podemos suponer que este otro tipo de bacterias con colonias incoloras que han crecido son de la especie *Salmonella enteritidis* (ANEXO 2).



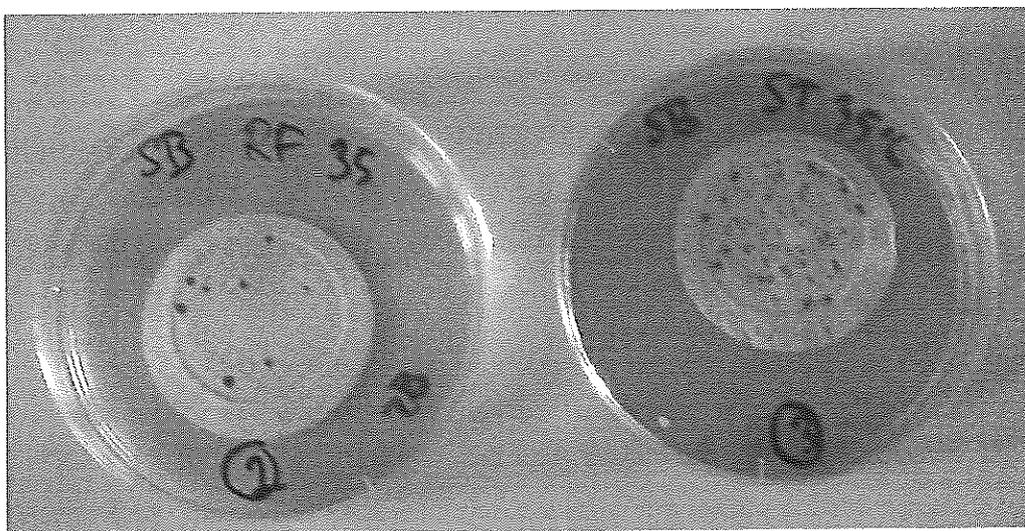
**Figura 22:** Placas de cultivo de coliformes, izquierda sin tratamiento y derecha con tratamiento Antical



**Figura 23:** Cultivos de Chromocult Coliform Agar con (RF) y sin tratamiento (ST) a 55 °C

Para la bacteria *Escherichia coli* el crecimiento de colonias se observa mucho mayor en la temperatura de 25 °C y 35 °C respecto de las temperaturas más altas donde prácticamente no crecían, por ello el porcentaje de reducción gracias al dispositivo antical es muy variable como se veía en la tabla anterior (**Tabla 6**). Aunque la temperatura óptima de crecimiento para *E.coli* es de 37 °C, la bacteria puede proliferar en temperaturas comprendidas entre 7 °C y 50 °C (OMS, 2016), pero son termorresistentes, en nuestro caso incluso aparecían cepas a 65 °C. En la **Figura 22** se puede ver que los puntitos azulados corresponden a las colonias de esta bacteria.

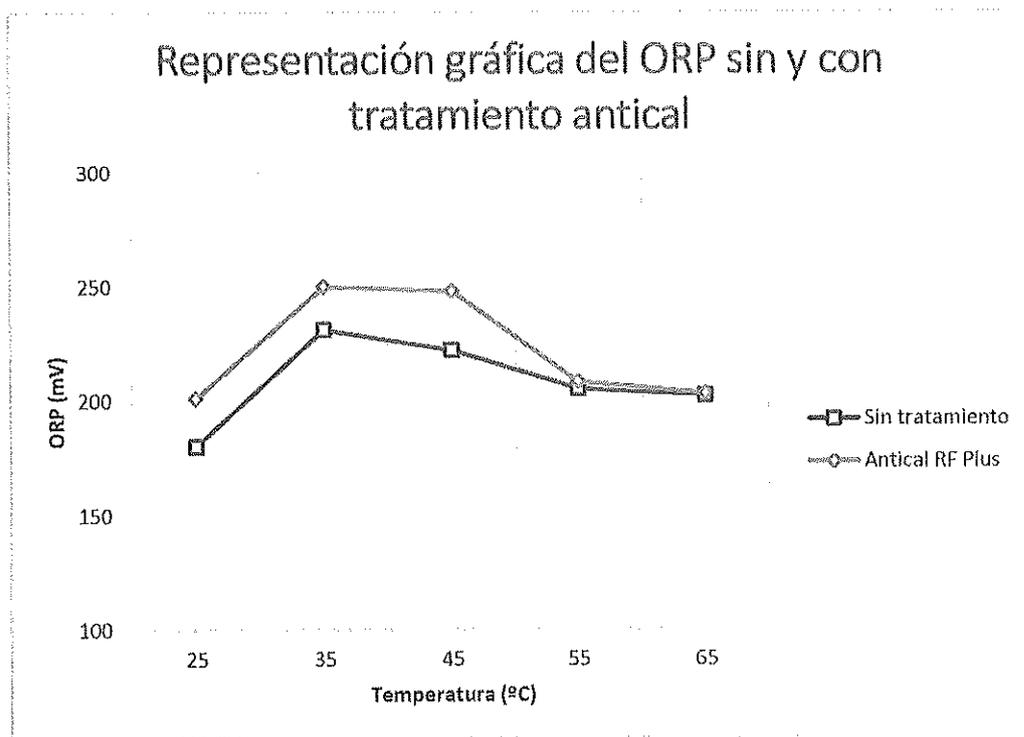
En el caso del otro medio de cultivo selectivo, membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley, la especie predominante es *Enterococcus faecalis* (Merck, 2000). El género enterococos crece generalmente crece muy bien en temperaturas comprendidas entre 10 °C y 45 °C, un producto contaminado con enterococos conservado a estas temperaturas puede contener cifras muy altas de estos microorganismos. El medio se puede incubar a 42 °C - 45 °C para hacer el medio más selectivo (Díaz Pérez *et al.*, 2010). En los resultados obtenidos, se observa que solo el efecto del antical tiene poder desinfectante suficiente para inhibir el crecimiento de más de la mitad de estas bacterias. En el caso de 65 °C la temperatura elevada parece ser que tuvo suficiente poder bactericida como para eliminar o inactivar estas bacterias. El alto número de colonias a la temperatura de 55 °C respecto de la tratada a 45 °C puede ser debido a que parte de estas bacterias sedimentaran en los bidones de recogida y al bombear este agua al tanque de 50 L se resuspendieran y por ello aparezcan más en estas muestras, también puede ser debido a que unos días el agua recogida estuviera más contaminada que otros días. En la **Figura 24** se puede ver un ejemplo de estas incubaciones.



**Figura 24:** Cultivo membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley para enterococos con (RF) y sin tratamiento (ST) a 35 °C

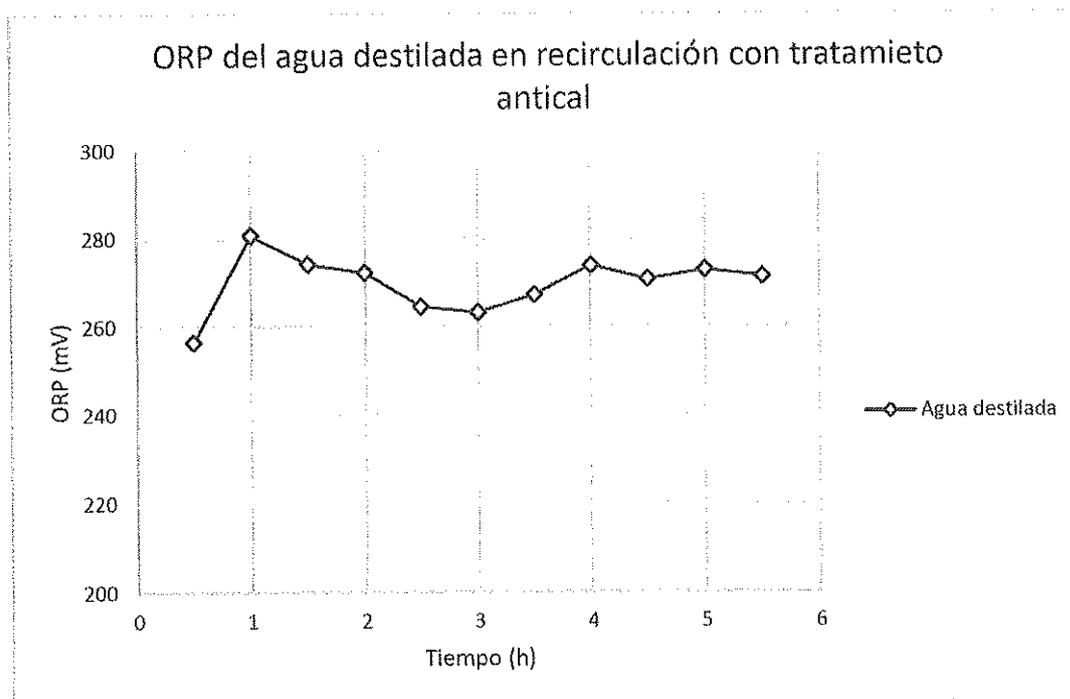
Teniendo en cuenta la información del fabricante del dispositivo empleado, el aparato dependiendo del nivel de energía, la frecuencia y la forma de onda del campo aplicado es capaz de causar un efecto antibacterias. Como se ha podido comprobar en estos experimentos el dispositivo Antical RF Plus ha producido efectivamente un efecto desinfectante. Quimera Biological Systems, empresa colaboradora de Esaltia explica que las formas unicelulares pueden verse afectadas en su proceso de división por la aplicación de campos electromagnéticos y que es posible inhibir el proceso de división celular, evitando una proliferación de bacterias o incluso llegando a matarlas. Sin embargo, advierte que los resultados de prevención / reducción / eliminación de la carga bacteriana presente en el agua pueden ser variables en función del estado inicial del agua a tratar. En nuestro caso se ha experimentado con un agua pobre en oxidantes (ORP bajo), o sea con un poder desinfectante más bien escaso, a pesar de esto el equipo ha sido capaz de reducir en gran medida el crecimiento de estas colonias de bacterias indeseadas.

En el grafico siguiente (**Figura 25**) se puede ver la evolución del valor del ORP a distintas temperaturas para el agua del estanque con y sin tratamiento antical. Y a diferencia de los resultados obtenidos con el agua de red (**Figura 12**) en este caso si se observa que la utilización del antical hace aumentar el poder desinfectante del agua (ORP mayor). Esta diferencia puede ser debida a que en el caso del agua de la red el potencial de oxidación-reducción que aporta el cloro eclipse o esconda el efecto sobre el ORP de este dispositivo. En este agua al no tener prácticamente nada de cloro libre se puede ver ese efecto bactericida traducido como ORP.



**Figura 26:** Comparación del potencial de oxidación-reducción en ambos tratamientos en agua del estanque

Como en el agua de red, en este caso también se quiso observar si este cambio en el ORP del agua al utilizar el dispositivo Antical RF Plus se mantenía en el tiempo cuando estaba en recirculación. Para este experimento se empleó agua destilada en el tanque, que se mantuvo en recirculación durante varias horas. Los resultados del experimento se muestran en la siguiente figura (**Figura 26**).



**Figura 26:** Variación del potencial de oxidación-reducción de agua destilada tratada con anticloro durante el tiempo

Como se puede ver en el gráfico, después de una subida más pronunciada del ORP, se mantenía con altibajos, pero siempre por encima del valor inicial, una media de 271 mV con respecto a los 256 mV cuando la muestra estaba sin tratar.

Es interesante comentar que la Organización Mundial de la Salud en 1971, reconoció en sus normas para agua potable que, a un nivel ORP de 650 mV, el agua se desinfecta y la desactivación viral ocurre casi de forma instantánea. Al contrario del agua de la red de San Vicente, que presentaba valores mucho más elevados de ORP, el agua del estanque no cumple esta norma por lo que no sería apta de ningún modo para beber, ya que puede contener otros organismos infecciosos además de los contemplados. Estos dispositivos podrían servir de apoyo junto con otros sistemas de desinfección (cloro, ozono, etc.) para esterilizar el agua y prevenir cualquier tipo de contaminación, de esta forma siempre se cumpliría el valor del potencial de oxidación-reducción necesario.

## 5. Conclusiones

- A pesar de encontrar bibliografía muy relacionada con este trabajo que informa sobre el buen funcionamiento como antical del dispositivo RF Plus no se han conseguido en este trabajo resultados satisfactorios que verifiquen este efecto sobre el carbonato cálcico.
- Se ha demostrado que el dispositivo antical RF Plus reduce de forma efectiva distintos microorganismos presentes en las aguas, o sea ejerce un efecto bactericida.
- Los dispositivos antical con efecto bactericida se pueden considerar como un sistema de refuerzo ante posibles contaminaciones microbianas del agua, aunque nunca sustitutivo de sistemas actuales de desinfección como el cloro u ozono.

## 6. Continuación de la presente investigación

- Para verificar la ausencia o presencia del aragonito en las muestras sería recomendable para futuras investigaciones añadir un análisis por rayos X de la muestra, además de la observación de los cristales en el SEM.
- También sería interesante hacer análisis de cloro libre para corroborar que disminuye el cloro libre cuando aumenta la temperatura del agua o cuando hay agitación continua.
- Es interesante seguir experimentando en nuevas investigaciones sobre la temperatura y caudal óptimo de funcionamiento del dispositivo, así como ampliar los conocimientos sobre los efectos biológicos que causan las ondas de baja frecuencia electromagnéticas sobre los microorganismos y realizar una búsqueda más completa del tipo de microorganismos patógenos que puede eliminar.
- Para analizar el efecto de los pulsos electromagnéticos sobre las poblaciones de algas es necesario hacer cultivos de especies representativas sobre las que pueda ser evaluado dicho efecto. Este estudio no se incluye en este trabajo fin de master y será objeto de futuras investigaciones.

## 7. Bibliografía y referencias

Al Nasser, W. N., Al Ruwaie, A. H., Hounslow, M. J., and Salman, A. D. (2011). Influence of electronic antifouling on agglomeration of calcium carbonate. *Powder technology*, 206(1), 201-207.

- Ayan, T. (1965). Chemical staining methods used in the identification of carbonate minerals. *Bulletin of the Mineral Research and Exploration*, 65, 133-147.
- Barabas, J., Zabovsky, M., Zabovska, K., Janousek, L., Radil, R., and Malikova, I. (2016). Reduced viability of two prokaryotic organisms treated by low frequency electromagnetic field. In *Radio and Antenna Days of the Indian Ocean (RADIO), 2016 IEEE* (pp. 1-2). IEEE.
- Boletín Oficial del Estado, 2003. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-3596>
- Burriel Martí, F., Lucena Conde, F., Arribas Jimeno, S., y Hernández Méndez, J. (1998). *Química analítica cualitativa*. Ediciones Paraninfo, Madrid, pp 251-253.
- Catli, Y. (2009). *Studying electric field effect on water by analysing the instrument "hydronic"* (Doctoral dissertation, University of Trento, Italy).
- Chang, M. C., and Tai, C. Y. (2010). Effect of the magnetic field on the growth rate of aragonite and the precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Chemical Engineering Journal*, 164(1), 1-9.
- Chen, S. C., Amy, G. L., and Chung, T. S. (2016). Membrane fouling and anti-fouling strategies using RO retentate from a municipal water recycling plant as the feed for osmotic power generation. *Water research*, 88, 144-155.
- Coey, J. M. D., and Cass, S. (2000). Magnetic water treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 209(1), 71-74.
- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Dobersek, D., and Goricanec, D. (2014). An experimentally evaluated magnetic device's efficiency for water-scale reduction on electric heaters. *Energy*, 77, 271-278.
- E.S. CREATIVIDAD, INNOVACIÓN Y DESARROLLO S.L.U. (2017). <http://www.esaltia.com>.
- Engelbrechtsen, K. A., Bager, P., Wohlfahrt, J., Skov, L., Zachariae, C., Andersen, A. M. N., ... and Thyssen, J. P. (2017). Prevalence of atopic dermatitis in infants by domestic water

hardness and season of birth: Cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1568-1574.

Gabrielli, C., Jaouhari, R., Maurin, G., and Keddam, M. (2001). Magnetic water treatment for scale prevention. *Water Research*, 35(13), 3249-3259.

Ghizellaoui, S. and Ghizellaoui, S (2015). Hard Water Softening by Chronoamperometry. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 2347-2352

Ghizellaoui, S., Ghizellaoui, S., and Semineras, H. (2017). Inhibition of scale formation by electrochemical means in the presence of a green inhibitor: citric acid. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 2105-2111.

Ibáñez Mengual, J.A. (2009). *Desalación de aguas. Aspectos tecnológicos, medioambientales, jurídicos y económicos*. Instituto Euromediterráneo del agua, pp 330-348.

Medina San Juan, J.A. (1999). *Desalación de aguas salobres y de mar: osmosis inversa*. Ediciones Mundi-Prensa, pp 232-234.

Menzri, R., Ghizellaoui, S., and Tlili, M. (2017). Calcium carbonate inhibition by green inhibitors: Thiamine and Pyridoxine. *Desalination*, 404, 147-154.

Merck (2000). *Microbiology Manual 12<sup>th</sup> Edition*. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, pp 235-351.

Oxoid (1995). *Manual Oxoid*. UNIPAHT Limited, Hampshire, England, pp 231-232

Pueyo, J. J. (1991). *Génesis de formaciones evaporíticas: modelos andinos e ibéricos (Vol. 2)*. Edicions Universitat Barcelona, pp 74-75.

Quimera Biological Systems (2017). <http://www.anticalkuimera.es>

Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante. <https://ssti.ua.es/es/infraestructuras-de-apoyo/planta-de-tratamiento-de-aguas.html>

Simonič, M., and Urbanč, D. (2017). Alternating magnetic field influence on scaling in pump diffusers. *Journal of Cleaner Production*, 156, 445-450.

Soghomonian, D., Trchounian, K., and Trchounian, A. (2016). Millimeter waves or extremely high frequency electromagnetic fields in the environment: what are their effects on bacteria?. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(11), 4761-4771.

Verdú, D. (2016). *Efecto del electromagnetismo sobre la dureza del agua*. Trabajo de fin de master, Universidad de Alicante, España.

Wang, J., Gao, X., Li, Z., Wang, Y., and Gao, C. (2016). CaCO<sub>3</sub> scaling of oilfield produced water in “electrochemical pre-oxidation–coagulation sedimentation–filtration” process: reason, mechanism, and countermeasure. *Desalination and Water Treatment*, 57(27), 12415-12423.

Wang, T. S., and Tsai, T. F. (2014). Cutaneous irritancy of water. *Reviews on environmental health*, 29(3), 217-220.

Warren, R., Ertel, K. D., Bartolo, R. G., Levine, M. J., Bryant, P. B., and Wong, L. F. (1996). The influence of hard water (calcium) and surfactants on irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 35(6), 337-343.

Weiner, E. R. (2012). *Applications of environmental aquatic chemistry: a practical guide*. CRC press, pp 93-94.

Wilson, P. C. (2010). *Water quality notes: alkalinity and hardness*. Soil and Water Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: SL, 332.

World Health Organization. (1971). *International standards for drinking-water (Third Edition)*. Publications of the World Health Organization, pp 26-27.

World Health Organization (2016). *E. coli*. Notas descriptivas. <http://www.who.int>

## Agradecimientos

A la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana, por la ayuda para cofinanciar el presente proyecto de investigación aplicado a recursos hídricos en la Comunitat Valenciana.

A Miguel Escortell y la empresa Esaltia por los equipos y la ayuda técnica prestada.

Al Instituto Universitario del Agua y las Ciencias Ambientales (IUACA) de la Universidad de Alicante donde se ha realizado la presente investigación.

## Anexos

### Anexo 1: Preparación de los medios de cultivo

Para el cultivo de coliformes y de enterococos primero se prepararon los medios de cultivo selectivos mediante el siguiente procedimiento, siempre siguiendo instrucciones del vendedor (Merck, 2000) y manteniendo las condiciones asépticas en la zona de trabajo para evitar la contaminación con los microorganismos presentes en el medio ambiente.

1. Primero autoclavamos los recipientes y enseres (cucharas, pinzas, varillas) necesarios con agua ultrapura y desionizada (Mili-Q). Fijamos la autoclave 20 minutos a 121°C y 1 bar de presión. También esterilizamos las placas en un equipo de ultravioleta.
2. Dentro de una campana extractora y siempre en condiciones de esterilidad (luz UV), pesamos las cantidades necesarias de cada medio proporcionales al volumen que necesitamos. Según nos indica el fabricante necesitamos disolver 41.5 g en un litro de agua desmineralizada en el caso del medio Membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley y 26.5 g por litro preparado en el caso de Chromocult Coliform Agar.
3. Una vez tenemos autoclavados los recipientes, vaciamos el contenido y llenamos con el volumen de agua que queremos utilizar. Después mezclamos con el medio y calentaremos el agua en un hornillo para mientras agitamos para disolverlo, para ello herviremos el agua. En el caso del medio selectivo para enterococos se debe evitar un calentamiento excesivo (Oxoid, 1995).
4. Cuando este bien disuelto taparemos el matraz con un tapón de algodón y papel de aluminio, esperamos a que se enfríe un poco (45°C-50°C para el medio para coliformes) para verterlo a las placas Petri.
5. A temperatura ambiente empezarán a gelificar, podemos utilizarlas cuando estén totalmente sólidas. Si no se van a utilizar al momento se mantendrán en la nevera (entre 2-8 °C) y protegidas de la luz (Oxoid, 1995), también guardadas en bolsas para prevenirlas de la desecación, tienen que estar hidratadas. Tienen una vida de unos 6 meses bajo estas condiciones.

## Anexo 2: Características de los medios de cultivo utilizados

Información obtenida del manual del fabricante (Merck, 2000).

### **Composición típica de los medios de cultivo**

Chromocult Coliform Agar		Membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley	
Fórmula	g/L	Fórmula	g/L
Peptona	3.0	Triptosa	20.0
Cloruro sódico	5.0	Extracto de levadura	5.0
Dihidrogenofosfato sódico	2.2	D(+)-Glucosa	2.0
Hidrogenofosfato disódico	2.7	Hidrogenofosfato dipotásico	4.0
Triptófano	1.0	Azida sódica	0.4
Piruvato sódico	1.0	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	0.1
Tergitol	0.15	Agar-agar	10.0
Sorbita	1.0		
Agar-agar	10.0		
6-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosido	0.2		
Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido	0.1		
5-bromo-4-cloro-indoxil-beta-D-glucurónico ácido	0.1		

### **Evaluación de las colonias**

Chromocult Coliform Agar.

- E.coli: colonias de color azul oscuro a violáceo.

- *Citrobacter freundii*: colonias de color salmón a rojas
- Coliformes totales: suma de las colonias azul-violeta y salmón-rojo.
- Otras Gram-negativas: algunas como *Salmonella enteritidis* pueden aparecer, en principio no tienen color excepto ciertos organismos que poseen actividad de la  $\beta$ -D-glucoronidasa. Estas colonias aparecerán con un color azul claro a turquesa.

Membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley.

- Enterococos: las colonias presentan un color que va del rosado al rojo o al marrón y con un diámetro de entre 0.5 a 2 mm, sobre todo crece *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus hirae*.
- Otros cocos: en este medio pueden crecer *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, aunque el crecimiento es muy pobre y las colonias son de otro color.