



Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.

## Posgrado

**“Inactivación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* usando radiación ultravioleta de baja presión”**

**Tesis que como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental presenta:**

**Biol. Luis Gerardo Bernadac Villegas**

**Director de tesis: Dra. Ma. Teresa Alarcón Herrera**

**Chihuahua, Chihuahua.**

**Junio de 2013**

## **AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS**

Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. por darme la oportunidad de desarrollar una meta mas en mi vida.

A la Dra. Ma. Teresa Alarcón Herrera por su valiosa dirección, apoyo, amistad pero sobre todo paciencia durante la elaboración de este trabajo.

Jesús Jiménez Nava de la facultad de Ciencias Químicas de la UACH por su apoyo en la enseñanza para la determinación de los parásitos. Dra. Guadalupe Virginia Nevárez por las facilidades brindadas para el uso de su laboratorio. Alejandro Benavides por su ayuda tanto en el laboratorio de calidad de agua como en los muestreos realizados.

A CONACyT por el apoyo económico y FoMix por el financiamiento de este proyecto.

También extiendo mi agradecimiento a todos mis compañeros y amigos que de alguna u otra manera colaboraron para llevar acabo este trabajo.

Muy especial reconocimiento a toda mi familia por todo su apoyo incondicional para concluir esta etapa de mi vida.

## CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>I. INTRODUCCION.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2.1. Problemática relacionada con los patógenos presentes en el agua.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2.2. Descripción de los parasitos <i>Cryptosporidium</i> sp y <i>Giardia</i> sp.....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.2.1. Ciclo de vida. ....  | 8         |
| <b>2.3. Epidemiología y sintomatología.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2.4. Metodologías clásicas para la desinfección del agua. ....</b>   | <b>10</b> |
| 2.4.1. Procesos químicos de desinfección. ....  | 11        |
| 2.4.2. Procesos físicos de desinfección.....  | 15        |
| <b>2.5. Desinfección solar (SODIS). ....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2.6. Estimación de la dosis de radiación UV requerida para la inactivación de los microorganismos. ....</b>  | <b>18</b> |
| <b>III. OBJETIVO GENERAL.....</b>   | <b>20</b> |
| 3.1. Objetivos particulares.....  | 20        |
| <b>IV. HIPOTESIS .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>V. METODOLOGIA.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>5.1. Implementación de técnicas analíticas para la determinación y pruebas de viabilidad de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> en muestras de agua. ....</b> | <b>22</b> |
| 5.1.1. Inmunoseparación magnética.....  | 22        |
| 5.1.2. Tinción inmunofluorescente.....  | 22        |
| <b>5.2. Observación Microscópica.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>5.3. Pruebas de viabilidad de quistes y ooquistes de los parásitos. ....</b>   | <b>23</b> |
| <b>5.4. Determinación de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> en diferentes ubicaciones de la Ciudad de Chihuahua.....</b>  | <b>24</b> |
| 5.4.1. Sitios de muestreo seleccionados. ....   | 25        |
| 5.4.2. Colección de las muestras de agua.....   | 26        |
| 5.4.3. Filtrado de las muestras de agua. ....   | 27        |
| <b>5.5. Sistema de desinfección con irradiación de luz UV artificial en lámparas de baja presión para inducir la inactivación. ....</b>   | <b>28</b> |
| 5.5.1. Pruebas de inactivación de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> mediante luz UV. ....  | 29        |
| 5.5.2. Cinética de inactivación de los microorganismos.....   | 30        |
| 5.5.3. Condiciones generales del equipo utilizado para la inactivación de los microorganismos. ....   | 30        |
| <b>5.6. Análisis estadístico del diseño experimental. ....</b>  | <b>31</b> |
| <b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>6.1. Determinación de la presencia de y análisis de viabilidad de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i>.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>6.2. Desinfección mediante lámparas de baja presión para la inactivación de parásitos y coliformes. ....</b>   | <b>35</b> |
| 6.2.1. Inactivación de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....  | 35        |
| 6.2.2. Inactivación de <i>Giardia lamblia</i> .....   | 37        |
| 6.2.3. Coliformes totales y fecales.....  | 38        |
| <b>6.3. Respuesta de los microorganismos a dosis de radiación UV. ....</b>  | <b>39</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>   | <b>42</b> |

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>IX. BIBLIOGRAFIA .....</b> | <b>43</b> |
| <b>X. ANEXOS .....</b>        | <b>50</b> |

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Volúmenes de agua concesionados para diferentes usos.
- Figura 2. Mortalidad por enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años por entidad federativa
- Figura 3. Micrografía optica, a) Ooquiste de *Cryptosporidium parvum*, b) Quiste *Giardia lamblia*.
- Figura 4. Ciclos de vida a) *Cryptosporidium*, b) *Giardia*
- Figura 5. Practica del método de desinfección solar.
- Figura 6. a) Microscopio de Fluorescencia, b) Imagen de ooquiste y quiste en fluorescencia.
- Figura 7. Sitios en donde se ubico el muestreo de agua de la ciudad de Chihuahua.
- Figura 8. Equipo utilizado para la recolección de las muestras.
- Figura 9. Filtrado de muestra a analizar.
- Figura 10. Concentrador con luz ultravioleta.
- Figura 11. Diagrama del equipo experimental usado para desinfección de *Cryptosporidium* y *Giardia* por luz UV.
- Figura 12. Ooquistes de *Cryptosporidium*, a) célula viable, b) célula no viable
- Figura 13. Análisis  $\chi^2$  para viabilidad de oopuistes de *Cryptosporidium parvum*.
- Figura 14. Micrografía de microscopio electrónico de *Cryptosporidium parvum*, escala de 1 $\mu$ . (a) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y tiempo = 0 h; (b) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y tiempo = 10 h; (c) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y exposición a UV 10 h; (d) Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* después de 10 h de exposición.
- Figura 15. Análisis  $\chi^2$  para viabilidad de oopuistes de *Cryptosporidium parvum*.
- Figura 16. Comportamiento de coliformes a la exposición de radiación UV.
- Figura 17. Temperatura del agua dentro de las botellas en o sin concentrador solar.

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Efecto bactericida y remanente de algunos tratamientos del agua.
- Tabla 2. Proporciones para determinar viabilidad.
- Tabla 3. Formato para conteo de parásitos tanto de *Cryptosporidium* como *Giardia* en cada tiempo de exposición.
- Tabla 4. Formato para conteo de viabilidad.
- Tabla 5. Resultados de análisis de tratamientos para *Cryptosporidium*.
- Tabla 6. Resultados de análisis de tratamientos para *Giardia*.
- Tabla 7. Efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en diferentes tiempos de exposición.
- Tabla 8. Efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de *Giardia lamblia* en diferentes tiempos de exposición.

## RESUMEN

*Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* son protozoarios parásitos causantes de enfermedades diarreicas en el hombre y su acción es mas severa en niños, adultos mayores y personas inmuno-comprometidas. Se han reportado brotes epidémicos en diversas regiones del mundo siendo el agua el principal vehiculo de transmisión de los quistes y ooquistes los cuales son resistentes a procedimientos comunes de potabilización y a concentraciones de hasta 80 mg/L de cloro. El objetivo fue determinar la influencia de la radiación ultravioleta en la inactivación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua. La metodología se dividió en 3 aspectos fundamentales: 1. Determinación de la presencia – ausencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* (Protocolo 1622 de la EPA), 2. Desarrollo de pruebas de viabilidad a los microorganismos (Tincion con Yoduro de Propidio), y 3. Determinación de la dosis de UV requerida para la inactivación de los parásitos (Diseño Experimental). Se observo que la viabilidad de *Cryptosporidium* y *Giardia* disminuye significativamente a partir de las 8 h de exposición a la radiación UV de lámparas de baja presión requiriendo una dosis puntual de 250 mWs/cm<sup>2</sup> bajo las condiciones del experimento. El Yoduro de Propidio fue el más adecuado para desarrollar las pruebas de viabilidad, el cual se aplico durante la etapa de Tinción Inmunofluorescente.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, *Giardia*, ooquiste, propidio, viabilidad

## I. INTRODUCCION

El agua es el compuesto químico más abundante del planeta y resulta ser indispensable para el desarrollo de toda vida. Es un recurso renovable, sin embargo debido a las actividades que ha realizado el hombre a lo largo del tiempo, este recurso se ha venido deteriorando. Se entiende como agua potable a toda fuente capaz de ser consumida por el ser humano además de ser utilizada para los diferentes usos domésticos así como su higiene personal (WHO, 2002).

El buen abastecimiento de este recurso es crucial para la salud pública (McLoughlin et al, 2004). Su uso y consumo con la calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales y otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas (NOM-127-SSA1).

Además de esto el agua representa una de las mayores fuentes de transmisión de enfermedades en el mundo, particularmente en áreas donde el saneamiento del agua no está disponible o es inadecuado (Salih, 2002). Se estima que la salud de más de 1200 millones de personas en el mundo se ve afectada por la contaminación del agua (Gelover et al, 2006). Según las Naciones Unidas anualmente se reportan 4 370 millones de casos de diarrea (Gleick, 2004). El 60% de la mortalidad infantil se debe principalmente a enfermedades infecciosas de tipo parasitarias, la mayoría de las cuales tiene relación con el consumo de agua, las cuales pueden ser prevenidas con la previa desinfección del agua (PAHO, 1999).

A nivel mundial el 17% de la población (1100 millones de personas aproximadamente) no cuentan con acceso a agua potable para satisfacer sus necesidades cotidianas, la mayoría de las cuales habitan en regiones desfavorables del planeta, principalmente localizados en países del continente Asiático (principalmente China e India) y Africano (regiones subsaharianas) (CNA, 2007). Este porcentaje se prevé que se duplique para el 2015 (Gleick, 2004). Dicho esto se estima que más de un tercio de la población de países en vías de desarrollo no cuenta con agua potable, debido principalmente a la

escasa viabilidad de procesos de purificación y saneamiento (Wegelin et al, 1994).

En América Latina y el Caribe, el 43% de la población rural no cuenta con acceso al abastecimiento de agua con una calidad apropiada para el consumo humano así como sus actividades domésticas e higiene personal (Mora, 1996). En nuestro país alrededor del 76.8% del agua con la que se cuenta es utilizada para uso agrícola y ganadero, el 13.9% es disponible para uso público, mientras que el 9.2% restante es utilizado por el sector industrial de nuestro país (Figura 1). Se estima que en el país el 89.2% de la población tiene acceso al uso de agua potable y el 86.0% cuenta con los servicios de alcantarillado público. En cuanto a desinfección se refiere en el 2006 el 96% del agua suministrada a nivel nacional contó con un proceso de desinfección previo (CNA, 2004).

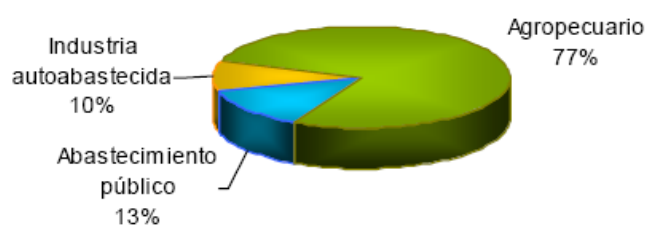


Figura 1. Volúmenes de agua concesionados para los diferentes usos, (CNA 2004).

Para el estado de Chihuahua, la disponibilidad del agua en sus bastas regiones áridas y semiáridas es limitada tanto en cantidad como en calidad, condicionando la actividad económica y la vida misma de la región. Esta problemática se ha agudizado con el paso de los años y el prolongado periodo de sequía que prevalece en el territorio estatal (Figura 2).

En lo que se refiere a la cobertura actual de los servicios básicos, el 93.1% de la población dispone de agua entubada, el 84.3% de drenaje mientras que solo el 42% cuenta con los servicios de saneamiento (JCAS, 2007).



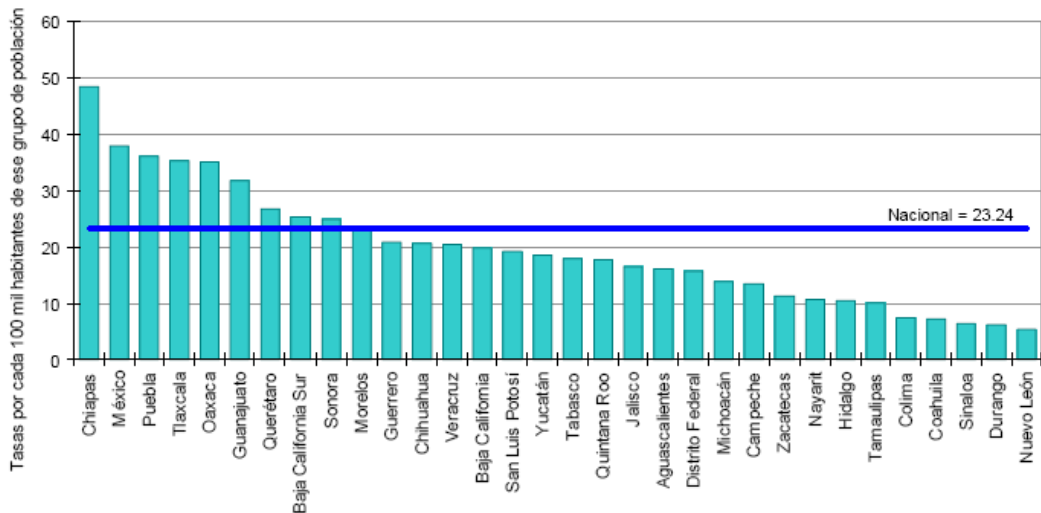


Figura 2. Mortalidad por enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años por entidad federativa (CNA, 2004).

La criptosporidiosis es una enfermedad diarreica que afecta al hombre en especial a grupos de personas susceptibles como lo son niños menores de 5 años, gente de edad mayor y a inmunodepresivos (Mendez-Hermida et al, 2007). La capacidad de de supervivencia del ooquiste de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* en el ambiente por periodos prolongados de tiempo hacen de este parasito un serio problema a nivel global para la seguridad del agua de consumo humano (McGuigan et al, 2006). En las últimas décadas *Cryptosporidium parvum* se ha reconocido como agente causal de parasitosis intestinal en el hombre, con intervalos de prevalencia entre 1 y 5% en países desarrollados y mayores a 10% en países en vías de desarrollo; se estima que en México 2.3% de los niños mayores de tres años sufren criptosporidiosis (Casemore, 1990).

La Giardiasis es una enfermedad parasitaria causada por *Giardia lamblia*, la cual al igual que *Cryptosporidium* es considerada un riesgo a la salud publica debido a que los quistes de este parasito son muy persistentes en fuentes de agua potable y agua residual y a su vez no siempre suelen ser removidos por tratamientos físico-químicos y son relativamente resistentes a la desinfección química (Linden et. al, 2002).

Es por esto que últimamente se ha ido incrementando el interés en el desarrollo de nuevos procesos de desinfección del agua, ya que el uso de cloro ha llevado a la producción de procesos aun más tóxicos de desinfección,

además de que en el caso específico de *Cryptosporidium* y *Giardia* llegan a tolerar hasta 72 h en cloro sin causarles daño alguno (Bull, Kopfler, 1991).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Problemática relacionada con los patógenos presentes en el agua.

La mayor parte de los contaminantes microbianos, responsables por los brotes de enfermedades en el agua potable a través del mundo, se han identificado como patógenos para el ser humano por varias décadas e incluyen virus, bacterias, y protozoos. Los patógenos que se propagan a través del agua son típicamente difundidos a través de la vía fecal-oral, lo cual quiere decir que el agua es contaminada por desechos humanos o animales y posteriormente es ingerida por otro ser humano. Otras fuentes comunes de contaminación del agua son el tratamiento ineficiente del agua o en los sistemas de distribución. Una vez que se encuentran en el medio ambiente, los patógenos microbianos pueden sobrevivir durante semanas o meses, y son capaces de poner bajo riesgo a grandes poblaciones de individuos susceptibles (Reynolds, 2001).

### 2.2. Descripción de los parásitos *Cryptosporidium* sp y *Giardia* sp.

Los organismos pertenecientes al género *Cryptosporidium* son protozoos parásitos intracelulares obligados del phylum Apicomplexa. Desde que el género fue descrito por Tyzzer (1907) más de 20 especies del género *Cryptosporidium* fueron descritas en varios mamíferos hospedadores, pero actualmente sólo diez especies son consideradas válidas de *Cryptosporidium* para la mayoría de los investigadores (Fayer et al., 2000). *Cryptosporidium parvum* es la especie considerada como responsable de criptosporidiosis en la mayoría de los mamíferos incluidos el hombre (Figura 3a).

*Giardia lamblia* presenta dos formas morfológicas: el trofozoito o forma móvil y el quiste, una forma mas pequeña resistente a condiciones medio ambientales adversas (Figura 3b). La forma móvil se encuentra en las paredes del tubo digestivo mientras que el quiste es expulsado en la materia fecal trasladándose así al medio ambiente (Gassman et. al, 1991).

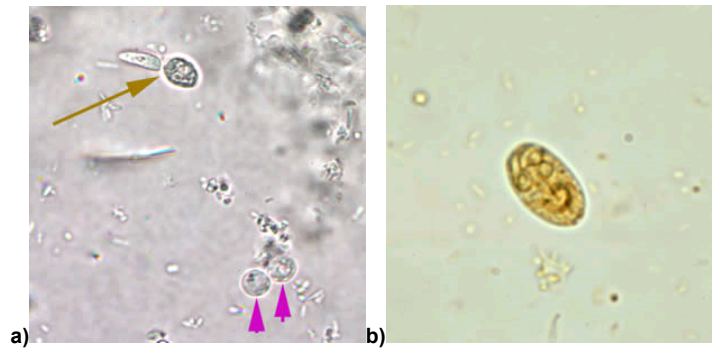


Figura 3. Micrografía óptica, a) Ooquiste de *Cryptosporidium parvum*, b) Quiste *Giardia lamblia* (CDC, 2009).

### 2.2.1. Ciclo de vida.

*Cryptosporidium parvum* completa su ciclo de vida en el huésped (monoxeno). Las posibles rutas de transmisión es fecal-oral, persona-persona y animal-persona debido a la ingestión de agua o comida contaminada. La persona o animal parasitado arroja ooquistes al exterior en sus heces; su ingestión por algún huésped potencial origina infección. Cuando llegan los ooquistes al tracto gastrointestinal se liberan los esporozoitos que parasitan las células epiteliales; el desarrollo de diferentes estadios del parásito ocurren intracelularmente. Del esporozoito se diferencia el trofozoito. Los trofozoitos se multiplican asexualmente y causan merontes Tipo I (6-8 núcleos) y merontes Tipo II (4 núcleos). El primero produce de 6 a 8 merozoitos que generan autoinfección y el segundo, sólo 4 merozoitos que invaden nuevas células epiteliales y se transforman en microgametos y macrogametos; se fusionan y crean un cigoto. En el cigoto se producen esporozoitos potencialmente infectivos para constituir el ooquiste. Los ooquistes son liberados vía heces, cada generación de parásitos se desarrollan y maduran en un periodo de 12 a 24 horas (Figura 4a) (Sanchez, 2002).

Los quistes de *Giardia lamblia* son formas resistentes del parásito las cuales se encuentran en las heces de los organismos infectados. Los quistes pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección ocurre mediante la ingestión del quiste que se encuentra en agua o alimentos contaminados o por vía fecal-oral. Ya ingerido pasa por la parte alta del tubo digestivo el cual la pared quística se reblandece por los jugos gástricos del estómago. Posteriormente en el duodeno se rompe dicha pared dando origen a trofozoitos tetranucleados, estos se multiplican y dan origen a dos trofozoitos binucleados.

Los trozofitos se multiplican por fisión binaria longitudinal donde se pueden enquistar mientras son arrastrados por el tracto digestivo. Hay ocasiones en donde el parásito es liberado en su forma móvil debido a que no alcanza el proceso de enquistación y una vez fuera se desintegra por que no tiene las condiciones necesarias para soportar el medio ambiente exterior (Figura 4b) (Domenech, 2003)

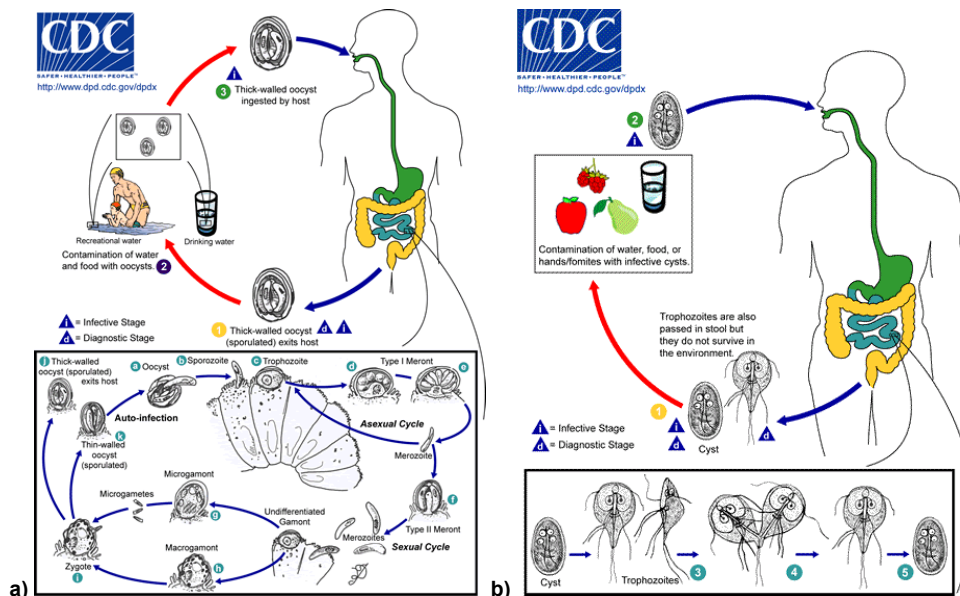


Figura 4. Ciclos de vida a) *Cryptosporidium*, b) *Giardia* (CDC, 2009).

### 2.3. Epidemiología y sintomatología.

La Criptosporidiosis es un proceso diarreico agudo autolimitado en individuos inmunocompetentes con una duración aproximada de dos semanas y una patología crónica en pacientes inmunodeprimidos, no autolimitada y con diseminación del parásito a localizaciones extraintestinales (Ma et al,1983).

Este parásito puede causar infecciones intestinales tanto en humanos como en animales y no requiere de huéspedes intermediarios. Se multiplica en el intestino delgado y origina serios problemas en los mecanismos de absorción. También se considera el parásito más importante en la industria del agua porque se le relaciona como agente etiológico responsable de un número importante de epidemias en diversas partes del mundo. La epidemia mas grande documentada ocurrió en los Estados Unidos en 1993, en donde 403,000 personas contrajeron la enfermedad debido la contaminación del abastecimiento de agua municipal (MacKenzie et al, 1995), y dos años después

el numero de fallecimientos a causa de esta epidemia fue de 54 personas de las cuales el 85% habían adquirido SIDA (Hoxie et al, 1997).

La Giardiasis es una enfermedad de distribución cosmopolita. Su frecuencia varía de acuerdo al nivel educativo de la gente y de las condiciones sanitarias y climatológicas de la región. En el intestino la Giardia puede adherirse a la pared intestinal mediante una estructura rígida que le permite penetrar un poco la mucosa. Este es el mecanismo de daño del parásito ya que al adherirse a la pared genera al huésped una absorción deficiente de nutrientes. Se tiene también la secreción de moco producto de la irritación que produce la presencia de trozofitos en la pared del epitelio intestinal. Ese moco se queda también en la superficie teniendo una doble obstrucción para la absorción provocando además una reacción inflamatoria (OPS, 1986).

Estos dos parásitos son los causantes de una gran parte de las enfermedades diarreicas a nivel mundial principalmente por la ingesta de agua para consumo humano contaminada (Solarte et al, 2006).

#### **2.4. Metodologías clásicas para la desinfección del agua.**

Se entiende por desinfección al proceso cuyo objetivo es inactivar los microorganismos presentes en el agua que puedan afectar su calidad bacteriológica, causando enfermedades debido a su actividad microbiana (Hopper, 1987).

La desinfección se puede llevar a cabo a través de medios químicos y físicos. Entre los agentes químicos destacan el cloro junto con todos sus derivados (cloraminas, dióxido de cloro), ozono, bromo, yodo y iones metálicos (plata), mientras que dentro de los físicos tenemos ebullición, ultrasonido y radiación (UV y gama) entre los más comunes (CDC, 2004). En la Tabla I se muestran los efectos bactericida y remanente de algunos de los distintos tratamientos para agua.

Tabla 1. Efecto bactericida y remanente de algunos tratamientos del agua.

| TIPO             | EFEECTO BACTERICIDA | EFEECTO REMANENTE |
|------------------|---------------------|-------------------|
| O <sub>3</sub>   | +++                 | 0                 |
| Cl <sub>2</sub>  | ++                  | +                 |
| ClO <sub>2</sub> | ++                  | +                 |
| Cloraminas       | +                   | ++                |
| UV               | ++                  | 0                 |
| Radiación γ      | +++                 | +++               |
| Bromo            | ++                  | +                 |
| Yodo             | +                   | 0                 |
| Plata coloidal   | ++                  | 0                 |

## 2.4.1. Procesos químicos de desinfección.

### 2.4.1.1. Cloro.

El cloro puede estar presente tanto en gas como líquido, además de que es moderadamente soluble en agua. El cloro molecular se disocia en agua formando ácido hipocloroso (HClO) o anión hipoclorito (ClO<sup>-</sup>). La disociación ocurre en mayor grado en medio alcalino, pero el cloro posee un poder de desinfección mayor en medio ácido. El desinfectante también puede ser utilizado en forma de sales. Su uso está muy extendido debido a varios aspectos: logra la inactivación efectiva de una gran gama de microorganismos, entre ellos los patógenos comúnmente encontrados en las aguas, su costo es bajo, y tiene un efecto residual fácilmente controlado y monitorizado que protege al agua de una reinfeción (EPA, 1999). La capacidad germicida del cloro se basa en que puede penetrar la pared celular, alterar funciones específicas de las proteínas e inhibir procesos metabólicos de las bacterias y virus. En el caso de parásitos como *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* pueden resistir dosis de hasta 80 mg/l de cloro por 2 h (Rojas, 2004)

### 2.4.1.2. Cloraminas.

Las cloraminas son compuestos de cloro que reaccionan con compuestos a base de nitrógeno. Son menos eficientes a comparación de otros desinfectantes limitándose únicamente a la inactivación bacterias. Si bien las

cloraminas tienen menor poder bactericida que el cloro libre presentan la ventaja de ser más persistentes (Neethling et al, 1985).

Las cloraminas a diferencia del cloro no reaccionan del todo con la materia orgánica presente en el agua por lo que la concentración de subproductos de desinfección es menor, además de que no deja ni sabor ni olor en el agua ya desinfectada (EPA, 2004).

#### **2.4.1.3. Dióxido de cloro.**

El dióxido de cloro debe producirse *in situ* ya que el gas es explosivo a altas presiones y no puede comprimirse ni transportarse, sin embargo es el más eficiente para eliminar parásitos como *Girardia* y *Cryptosporidium* (White, 1999). Este compuesto tiene un alto potencial de oxidación, debido a esto el dióxido de cloro posee mecanismos bactericidas tales como inactivación de sistemas enzimáticos o la desintegración en la síntesis de proteínas. Sin embargo y al igual que los demás derivados del cloro, este también produce subproductos de desinfección pero a diferencia del cloro estos se llegan a degradar más rápido y por eso no representan una amenaza al medio ambiente (Metcalf y Eddy, 2003).

Estos desinfectantes tienen un efecto rápido sobre una gran variedad de microorganismos, y son relativamente baratos. Sin embargo este grupo da como resultado en la producción de compuestos clorados que en algunos casos sobre todo en presencia de material orgánico tienen propiedades mutagénicas (Dunlop et al, 2002).

#### **2.4.1.4. Ozono.**

El ozono es un oxidante y agente germicida muy fuerte. Los mecanismos de desinfección asociados con el uso del ozono incluyen:

1. La oxidación o destrucción directa de la pared de la célula con la salida de componentes celulares fuera de la misma.
2. Las reacciones con los subproductos radicales de la descomposición del ozono.

3. El daño a los componentes de los ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas).
4. La ruptura de las uniones de carbono-nitrógeno que conduce a la despolimerización.

Cuando el ozono se descompone en agua, los radicales libres del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del hidróxido ( $OH^-$ ) que se forman tienen gran capacidad de oxidación y desempeñan un papel activo en el proceso de desinfección. En general se considera que las bacterias son destruidas debido a la oxidación protoplasmática, dando como resultado la desintegración de la pared de la célula (fisuramiento o lisis de la célula). La eficacia de la desinfección depende de la susceptibilidad de los organismos a ser tratados, del tiempo de contacto y de la concentración de ozono (EPA, 1999).

El ozono, al igual que el dióxido de cloro, es inestable y no puede ser transportado ni almacenado y, por lo tanto, debe ser producido *in situ*. En comparación con  $Cl_2$ ,  $ClO_2$  y las cloraminas, es muy eficiente y más efectivo en la inactivación de patógenos, incluyendo bacterias, protozoarios y virus. El  $O_3$  no forma subproductos de desinfección (SPD) organoclorados, pero pueden aparecer compuestos bromados si el agua contuviera bromuros, además de otros productos orgánicos tales como aldehídos o cetonas (White, 1999). Es por esto que la desinfección del agua por ozono se considera como una alternativa a la cloración, sobre todo cuando hay necesidad de la dechloración del agua (Metcalf y Eddy, 2003).

#### **2.4.1.5. Bromo.**

Siendo de la familia de los halógenos, el bromo es muy parecido y actúa también en forma semejante al cloro: una vez disuelto en el agua produce ácido hipobromoso (HOBr). El poder de desinfección del HOBr es muy alto, aunque ligeramente menor que el del hipocloroso. La ventaja del uso del bromo es que a temperatura ambiente es líquido, lo que lo hace más simple de manipular y dosificar que el cloro, sin embargo la sustancia como tal es corrosiva y agresiva, por lo su manejo también requiere mucho cuidado. Su mecanismo de acción es parecido al del cloro, esto es, penetrando las membranas de las células de los microorganismos. Una vez dentro de la célula,



su sola presencia parece desorganizar la estructura de aquellos pero atacan también reaccionando con grupos sulfhidrilos, inactivando enzimas y deteniendo el proceso metabólico, lo que lleva a la muerte del microorganismo (WHO, 2004).

#### **2.4.1.6. Yodo.**

El yodo es sólido a temperatura ambiente, tiene baja solubilidad en el agua y es la sustancia menos agresiva de su familia (cloro, bromo). Al igual que el cloro y el bromo, una vez disuelto en el agua el yodo forma el hipo-ácido correspondiente (en este caso el hipoyodoso) HOI. Sin embargo, dependiendo del pH, una parte (que puede ser considerable), permanece en el agua como I<sub>2</sub>.

El uso del yodo durante períodos prolongados para la desinfección del agua ha sido debatido por muchos organismos de salud, principalmente en relación con los efectos fisiológicos que el yodo puede ejercer en personas sensibles a esta sustancia (Reiff y Witt, 1995).

#### **2.4.1.7. Plata coloidal.**

La desinfección del agua con plata es un método muy antiguo que últimamente ha sido utilizado en muchas partes del mundo (Laubusch, 1971). El uso de dosis de iones de plata para la desinfección es completamente inofensivo para los humanos como para otros animales (EPA, 2001; WHO, 1993). Sin embargo la exposición prolongada de este desinfectante a la piel causa una enfermedad de decoloración azul llamada Argyria. Este método no cambia el sabor, olor o color del agua, además de no alterar las propiedades tanto físicas como químicas, únicamente altera a las bacterias gérmenes y algas que se pudieran encontrar. La plata actúa principalmente por tres mecanismos:

1. Remover átomos de hidrogeno de grupos sulfhídricos de las bacterias.
2. Los átomos de azufre posteriormente se unen para bloquear la respiración celular así como la transferencia de electrones en la bacteria.
3. Inhibe la replicación del ADN.

4. Altera la pared celular de la bacteria por medio de mecanismos enzimáticos (EPA, 1992).

#### **2.4.2. Procesos físicos de desinfección.**

##### **2.4.2.1. Ebullición.**

La desinfección por ebullición consiste en elevar la temperatura del agua a 100° C y mantener esa condición por espacio de uno a cinco minutos. El resultado es la eliminación de la mayoría, sino de todos, los microorganismos patógenos. La desventaja es que esta técnica necesita materiales para combustible, los cuales no siempre están disponibles, y solo es aplicable para volúmenes de agua pequeños (Solsona, 2001).

##### **2.4.2.2. Ultrasonido.**

Debido a los problemas que ocasionan otros desinfectantes como el cloro después de su uso se ha venido incrementando el uso de ultrasonido especialmente en agua residual industrial (Joyce, 2003). La desinfección por ultrasonido tiene como resultado la producción de reacciones químico-sonoras que forman radicales hidroxilos altamente oxidativos (Kalumuck et al, 2003).

Cuando los líquidos están expuestos a este tipo de desinfectante (mediante vibraciones), tanto las características físicas como químicas del agua sufren un cambio debido a un fenómeno físico conocido como cavitación. La cavitación es la formación, expansión e implosión de burbujas de gas microscópicas en medio líquido cuyas moléculas del líquido absorben la energía ultrasónica. Dicha energía, cuando es lo suficientemente alta causa la ruptura de la pared celular, libera partículas de superficies sólidas además de destruirlas junto con los microorganismos (Mahvi et al, 2005; Neppiras, 1980).

Esta técnica es muy rentable para desinfectar agua la cual presenta concentraciones altas de sólidos suspendidos, además de que no genera subproductos de desinfección como lo hace el cloro.

##### **2.4.2.3. Rayos gama.**

Los rayos gamma presentan longitudes de onda de 0,001 a 0,1 nm. Esta radiación produce una serie de ionizaciones en cadena que expulsan

electrones de los átomos. El resultado es la muerte celular. Dicha radiación se utiliza principalmente en la desinfección de alimentos ya que su costo es relativamente bajo con respecto a otro tipo y su nivel de desinfección es muy alto (Block, 1991).

#### **2.4.2.4. Radiación ultravioleta.**

Mientras que la mayoría de los agentes desinfectantes normalmente utilizados en agua, inactiva a los microorganismos por una interacción (reacción química), la inactivación por medio de radiación solar se debe básicamente a la absorción de rayos ultravioleta (UV) de alta energía, que causa reacciones fotoquímicas de los componentes fundamentales de las células, perjudicando así su funcionamiento normal (EPA, 1999). La radiación ultravioleta considerada como germicida es aquella que oscila entre los 200 y 300nm de longitud de onda, la cual se considera como UV-C, siendo la longitud de onda de 260nm la más letal para los microorganismos (Friedberg et. al., 1995).

El mecanismo de desinfección por UV depende de la absorción de la radiación por las proteínas, y por los ácidos nucleicos (ARN y ADN) de un microorganismo dado. La absorción de dosis altas de UV por las proteínas presentes en las membranas celulares lleva a la ruptura de esas membranas y, consecuentemente, a la muerte de la célula. Por otro lado a dosis mas bajas de UV puede interrumpir la capacidad del microorganismo de reproducirse, impidiéndole infectar el medio (Bolson, 1999; Friedberg et al., 1995),

#### **2.4.2.5. Lámparas de baja y mediana presión.**

Hay que considerar a la hora de diseñar el sistema de desinfección, que la tecnología de las lámparas de UV cambia constantemente. Los componentes principales del sistema de desinfección con luz UV son las lámparas de vapor de mercurio. La fuente de luz UV son las lámparas de arco de mercurio de baja o mediana presión, bien sea de intensidad baja o alta (EPA, 1999). Las lámparas de baja presión emiten básicamente luz monocromática a una longitud de onda de 253.7nm. Esto se debe a que se aplica baja presión (<10 Tor) al gas de mercurio que se encuentra dentro de la lámpara.

Las longitudes estándar de las lámparas de baja presión son de 0.75 y 1.5 metros, y sus diámetros van de 1.5 a 2.0cm. La temperatura ideal de la pared de la lámpara se encuentra entre 95 y 122°F (Metcalf y Eddy, 2003).

Las lámparas de mediana presión se han considerado recientemente como mas efectivas que las anteriores además de que son utilizadas generalmente en instalaciones de mayor tamaño. La presión aplicada al gas de mercurio (1000Tor) puede tener una intensidad aproximadamente de 15 a 20 veces que las de baja presión. La lámpara de mediana presión desinfecta más rápido y tiene más capacidad de penetración debido a su mayor intensidad.

Además del incremento en intensidad las longitudes de onda que se alcanzan con este tipo de lámparas oscilan desde los 185nm (UV) hasta los 1367nm (infrarroja) (Linden y Mofidi, 1999). Sin embargo, estas lámparas operan a temperaturas más altas con un mayor consumo de energía eléctrica (EPA, 1999).

## **2.5. Desinfección solar (SODIS).**

La desinfección solar ha sido comprobada como una técnica efectiva para el tratamiento de agua contaminada por bacterias y virus patógenos principalmente (McGuigan et. al, 2006), especialmente en países en vías de desarrollo (Figura 6). Esta es una técnica simple, ambientalmente sustentable y de bajo costo. Se basa en el efecto germicida producido por los rayos UV (cuyas ondas oscilan entre los 320-400nm) así como la presencia de oxígeno disuelto que mediante la radiación produce altas concentraciones de radicales libres y peróxido de hidrógeno en el agua. Estas reacciones conducen al proceso de destrucción de los microorganismos (Gelover et al, 2006).

Esta tecnología esta destinada a comunidades rurales de bajos ingresos las cuales no tienen acceso a sistemas modernos de purificación del agua, que no hiervan ni cloren el agua y además solo requieran desinfectar la cantidad de agua que utilizan diariamente (Martin-Dominguez et. al, 2005). Básicamente la técnica consiste en llenar botellas transparentes de polietilentereftalato (PET) con el agua a tratar y dejarla expuesta al sol por un periodo de tiempo mayor a 4 horas (Figura 5).

El uso de botellas de material PET se debe a que no contienen sustancias peligrosas para la salud humana; en cambio si se utilizan botellas de vidrio se necesitan botellas cuyo material presente una buena transmisión de la luz ultravioleta. Las botellas de plástico están hechas de PET en su mayoría, estas contienen aditivos químicos, como estabilizantes frente a la radiación UV para proteger las botellas y a su contenido de la oxidación y la radiación UV. Los aditivos son moléculas grandes que apenas se difunden por el PET. Dentro de las ventajas del PET tenemos que son de bajo peso en comparación a botellas de vidrio, son relativamente irrompibles, transparentes; neutro al gusto y químicamente estables; mientras que sus desventajas son que presentan poca resistencia a la temperatura (deformaciones por encima de los 65 °C) y aparición de algunos defectos debido al envejecimiento del material (SODIS, 1998).



Figura 5. Practica del método de desinfección solar.

## **2.6. Estimación de la dosis de radiación UV requerida para la inactivación de los microorganismos.**

Para inactivar los microorganismos es necesario exponerlos a la luz UV durante diferentes periodos de tiempo. El tiempo requerido para una misma intensidad (dosis), dependerá de la sensibilidad de cada microorganismo. La dosis de radiación UV se conoce como la energía o intensidad emitida en un medio por determinado periodo de tiempo conocido como tiempo de residencia,

que a su vez lleva un factor de corrección del nivel de absorción del fluido (McCarthy, 1993).

La intensidad es la energía de emisión de la lámpara. El tiempo de residencia se caracteriza por la velocidad de partícula de agua a través de la cámara de radiación. La tasa de supervivencia de un microorganismo después de la aplicación del tratamiento con luz UV, se relaciona directamente a la dosis aplicada y sus unidades se expresan en mWs/cm<sup>2</sup> como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{Log } (N/N_0) = \text{dosis UV} \times \text{constante}$$

Donde N es la población de microorganismos que sobrevivieron después de una población inicial N<sub>0</sub>. y la constante es el ritmo de inactivación microbiana.

En resumen la dosis se calcula al multiplicar la intensidad de la lámpara UV por el tiempo de exposición de los microorganismos en el agua.

$$\text{Dosis UV (mWs/cm}^2\text{)} = \text{Intensidad (mW/cm}^2\text{)} \times \text{tiempo de exposición (seg)} = \text{mJoules/cm}^2$$

mW = miliWatts

s = segundos

cm = centímetros

A pesar de que todos los microorganismos pueden ser destruidos mediante radiación UV, existen algunos que ofrecen mayor resistencia que otros, por lo que las dosis de aplicación deben ser mayores. En este caso, los protozoos son de 10 a 15 veces mas resistentes que la mayoría de las bacterias (Whitby, 1993).

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia de la radiación ultravioleta en la inactivación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua.

#### **3.1. Objetivos particulares.**

1. Implementación de técnicas analíticas para la determinación y pruebas de viabilidad de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en muestras de agua.
2. Implementación de un sistema de desinfección con radiación de luz UV artificial en lámparas de baja presión para inducir la inactivación.
3. Estimar la dosis de radiación UV para la inactivación de los parásitos en agua contaminada bajo condiciones de luz UV artificial.

#### **IV. HIPOTESIS**

Ho. El uso de la radiación ultravioleta, proveniente de lámparas de baja presión, puede inactivar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y quistes de *Gairdia lamblia* presentes en agua.



## **V. METODOLOGIA**

Los materiales y técnicas utilizadas para llevar a cabo el desarrollo de cada uno de los objetivos específicos planteados se presentan a continuación.

### **5.1. Implementación de técnicas analíticas para la determinación y pruebas de viabilidad de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en muestras de agua.**

El procedimiento utilizado para determinar el parásito en muestras de agua se tomó del protocolo 1622 de la EPA (Environmental Protection Agency, 2006). En dicho protocolo se recomienda el uso de dos kits elaborados por los Laboratorios IDEXX y que consisten de dos etapas: Inmunoseparación magnética y posteriormente una tinción inmunofluorescente.

#### **5.1.1. Inmunoseparación magnética.**

La separación inmunomagnética (IMS) consta de una solución de anticuerpos monoclonales contra epítopos (parte antigénica) presentes en la pared celular, los cuales recubren las partículas paramagnéticas, es decir, partículas sensibles a la acción de campos magnéticos. Estas partículas cargadas con anticuerpos se unen a los quistes, y al ser aplicado a un campo magnético, permite que el complejo se una a la pared lateral del recipiente que los contiene, permitiendo así la posibilidad de eliminar todo aquel residuo y contaminante extraño de la muestra. Es posible llevar a cabo la disociación de las partículas mediante fuerzas químicas y mecánicas para que una vez separadas, permita obtener como resultado los ooquistes y quistes purificados.

#### **5.1.2. Tinción inmunofluorescente.**

Una vez purificados los quistes se procede con la tinción de inmunofluorescencia (IF) mediante anticuerpos específicos para los quistes. Los quistes poseen antígenos de superficie que permiten la unión de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína. Este fluoruro tiene una longitud de onda de excitación máxima aproximadamente de 540nm. Después de un periodo de excitación, el fluoróforo regresa a su estado basal y la energía

absorbida es emitida posteriormente en el rango del espectro visible de la luz, lo cual nos permite observar de forma característica de los parásitos en el microscopio de epifluorescencia.

## 5.2. Observación Microscópica.

La observación se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia marca Hitachi KF-D50 COLOR DIGITAL (Figura 10a), los quistes se identificaron por tamaño, forma y fluorescencia así como su viabilidad bajo la luz del microscopio. Los ooquistes de *Cryptosporidium* se observan como objetos esféricos de alrededor de 5µm de diámetro. Cabe mencionar que además de la forma esférica del ooquiste existen otros tipos de formas, las cuales son consideradas como atípicas y llegan a formar diferentes formas además de la esférica como diferentes tamaños, aunque por lo general el tamaño no varía mucho. Por otro lado los quistes de *Giardia* son de mayor tamaño (10µm) y presentan formas ovoides y siempre están asociados a la presencia de *Cryptosporidium* en el medio. Para la cuantificación de ooquistes y quistes se realizó un recorrido en zig-zag de toda la muestra durante la observación al microscopio la cual se utilizó el objetivo 100x y el filtro UV en donde se reconoció a los microorganismos por su color verde manzana y su morfología característica (Figura 10b).

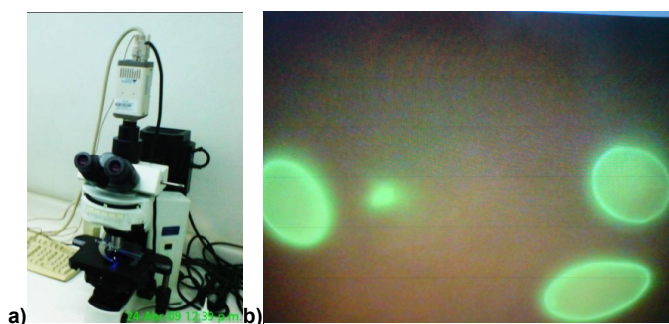


Figura 6. a) Microscopio de Fluorescencia, b) Imagen de ooquiste y quiste en fluorescencia.

## 5.3. Pruebas de viabilidad de quistes y ooquistes de los parásitos.

Se analizaron dos técnicas para la determinación de la viabilidad de ooquistes y quistes: 1) Yoduro de Propidio, 2) DAPI. La primera de ellas consiste en aplicar un colorante a base de Yoduro de Propidio (10µl) sobre la membrana de nitrocelulosa, posterior al marcado con anticuerpos. La muestra

se cubre con el colorante y se incuba por 30 minutos a 37°C. El Yoduro de Propidio tiñe de rojo a las células no viables (Diaz-Cinco et. al, 2003).

La técnica de DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenylindol) se basa en examinar a los ooquistes y quistes mediante un ensayo de permeabilidad basado en la inclusión o exclusión de dos colorantes fluorescentes, DAPI y Yoduro de Propidio. En la tabla 2 se muestra las proporciones necesarias para determinar la viabilidad.

Tabla 2. Proporciones para determinar viabilidad.

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| DAPI positivo/PI positivo (no viables) | DAPI positivo/PI negativo (viables) |
| DAPI negativo/PI negativo (viables)    |                                     |

Las cantidades de colorante de cada reactivo son de 10µl de DAPI + 10µl de Yoduro de Propidio dejándose incubando durante 2 horas a temperatura ambiente (Méndez-Hermida et. al, 2007).

En el presente estudio se opto por usar la primera técnica a base de Yoduro de Propidio, las pruebas de viabilidad se llevaron acabo antes y posterior al proceso de desinfección, las cuales consistieron de una prueba de duplicado de la solución madre (antes) y de una prueba de cada botella PET previamente desinfectada. El colorante se aplicó en la membrana de nitrocelulosa posterior al marcado con anticuerpos y se dejo incubando, todo esto se realiza durante la etapa de tinción inmunofluorescente.

#### **5.4. Determinación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en diferentes ubicaciones de la Ciudad de Chihuahua.**

Para conocer los detalles del proceso de muestreo y tener experiencia en el laboratorio con muestras reales de agua, se llevo a cabo el muestreo y análisis de presencia ausencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en diferentes sitios de la ciudad de Chihuahua. Con ayuda del personal de la Junta Municipal de Agua y Saneamiento (JMAS), se identificaron las fuentes de abastecimiento de agua que hay en la ciudad, como pozos y potabilizadoras, consideradas importantes a analizar. Los puntos de muestreo que se

seleccionaron para el muestro fueron los pozos que en conjunto con la JMAS, se considero que puedan presentar contaminación, los cuales fueron escogidos por conveniencia abarcando la zona norte, centro y sur de la ciudad.

#### **5.4.1. Sitios de muestreo seleccionados.**

Para que la muestra fuera representativa se seleccionaron diferentes fuentes de agua, tanto potable como reciclada (Figura 7). Los sitios muestreados fueron:

1. Pozo Potabilizadora (agua potable sin cloro, agua reciclada)
2. Pozo Palacio del Sol (agua potable sin cloro) ubicado a un costado del hotel Palacio del Sol.
3. Pozo Sacramento 2 (agua potable sin cloro) ubicado al norte de la ciudad sobre la avenida Heroico Militar.
4. Pozo el Palomar (agua reciclada) ubicado en el parque El Palomar.
5. Pozo Pistolas Meneses (agua reciclada) ubicado en la Deportiva Pistolas Meneses.
6. Pozo California (agua reciclada) ubicado en la Deportiva Sur.

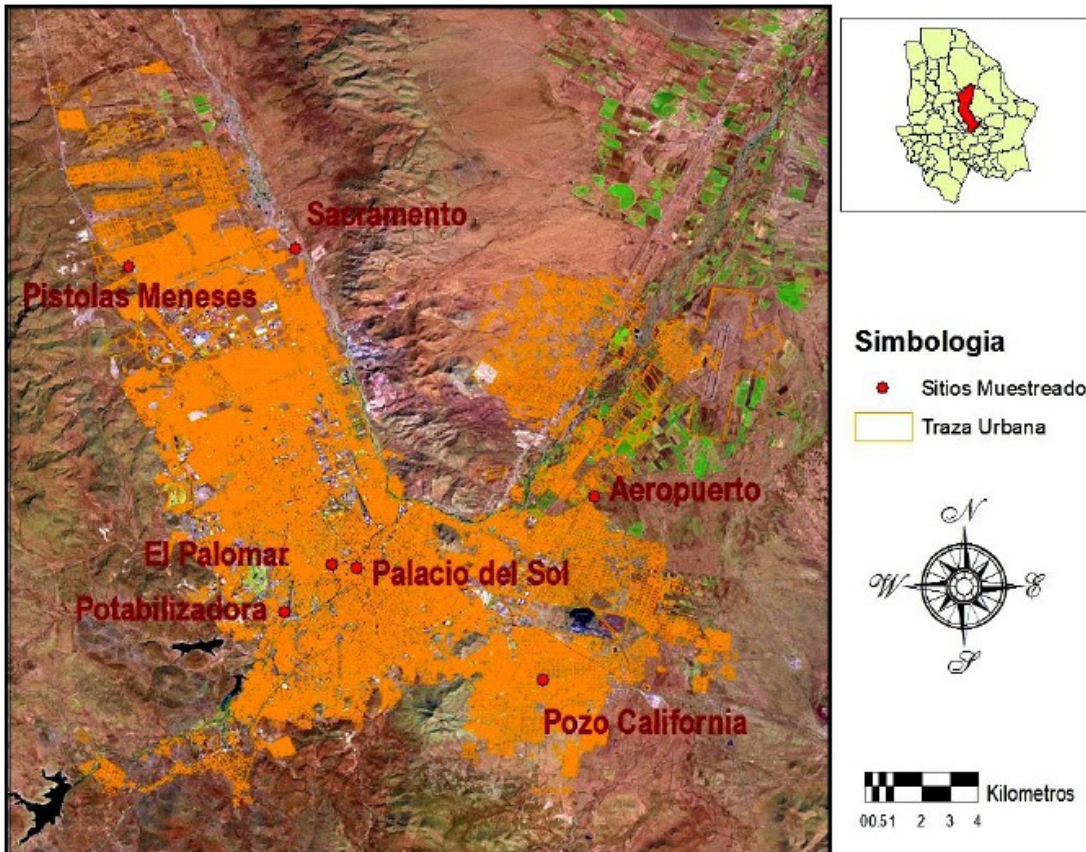


Figura 7. Sitios en donde se ubico el muestreo de agua de la ciudad de Chihuahua.

#### 5.4.2. Colección de las muestras de agua.

En cada punto de muestreo se llevo el equipo de filtrado Filtamax para así tener un mejor control al tomar la muestra de agua (Figura 8). En el caso de los pozos de agua potable se filtraron 200L de agua mientras que para pozos de agua reciclada se filtraron 100L. Cada filtro se etiqueto y se conservo para su traslado al laboratorio en donde se hicieron los análisis para determinación del parásito. Todo el procedimiento de recolección se baso en el método 1623 de la EPA el cual establece las medidas y requerimientos para la determinación de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua.



Figura 8. Equipo utilizado para la recolección de las muestras.

#### 5.4.3. Filtrado de las muestras de agua.

Para la concentración y purificación del parásito se implementó la técnica de filtrado Filtamax elaborada por los Laboratorios IDEXX, la cual optimiza tanto la captura como la recuperación de patógenos presentes en el agua como lo son *Cryptosporidium* y *Giardia*.

El filtro el cual está comprimido hasta llegar a una porosidad de  $1\mu$  tiene la capacidad de operar hasta 4 litros por minuto así como de descomprimirse para lograr recuperar a los microorganismos capturados durante el lavado del mismo.

La técnica Filtamax consiste de dos concentraciones así como de dos lavados para lograr capturar la mayor cantidad de organismos presentes en el agua, el cual por lo general se llegan a retener el 70% o más de los organismos capturados (Figura 9).

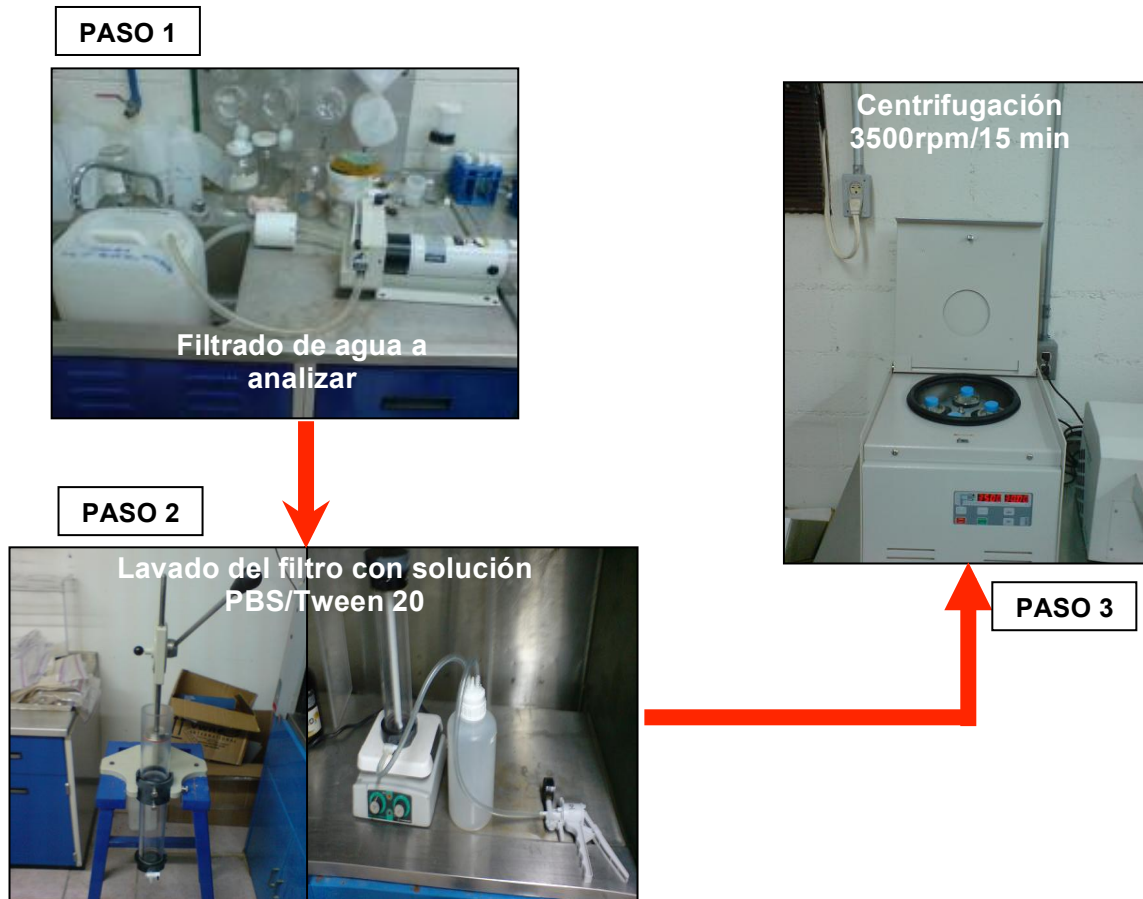


Figura 9. Filtrado de muestra a analizar.

Una vez terminado el proceso de concentración y purificación de la muestra se procede con la inmunoseparación y tinción de los ooquistes y quistes, para poder ser observados microscópicamente

### 5.5. Sistema de desinfección con irradiación de luz UV artificial en lámparas de baja presión para inducir la inactivación.

Para fines de desinfección se utilizó un concentrador de radiación UV de tipo parabólico, el cual se le adaptaron en la parte superior tres lámparas UV de baja presión (marca GE) de 15 watts de potencia cada una y una longitud de onda de 254nm, las cuales fueron colocadas en la parte superior del concentrador para irradiar las diferentes muestras a desinfectar (Figura 10).





Figura 10. Concentrador con luz ultravioleta.

### 5.5.1. Pruebas de inactivación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* mediante luz UV.

El diseño experimental se baso en el análisis de 6 tratamientos, el cual se realizaron tres repeticiones a cada uno para determinar la dosis de luz UV requerida para la inactivación de los parásitos en función del tiempo, considerando un rango de 6 a 12 horas. Además de esto se realizo una prueba para la determinación de Coliformes tanto totales como fecales. Las variables a considerar fueron la cantidad de organismos (ooquistes y quistes de los parásitos, además de los Coliformes) activos o inactivos en el rango de tiempo considerado. Los datos se colectaron en los formatos presentados en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Formato para conteo de parásitos tanto de *Cryptosporidium* como *Giardia* en cada tiempo de exposición.

|              | 6 horas |     |         |     | 7 horas  |     |         |     | 8 horas  |     |         |     |
|--------------|---------|-----|---------|-----|----------|-----|---------|-----|----------|-----|---------|-----|
|              | Tratado |     | Control |     | Tratado  |     | Control |     | Tratado  |     | Control |     |
|              | v       | n/v | v       | n/v | v        | n/v | v       | n/v | v        | n/v | v       | n/v |
| 1era         |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| 2da          |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| 3era         |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| <b>TOTAL</b> |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
|              | 9 horas |     |         |     | 11 horas |     |         |     | 12 horas |     |         |     |
|              | Tratado |     | Control |     | Tratado  |     | Control |     | Tratado  |     | Control |     |
|              | v       | n/v | v       | n/v | v        | n/v | v       | n/v | v        | n/v | v       | n/v |
| 1era         |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| 2da          |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| 3era         |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |
| <b>TOTAL</b> |         |     |         |     |          |     |         |     |          |     |         |     |



Tabla 4. Formato para conteo de viabilidad.

**VIABILIDAD**

|    | SI | NO |
|----|----|----|
| SI |    |    |
| NO |    |    |

### 5.5.2. Cinética de inactivación de los microorganismos.

Para determinar la velocidad de inactivación de los microorganismos, se prepararon soluciones concentradas de estos, a partir de suspensiones de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* de aproximadamente  $2 \times 10^6$  ooquistes purificados fueron diluidos en tres litros de agua destilada (solución madre). Dichas suspensiones se vaciaron en tres botellas tipo PET de 1L cada una, utilizando dos de ellas para las pruebas de inactivación y dejando una como blanco de referencia (envuelta en aluminio sin exposición a la luz UV), todas las botellas se mantuvieron a temperatura ambiente (30 °C) en el laboratorio durante todo el procedimiento.

Para llevar acabo el análisis de viabilidad y determinar la cinética de inactivación, se establecieron diferentes tiempos de exposición (6,7,8,9,11 y 12 horas), de los cuales dentro de cada intervalo se tomaron muestras de cada botella y se determino el numero de organismos no viables.

### 5.5.3. Condiciones generales del equipo utilizado para la inactivación de los microorganismos.

Para propósitos de desinfección se utilizo un sistema que consistió en un concentrador parabólico con una capacidad para 3 botellas PET de 1L, al cual se le adaptaron 3 lámparas germicidas de luz UV de baja presión (15 W) en la parte superior del concentrador. La altura entre las lamparas y las botellas es de 30 cm. Las suspensiones preparadas de *Cryptosporidium* y *Giardia* fueron depositadas en las botellas PET, el equipo se ubico en el laboratorio de calidad del agua del CIMAV donde la temperatura promedio fue de 20 °C durante los días en que se llevo acabo el proceso de desinfección. La implementación de un concentrador se debe a que el uso de este equipo mejora la eficiencia de inactivación, en el caso de un concentrador parabólico la eficiencia es de hasta

3 veces más que cuando no se utiliza. En la figura 11 se presenta un diagrama esquemático del equipo utilizado en el presente estudio.

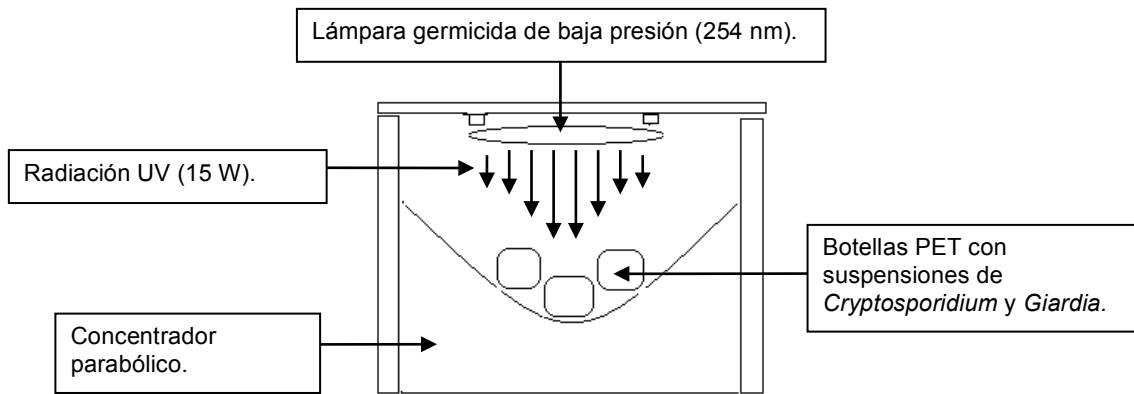


Figura 11. Diagrama del equipo experimental usado para desinfección de *Cryptosporidium* y *Giardia* por luz UV.

### 5.6. Análisis estadístico del diseño experimental.

Los datos obtenidos fueron de 6 tratamientos independientes, los cuales correspondieron a la observación final tanto de *Cryptosporidium* como *Giardia*, donde los resultados fueron clasificados como categóricos mutuamente excluyentes. La información fue agrupada en tablas de contingencia para cada intervalo de exposición a la radiación UV y para los dos parásitos. Por último los datos fueron procesados por el programa estadístico MINITAB 14 (Minitab Inc, 2006). Se utilizó el test de  $X^2$  como prueba estadística con una  $p < 0.050$  para el caso de los parásitos.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSION.**

### **6.1. Determinación de la presencia de y análisis de viabilidad de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.**

En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados de las pruebas realizadas para la determinación del efecto de la luz UV en *Cryptosporidium* y *Giardia*.

Como se describió en la metodología a variable de respuesta del experimento fue la viabilidad o no viabilidad de los microorganismos. Las observaciones de estos resultados al final de cada tiempo de exposición son independientes por lo que los datos fueron tratados como categóricos.

La etapa de exposición a la luz UV se dividió en seis diferentes periodos de tiempo con tres repeticiones de cada uno además de sus respectivos controles libres de exposición a la luz UV. Posterior a la exposición las muestras fueron procesadas conforme a las técnicas previamente descritas en la metodología y al momento de la observación se hizo un conteo para cada tipo de parásito.

Los tratamientos se dividieron en tratados (para las muestras expuestas a la luz UV) y control (para las que no fueron expuestas). Para medir la eficiencia de la técnica de desinfección se determinó al final de cada tratamiento el número de microorganismos activos o viables mediante pruebas de viabilidad.

Tabla 5. Resultados de análisis de tratamientos para *Cryptosporidium*.

|              | 6 horas   |           |           |           | 7 horas   |           |           |           | 8 horas   |           |           |           |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              | Tratado   |           | Control   |           | Tratado   |           | Control   |           | Tratado   |           | Control   |           |
|              | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       |
| 1era         | 7         | 7         | 6         | 5         | 5         | 3         | 7         | 2         | 2         | 2         | 4         | 1         |
| 2da          | 5         | 5         | 12        | 3         | 10        | 5         | 12        | 4         | 6         | 10        | 5         | 3         |
| 3era         | 10        | 4         | 20        | 5         | 7         | 2         | 9         | 3         | 1         | 2         | 7         | 3         |
| <b>TOTAL</b> | <b>22</b> | <b>16</b> | <b>38</b> | <b>13</b> | <b>22</b> | <b>10</b> | <b>28</b> | <b>9</b>  | <b>9</b>  | <b>14</b> | <b>16</b> | <b>7</b>  |
|              | 9 horas   |           |           |           | 11 horas  |           |           |           | 12 horas  |           |           |           |
|              | Tratado   |           | Control   |           | Tratado   |           | Control   |           | Tratado   |           | Control   |           |
|              | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       | v         | n/v       |
| 1era         | 6         | 4         | 19        | 4         | 3         | 5         | 3         | 8         | 2         | 4         | 23        | 9         |
| 2da          | 4         | 5         | 6         | 5         | 5         | 2         | 2         | 3         | 9         | 10        | 9         | n/p       |
| 3era         | n/p       | 8         | 5         | 8         | 4         | 8         | n/p       | 10        | 7         | 4         | 23        | 2         |
| <b>TOTAL</b> | <b>10</b> | <b>17</b> | <b>30</b> | <b>17</b> | <b>12</b> | <b>15</b> | <b>5</b>  | <b>21</b> | <b>18</b> | <b>18</b> | <b>55</b> | <b>11</b> |

\*v = viable

\*n / v = no viable

\*n / p = no presente

Tabla 6. Resultados de análisis de tratamientos para *Giardia*.

|              | 6 horas   |           |          |           | 7 horas  |          |           |           | 8 horas   |          |          |           |
|--------------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
|              | Tratado   |           | Control  |           | Tratado  |          | Control   |           | Tratado   |          | Control  |           |
|              | v         | n/v       | v        | n/v       | v        | n/v      | v         | n/v       | v         | n/v      | v        | n/v       |
| 1era         | n/p       | n/p       | n/p      | n/p       | 1        | n/p      | 5         | n/p       | 7         | n/p      | 3        | 2         |
| 2da          | 3         | 3         | n/p      | n/p       | n/p      | 3        | 7         | 2         | 2         | 2        | 1        | 4         |
| 3era         | 2         | n/p       | 4        | 2         | 4        | 5        | 1         | 5         | 2         | 4        | n/p      | 4         |
| <b>TOTAL</b> | <b>5</b>  | <b>3</b>  | <b>4</b> | <b>2</b>  | <b>5</b> | <b>8</b> | <b>13</b> | <b>7</b>  | <b>11</b> | <b>6</b> | <b>4</b> | <b>10</b> |
|              | 9 horas   |           |          |           | 11 horas |          |           |           | 12 horas  |          |          |           |
|              | Tratado   |           | Control  |           | Tratado  |          | Control   |           | Tratado   |          | Control  |           |
|              | v         | n/v       | v        | n/v       | v        | n/v      | v         | n/v       | v         | n/v      | v        | n/v       |
| 1era         | 8         | 12        | 2        | 7         | 2        | 1        | n/p       | 4         | 8         | n/p      | n/p      | n/p       |
| 2da          | 2         | 8         | n/p      | 5         | n/p      | 3        | n/p       | 4         | 5         | 4        | 1        | 2         |
| 3era         | 4         | 2         | 1        | 9         | 3        | n/p      | 3         | 6         | 2         | 3        | 4        | 10        |
| <b>TOTAL</b> | <b>14</b> | <b>22</b> | <b>3</b> | <b>21</b> | <b>5</b> | <b>4</b> | <b>3</b>  | <b>14</b> | <b>15</b> | <b>7</b> | <b>5</b> | <b>12</b> |

\*v = viable

\*n / v = no viable

\*n / p = no presente

Durante el procedimiento para determinar los parásitos, son viables cuando los quistes y oquistes permanecen de un color verde brillante intenso (Figura 12a), resultado de que la pared celular de ambos parásitos no presento daño y no viable cuando el yoduro de propidio (IP) tiñe la estructura interna de las células de color rojizo (Figura 12b) (Mendez- Hermida et. al, 2007).

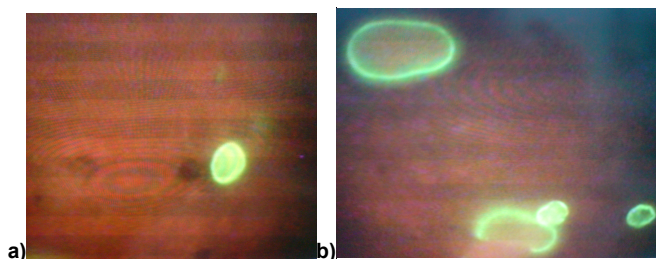


Figura 12. Ooquistes de *Cryptosporidium*, a) célula viable, b) célula no viable.

De los dos procedimientos que existen para determinar la viabilidad de los microorganismos, el uso de Yoduro de Propidio para la tinción de las células fue el más adecuado debido a que los tiempos de incubación para demostrar la viabilidad es menor (10 – 30 min). Con DAPI no se obtuvo la coloración que menciona la técnica. En teoría la eficiencia de tinción es mayor, pues los tiempos de incubacion son mayores (mínimo 2 h) dependiendo del tratamiento para que se logre teñir completamente la célula (Jones y Senft, 1985; Campbell et. al, 1992; Robertson et. al, 1993; Black et. al, 1996). En el laboratorio se probó la técnica de acuerdo a los procedimientos indicados de tiempo de incubación de 2 h y no se logro tener la coloración requerida, el cual se pudo deber a errores durante la manipulación del colorante en su aplicación a las células de los parásitos.

En el muestreo realizado en la Ciudad de Chihuahua en ninguno de los puntos muestreados se obtuvo presencia de los parásitos en agua, esto pudo deberse a que la cantidad de agua muestreada no fue la suficiente para observar los parásitos. En un estudio realizado en la ciudad de hermosillo por Diaz-Cinco y col. (2003), muestrearon 1000 L de agua de los diferentes puntos muestreados a diferencia de nuestro estudio el cual fueron únicamente 100 y 200 L dependiendo del tipo de pozo de agua analizado.

## 6.2. Desinfección mediante lámparas de baja presión para la inactivación de parásitos y coliformes.

Tanto *Cryptosporidium* como *Giardia* se usó lámparas de UV de baja presión para inducir su inactivación, la intensidad de las lámparas fueron de 15 W con las que se produjo un efecto germicida a los microorganismos, lo cual coincide con Gates, 1930; Meulemans, 1987; Linden y Darby, 1997, en el que reportaron que el efecto biocida de la radiación UV es posible por la absorción de fotones de luz UV por el ADN de la célula causando una dimerización de las bases nucleicas ocurriendo dentro de la longitud de onda de 254 nm, que es producida por lámparas germicidas de baja presión..

### 6.2.1. Inactivación de *Cryptosporidium parvum*.

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en el experimento. Se indica estadísticamente el efecto de la radiación UV y el tiempo de exposición sobre los ooquistes de *Cryptosporidium* en donde los datos de probabilidad de  $X^2$  y P indican el tiempo requerido para la inactivación de los ooquistes.

Tabla 7. Efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en diferentes tiempos de exposición.

| Exposición (h) | $X^2$  | Valores P |
|----------------|--------|-----------|
| 6              | 2.737  | 0.098     |
| 7              | 0.412  | 0.521     |
| 8              | 4.293  | 0.038     |
| 9              | 4.957  | 0.026     |
| 11             | 3.865  | 0.049     |
| 12             | 12.720 | 0.000     |

En la figura 13 se presentan los resultados en términos de viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en donde se observa que durante las primeras dos horas (6,7 h) de exposición no se tiene diferencia significativa lo cual nos indica que durante estos intervalos la viabilidad del parasito no es alterada.

En los tiempos de exposición restantes (8, 9,11 y 12 h) la diferencia es estadísticamente significativa, lo cual indica que la viabilidad del parasito ya fue alterada. En otros estudios (McGuigan et. al, 2006) se reporta que la inactivación del parasito se logro con 10 h de tiempo de exposición, a una temperatura de 40 °C y la inactivación se verifico por medio de microscopia electrónica (Figura 14) (Shin, 2000; Landis, 2000). En el presente estudio, el tiempo de exposición requerido fue de 8 h, a temperatura ambiente (20 a 25 °C) utilizando en concentrador y lámparas ultravioleta de baja presión lo cual coincide con lo reportado por Morita y col. (2002), donde demostraron que la infectividad de *C. parvum* disminuye conforme se aumenta la dosis de radiación UV en un mínimo de 8 h de exposición.

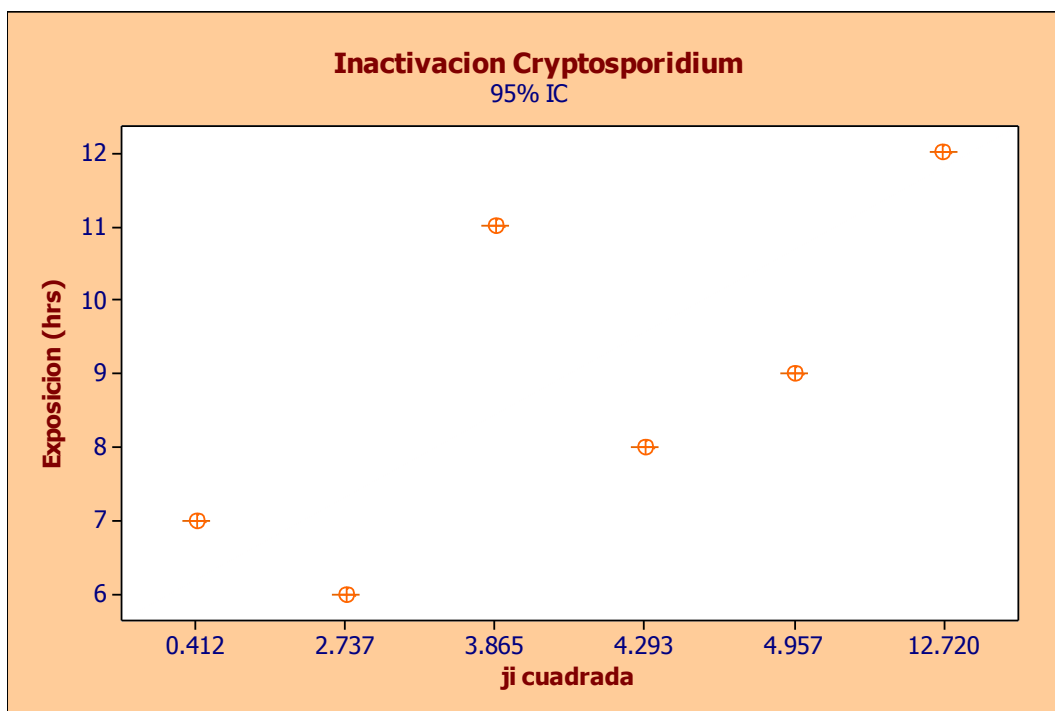


Figura 13. Análisis  $X^2$  para viabilidad en ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.

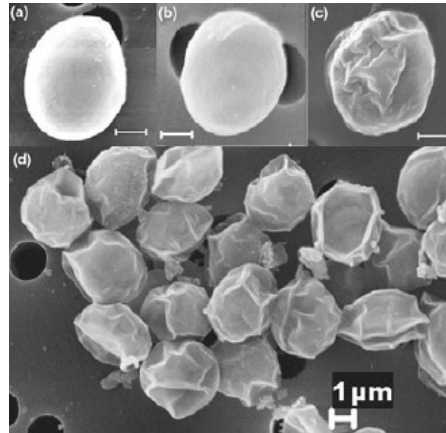


Figura 14. Micrografía de microscopio electrónico de *Cryptosporidium parvum*, escala de 1 $\mu$ . (a) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y tiempo = 0 h; (b) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y tiempo = 10 h; (c) *Cryptosporidium parvum* a 40 °C y exposición a UV 10 h; (d) Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* después de 10 h de exposición (McGuigan et. al, 2005).

### 6.2.2. Inactivación de *Giardia lamblia*.

En el caso de quistes de *Giardia lamblia* los resultados fueron similares a lo requerido por *Cryptosporidium* (Tabla 8). Los valores de  $X^2$  y de P nos indican que si existe una inactivación mediante el uso de radiación UV lo cual coincide con lo reportado por Mofidi y col (2002), en el que indican que los quistes de *Giardia lamblia* como *Giardia muris* son altamente sensitivos a bajas dosis de radiación UV (2-10 mJ/cm<sup>2</sup>).

Tabla 8. Efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de *Giardia lamblia* en diferentes tiempos de exposición.

| Exposición<br>(hrs) | $X^2$ | Valores<br>P |
|---------------------|-------|--------------|
| 6                   | 0.026 | 0.872        |
| 7                   | 2.238 | 0.135        |
| 8                   | 4.014 | 0.045        |
| 9                   | 4.938 | 0.026        |
| 11                  | 3.970 | 0.046        |
| 12                  | 5.770 | 0.016        |



La figura 15 muestra los resultados obtenidos en términos de viabilidad de quistes de *Giardia lamblia* en donde se observa un comportamiento semejante al de *Cryptosporidium* en donde las primeras horas (6,7 hrs) de exposición no afectan la viabilidad del microorganismo ya que no hay diferencia significativa, es en los tiempos de exposición restantes en donde a partir de las 8 horas logramos observar que ya se presenta un efecto sobre la viabilidad de los quistes. Sin embargo cabe mencionar que los valores obtenidos fueron menores a comparación de *Cryptosporidium* debido a que *Giardia* no fue detectable en varios de los tratamientos analizados.

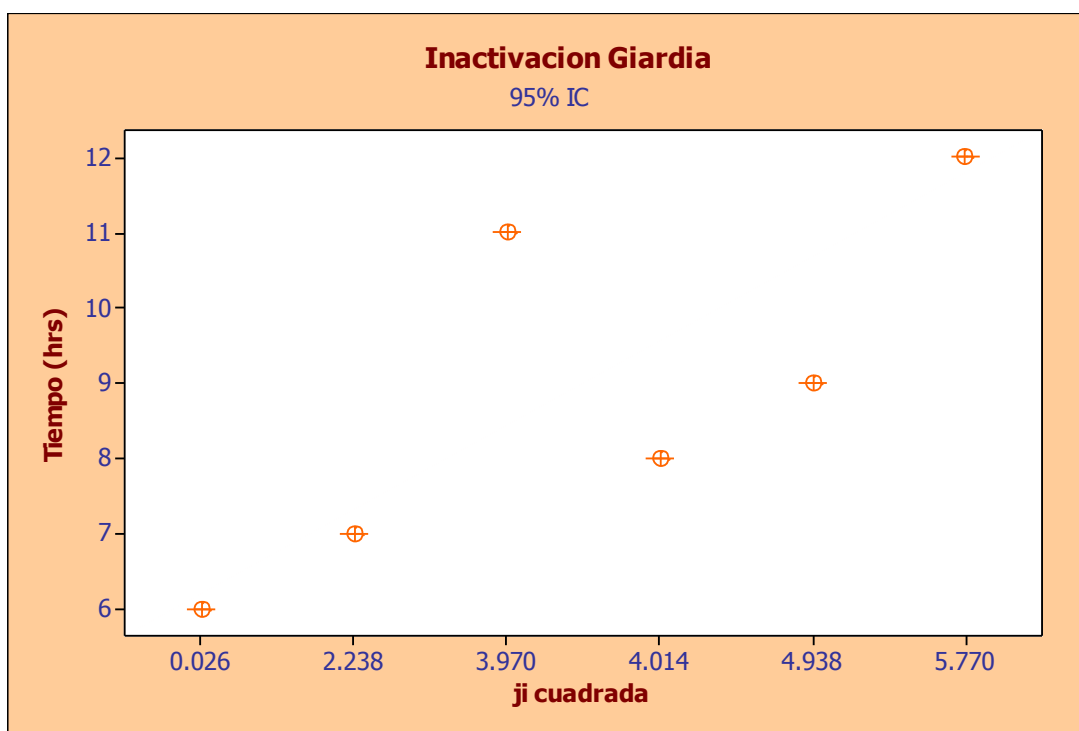


Figura 15. Análisis  $X^2$  para viabilidad en quistes de *Giardia lamblia*.

### 6.2.3. Coliformes totales y fecales.

La muestra inicial presento una concentración de coliformes totales 8 NMP, y a partir de las 6 horas de exposición a la radiación UV disminuyo hasta un valor de 0 NMP como se muestra en la figura 16.

La cantidad de microorganismos en la muestra inicial fue muy pequeña y posiblemente mucho antes de las 6 h los microorganismos estaban

inactivados; no se hicieron mediciones antes de las 6 h, ya que el propósito de la medición fue solo comparativo. Esto se debe a que las bacterias son más sensibles a la luz UV que los parásitos, ya que estos microorganismos no presentan estructuras protección como quistes y ooquistes que tienen los parásitos. Se ha reportado en estudios anteriores que el uso de la radiación UV como método de desinfección inactiva las bacterias hasta en un 99% de todas las muestras analizadas a partir de las 6 h de exposición a la radiación solar (Guerra-Diaz et. al, 2001; Martin-Dominguez et. al, 2005).

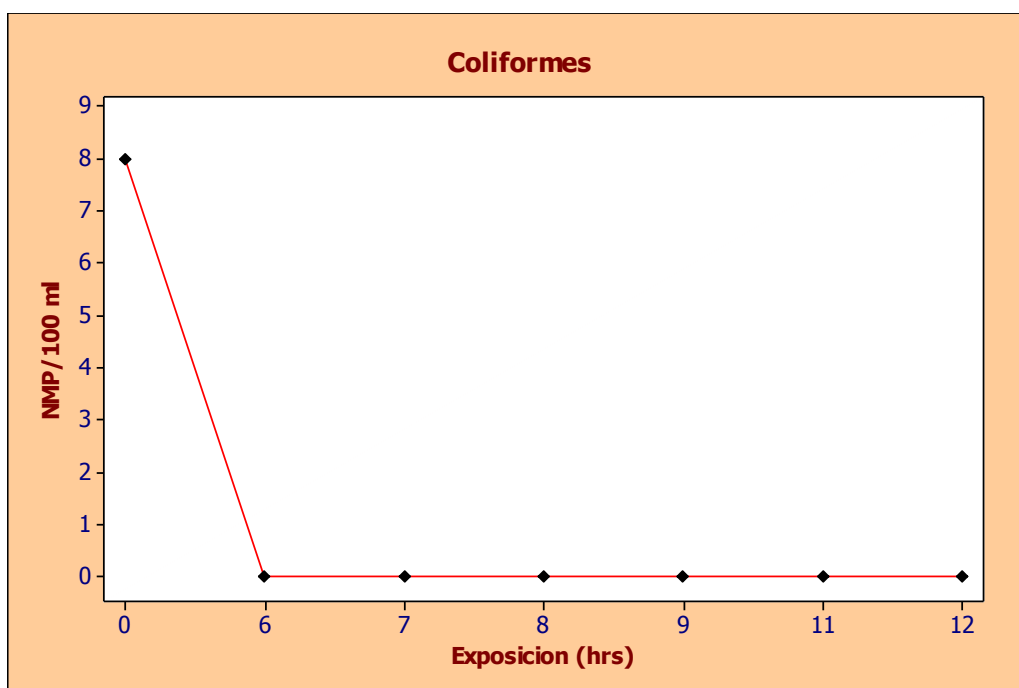


Figura 16. Comportamiento de coliformes a la exposición de radiación UV.

### 6.3. Respuesta de los microorganismos a dosis de radiación UV.

La dosis puntual requerida para que se presente una disminución en la viabilidad de los parásitos fue de 250 mWs/cm<sup>2</sup> bajo las condiciones del experimento, lo cual coincide con lo reportado en la literatura por diferentes autores. Morita y col. (2002), realizó un estudio en donde se analizó la viabilidad y grado de infección en ratones obteniendo como resultado que la dosis requerida para alterar la viabilidad es hasta 200 veces mas alta (230 mWs/cm<sup>2</sup>) que la dosis requerida para disminuir la infectividad 1.92 mWs/cm<sup>2</sup>.

A dosis más elevadas (20 – 30 mJ/cm<sup>2</sup>) el efecto de inactivación se mantiene estable (Mofidi et. al, 1999; Shin et. al, 1999).

## VII. CONCLUSIONES.

Se determino la presencia-ausencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* mediante el uso de métodos rápidos en muestras de agua sintética.

Durante el muestreo realizado en la ciudad de Chihuahua no se obtuvo presencia de parásitos en el agua lo que pudo deberse a la cantidad de agua filtrada en cada punto muestreado.

La técnica de tinción con Yoduro de Propidio resulto ser la mas adecuada para determinar la viabilidad de *Cryptosporidium* y *Giardia* por ser la mas fácil de manipular requiere de un menor tiempo de incubación a comparación de DAPI.

La desinfección del agua con luz ultravioleta es un método alternativo viable que puede ser utilizado a nivel familiar.

El uso de lámparas germicidas de baja y mediana presión puede ser considerado como fuente de luz UV en la desinfección de agua para consumo humano tanto para bacterias (Coliformes) como parásitos (*Cryptosporidium* y *Giardia*).

En el caso de parásitos (*Cryptosporidium* y *Giardia*), se determino que a partir de las 8 h de exposición, utilizando un concentrador parabolico, se logra una reducción significativa en la viabilidad de dichos microorganismos lo que nos indica que el uso de luz UV se puede usar como método de desinfección.

La dosis puntual minima de radiación para lograr la inactivación de los microorganismos fue de  $250\text{mWs/cm}^2 \sim 1\text{mJ/cm}^2$  la cual se adquirió a partir de las 8 h de exposición.

## **VIII. RECOMENDACIONES.**

Es importante tomar en cuenta el fenómeno de la fotoreactivación de los parásitos y llevar a cabo diferentes pruebas para ver el periodo de inactivación en ambos parásitos.

Debido a que se requiere un número bajo de estos parásitos para causar una infección y que ambos parásitos pueden permanecer viables tanto en agua como en superficie por periodos largos de tiempo y condiciones ambientales extremas, se recomienda llevar a cabo diferentes monitoreos de ambos microorganismos tanto en cuerpos de abastecimiento de agua potable y reciclada, como en la población además de implementar nuevas estrategias que permitan reducir su presencia en agua para disminuir el riesgo de contaminación o de epidemias.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Block SS. 1991. Disinfection, sterilization and preservation. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
2. Bolson JR. 1999. Light compendium-ultraviolet: principles and applications. USEPA. Newsletter, n. 66, p. 9-37.
3. Bull RJ, Kopfler FC. 1991. Health effects of disinfectants and disinfection byproducts, American Water Works Association Research Foundation, Denver, CO.
4. Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocyst: Correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3488-3493.
5. Casemore D. (1990). Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.* 104 1-28.
6. Center for Disease Control. 2009. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Cryptosporidiosis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Cryptosporidiosis_il.htm).
7. Centro para la Prevención de Enfermedades (CDC). 2004. Tecnologías Alternativas para el Tratamiento del Agua. Manual del Sistema de Agua Segura. Departamento de Saludo y Servicios Humanos. [http://www.cdc.gov/spanish/agua-segura/s-alt\\_water.htm](http://www.cdc.gov/spanish/agua-segura/s-alt_water.htm)
8. Comisión Nacional del Agua. 2004. Estadísticas del Agua en México. Un producto del Sistema Unificado de Información Básica del Agua (SUIBA).
9. Comisión Nacional del Agua. 2007. Estadísticas del agua en México. Un producto del sistema unificado de información básica del agua.

10. Craik SA, Weldon D, Finch GR, Bolton JR, Belosevic M. 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst using medium and low pressure ultraviolet radiation. *Wat. Res.* 35, p. 1387-1398.
11. Díaz-Cinco M, Leyva-Michel E, Mata-Haro V, González-Ríos H. 2003. Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de Ciudad Obregón, Sonora, México.
12. Doménech, J. 2003. *Cryptosporidium* y *Giardia*, problemas emergentes en el agua de consumo humano. *OFFARM*. Vol 22 Núm 11.
13. Dunlop PSM, Byrne JA, Manga N, Eggins BR. 2002. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 148(1-3), 355-363.
14. Environmental Protection Agency. 1992. *R.E.D. Facts: Silver*. Office of Prevention, Pesticides And Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., H-7508W
15. Environmental Protection Agency. 1999. Folleto informativo de tecnología de agua residual.
16. Environmental Protection Agency. 2001. *Drinking water standards*. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
17. Fayer R, Morgan U, Upton JS. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*. 30:1305-1322.
18. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. 1995. DNA repair and mutagenesis. American Society of Microbiology. Washington DC. 628 p.
19. Gelover S, Gomez LA, Reyes K, Leal MT. 2006. A practical demonstration of water disinfection using TiO<sub>2</sub> films and sunlight. *Instituto Mexicano del Agua. Water Research*. 40, 3274-3280.
20. Gassman L, Schwartzbrod J. 1991. Wastewater and *Giardia* cyst. *Water Sci. Technol.* 24: 183-186.
21. Gleick PH. 2004. *Worlds Water 2004-2005*. Island Press. Washington DC, 2004, p.1.

22. Guerra-Díaz L, Gómez-Infante D, Sarmiento-Sera A. 2001. Desinfección del agua con luz ultravioleta y energía solar fotovoltaica. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 22, p. 36-38.
23. Hooper, G. 1987. Chemical disinfection, in Lorch, W., (Ed.) *Handbook of water purification*. Second ed.. Ellis Horwood Series in Water and Wastewater Technology. Chichester, Inglaterra.
24. Hoxie, N.J., Davis, J.P., Vergeront, J.M., Nashold, R.D. and Blair, K.A. (1997) Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Public Health* 87, 2032–2035.
25. © IDEXX Laboratories, Inc. 2006. Colilert®. <http://al.idexx.com/agua/colilert/>.
26. Jones KH, Senft JA. 1985. An improved method to to determine cell viability by simultaneous staining fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33, p. 77-79.
27. Joyce E. 2003. The development and evaluation of electrolysis in conjunction with power ultrasound for the disinfection of bacterial suspensions. *Ultrasonic Sonochemis.*, 10: 231-234.
28. Junta Central de Agua y Saneamiento. 2007. Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Gobierno del Estado de Chihuahua.
29. Kalumuck KM, Chanine GL, Hsiao CT, Choi JK. 2003. Remediation an disinfection of water using jet generated cavitation. Fifth international symposium on cavitation. Osaka, Japan, November 1-4.
30. King BJ, Hoefel D, Daminato DP, Fanok s, Monis PT. 2008. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1311-1323.
31. Laubusch EJ. 1971. *Water Quality and Treatment* (3<sup>rd</sup> ed.). New York: McGraw-Hill Book Company.



32. Linden KG, Darby JL. 1997. Estimating effective germicidal dose from medium pressure UV lamps. *Journal of Environmental Engineering*. 123, p. 1142-1149.
33. Linden KG, Shin GA, Faubert G, Cairns W, Sobsey MD. 2002. UV disinfection of *Giardia lamblia* cyst in water. *Environmental Science Technology*. 11, 2519-2522.
34. Ma P, Soave R. 1983. Three step stool examination for cryptosporidiosis in ten homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147:824-8.
35. MacKenzie, W.R., Schell, W.L., Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Hoxie, N.J., Kazmierczak, J.J. and Davis, J.P. (1995) Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis* 21, 57–62.
36. Mahvi, A.H., M.H. Dehghani and F. Vaezi, 2005. Ultrasonic technology effectiveness in total coliforms disinfection of water. *J. Appl. Sci.*, 5: 856-858.
37. Martín-Domínguez A, Fonseca-Moreno O, González Herrera A, Estrada Gasca CA, Alarcón Herrera MT, Martín Domínguez IR. 2005. Pilot study of water disinfection using solar concentrators in rural communities. *Water Supply*, 4:5-6, 147-155.
38. Martin-Dominguez A, Alarcon-Herrera MT, Martin-Dominguez IR, Gonzalez-Herrera A. 2005. Efficiency in the disinfection of water for human consumption in rural communities using solar radiation. *Solar Energy*, 78, p. 31-40.
39. McCarthy, Dave. 1993. *The Latest In UV Disinfection Technology*. Water Conditioning & Purification. U.S.A.
40. McGuigan KG, Mendez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Maza E, Kehoe SC, Boyle M, Sichel C, Fernandez-Ibañez P, Meyer BP, Ramalingham S, Meyer EA. 2006. Batch solar disinfection inactivates

- oocyst of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 453-463.
41. McLoughlin OA, Fernandez-Ibañez P, Gernjak W, Rodriguez M, Gill LW. 2004. Photocatalytic disinfection of water using low cost parabolic collectors. *Solar Energy* 77, 625-633.
  42. Mendez-Hermida F, Ares-Mazas E, McGuigan K, Boyle M, Sichel C, Fernandez-Ibañez P. 2007. Disinfection of drinking water contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under natural sunlight and using the photocatalyst TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 88 (2007) 105–111.
  43. Meulemans C. 1987. The basic principles of UV-disinfection of water. *Ozone Sci. Engng.* 9, p. 299-314.
  44. Mofidi AA, Baribeu H, Green J. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* with polychromatic uv systems. In American Water Works Association Water Quality Technology Conference. American Water Works Association, Tampa, FL.
  45. Mofidi AA, Meyer EA, Wallis PM, Chou CI, Meyer BP, Ramalingam S, Coffey BM. 2002. The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity. *Water research*, 36, p. 2098-2108.
  46. Mora, D. (1996). Situación del agua de consumo humano y evacuación de excretas en América Latina y el Caribe. Reunión Regional sobre la Calidad del Agua Potable. Lima, CEPIS. Minitab Inc., 2005. MINITAB® Statistical Software Release 14. State College, Pennsylvania.
  47. Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M. 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2002. Nov;68(11):5387-93.
  48. Neethling JB, Johnson KM, Jenkins D. 1985. Using ATP to determine the chlorine resistance of filamentous bacteria associated with activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57 (8), p. 890-894.

49. Neppiras, E.A., 1980. Acoustic Cavitation. *Phys. Rep.*, 61: 159-251.
50. NOM-127-SSA1-1994. 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
51. Organización Mundial de la Salud. 2004. Guías para la calidad del agua potable.
52. O.P.S. Organización Panamericana de Salud. 1986. Informe del Comité sobre Enfermedades Infecciosas. Vigésima Edición. P 202-204.
53. PAHO (Pan American Health Organization). Haiti: basic country health profiles, summaries 1999. <http://www.paho.org/english/sha/prflhai.htm> (cited 9 February 2001), 1999.
54. Reiff F, Witt V. 1995. Guía para la selección y aplicación de tecnologías de desinfección del agua para consumo humano en pueblos pequeños y comunidades rurales en América Latina y el Caribe. Documento OPS/OMS, Serie Técnica No. 30.
55. Reynolds K. 2001. Introducción a las enfermedades microbianas a través del agua. Agua Latinoamericana.
56. Rincon AG, Pulgarin C. 2007. Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> solar-light assisted inactivation of E. coli at field scale. Implications in solar disinfection at low temperature of large quantities of water. *Catalysis Today*, 4964-4972.
57. Rojas-Valencia MN, Orta-de-Velásquez MT, Vaca-Mier M and Franco V. 2004. "Ozonation By-products Issued From the Destruction of Microorganisms Present in Wastewaters Treated for Reuse" *Wat. Sci. Tech.* Vol. 50, No. 2, pp. 187-193.
58. Salih, F.M., 2002. Enhancement of solar inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *J. Appl. Microbiol.* 92 (5), 920–926.
59. Sánchez, R.J. (2002). Origen infeccioso de *Cryptosporidium parvum*. *Rev. Mex Puer Ped.* 9, pp. 146-151.

60. Shin GA, Linden K, Handzel T, Sobsey MD. 1999. Low pressure UV inactivation of *Cryptosporidium parvum* based on cell culture infectivity. In American Water Works Association Water Quality Technology Conference. American Water Works Association, Tampa, FL, October 31-November 3. American Water Works Association, Denver CO.
61. SODIS FUNDACIÓN, 1998. Notas Técnicas de la No. 1 a la 17. Internet [www.sodis.ch](http://www.sodis.ch). Cochabamba-Bolivia.
62. Solarte Y, Peña M, Madera C. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb Med* 2006;37(1):74-82.
63. Solsona, F. 2001. Water disinfection for small community supplies. Capitulo sobre desinfeccion del agua para el manual de la IRC "Small Community Supplies". OPS/CEPIS. (2001).
64. Tyzzer, E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 5:12-13.
65. Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F. and Metzler, A. (1994) Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *J Water SRT Aqua* 43, 154–169.
66. Whitby, E. 1993. The Effect of UV Transmission, Suspended Solids and Photoreactivation on Microorganism in Wastewater Treated with UV Light, *Wat. Sci. Tech.* Vol 27, No. 3-4, pp 379-386. U.S.A.
67. White GC. 1999. *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*, 4th Ed., Wiley, New York, 637, 1205.
68. World Health Organization. 1993. *Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd Edition*. World Health Organization, Geneva.
69. World Health Organization. 2002. Heterotrophic Plate Count Measurement in Drinking Water Safety Management. Water, Sanitation and Health. Department of Protection of the Human Environment. Geneva.
70. WHO (2004). *Guidelines for Drinking-water Quality 2004* (3rd Ed.). Geneva: World Health Organisation.

## **X. ANEXOS**

### **10.1. Métodos analíticos.**

#### **10.1.1. Tinción Kinyoun.**

El método de tinción de Kinyoun utiliza altas concentraciones de carbol fucsina básica y fenol para facilitar la penetración del colorante a las células. El aumento en la concentración de estos dos componentes evita la necesidad del calentamiento de la laminilla (debido a esto también se le conoce como Tinción en frío). El Carbol fucsina básica se utiliza como tinción base, seguido por el alcohol ácido como agente decolorante, y el azul de metileno como contraste. Los microorganismos aparecen de color rosa y rojo sobre un fondo azul pálido.

1. Hacer un frotis.
2. Dejarlo en el puente de tinción y fijar con metanol
3. Aplicar fucsina 5 min
4. Enjuagar
5. Decolorar con alcohol ácido 2 min o hasta que no escurra colorante y lavar con chorro de agua
6. Teñir con azul de metileno 1 min y lavar.
7. Secar y observar

#### **10.1.2. Ultrafiltración.**

La filtración por medio de ésta técnica se basa en la separación por exclusión de tamaño, mediante una membrana. El agua es filtrada a través de un mecanismo de filtración tangencial; este proceso consta de una corriente paralela a la membrana impulsada por una fuerza motriz de velocidad constante que permite que ciertas partículas cuyo tamaño sea menor que el diámetro de poro atraviesen la membrana ésta fracción es denominada permeado. El resto del agua, aquella que no atraviesa la membrana, se denomina concentrado y es donde se encuentran las partículas sólidas suspendidas que no logran atravesar el filtro. Cuando se realiza una filtración tangencial, el agua entrante es reciclada. La velocidad del flujo de agua paralelo a la membrana es relativamente alta. El propósito de éste flujo es el control del grosor de la capa. Como consecuencia de la velocidad a la que fluye

el agua, las fuerzas de flujo son altas, lo que permite que los sólidos suspendidos sean arrastrados por el flujo del agua.

### **10.1.3. Protocolo equipo IDEXX Filta-Max.**

#### **A) Primer lavado.**

1. Separar la cabeza del émbolo removible usando la herramienta proporcionada y asegurarse de que el lubricante se aplique al exterior del anillo.

2. Retirar la placa anti salpicaduras.

3. Asegurarse de que el soporte poroso esté en su lugar, en la base del tubo del concentrador y colocar una membrana de 73 milímetros plana en la base del concentrador con los revestimientos de la superficie áspera para arriba.

4. Poner la base del concentrador en las quijadas de la estación de lavado. Asegurarse de que la manija del émbolo sea bloqueada en su posición más alta.

5. Ensamblar el tubo del concentrador en la base, creando un sello hermético en la membrana, y después retirar el tubo concentrador ensamblado en la estación de lavado.

6. Sustituir el protector de chapoteo, unir la cabeza del émbolo usando la herramienta proporcionada y asegurarse de que la manija del émbolo esté completamente trabada hacia abajo.

7. Remover filtro del portafiltro y verter el líquido dentro del tubo concentrador ensamblado.

8. Enjuagar el portafiltro con agua destilada, agregando el agua del lavado al tubo concentrador ensamblado.

9. Trabar la cabeza del émbolo en su posición más alta y atornillar el filtro en la cabeza del émbolo.

10. Poner la base del tubo de lavado en las quijadas de la estación de lavado y atornillar el tubo de lavado firmemente en el lugar.

11. Tirar hacia abajo la manija del émbolo hasta que el filtro se sienta en el fondo del tubo de lavado. El perno de cerrado (en la izquierda superior de la estación de lavado) debe hacer click para trabar el filtro en la posición.

12. Insertar la llave Allen a través del agujero en la base del tubo de lavado y retirar el perno del filtro.

13. Unir el tubo de acero inoxidable, (sin el tapón de goma) a la base del tubo de lavado.

14. Agregar 600 mL de PBST (buffer salino fosfato, 0.01% Tween 20) al tubo del concentrador. Si han sido más de 50 ml del líquido recuperado del filtro, por consiguiente reducir el volumen de PBST

15. Atornillar el tubo concentrador ensamblado en la base debajo del tubo de lavado soltando el broche de cerrado en la estación de lavado.

NOTA: Se puede necesitar aplicar presión en la manija del émbolo mientras se tira del broche de cerrado.

16. Lavar el filtro moviendo el émbolo de arriba hacia abajo 30 veces, mover el émbolo muy suavemente y por completo para evitar la generación de espuma en exceso.

17. Separar el tubo concentrador y sostenerlo directamente debajo del tubo del acero inoxidable.

18. Expeler el líquido restante del tubo de limpieza comprimiendo la espuma cinco veces.

19. Colocar el tapón de goma en el extremo final del tubo de acero inoxidable.

B) Primera concentración.

1. Colocar el tubo concentrador ensamblado en una placa de agitación magnética, unir la barra magnética del agitador y comenzar a agitar.

2. Conectar la bomba de mano en el tubo más corto que sale de la boca de la botella así como también conectar el tubo más largo en la llave de drenado del tubo concentrador ensamblado

3. Abrir la llave de drenado.

4. Aumentar el vacío usando la bomba de mano.

NOTA: La fuerza del vacío no debe exceder 30 cm Hg.

5. Permitir que el líquido drene hasta que la botella se llene a su nivel y después cierre la llave de drenado.

NOTA: No drenar todo el líquido. Ya que los ooquistes y los quistes pueden estar suspendidos en el líquido sobre la membrana.

6. Separar la bomba de mano de la llave de drenado, retirar el agitador magnético y enjuagarlo, sobre el tubo concentrador ensamblado, con agua destilada para recuperar todos los ooquistes.

7. Decantar el concentrado del tubo concentrador ensamblado en un tubo de 50 ml.

8. Enjuagar el interior del tubo concentrador ensamblado con agua destilada y agregar el agua al tubo de 50-mL.

NOTA: La membrana de 73 mm usada en el paso de la concentración, solamente se utiliza para facilitar la reducción en el volumen del buffer de lavado sin la necesidad de la centrifugación. No se utiliza para capturar a los microorganismos buscados, éstos deben seguir suspendidos en el buffer intermediario sobre la membrana.

#### C. Segundo Lavado

1. Agregar 600 ml de PBST al tubo concentrador ensamblado.

2. Quitar el tapón de goma del extremo final del tubo de acero.

3. Atornillar el tubo concentrador ensamblado en la base del tubo de lavado.

4. Lavar el filtro moviendo el émbolo completamente de arriba hacia abajo 10 veces moviendo el émbolo muy suavemente para no generar un exceso de espuma.

5. Separar el tubo concentrador ensamblado y sostenerlo directamente debajo del tubo del acero inoxidable.

6. Expeler el líquido restante del tubo de lavado comprimiendo 5 veces la espuma.



7. Colocar el tapón de goma en el extremo final del tubo de acero inoxidable.

8. Agregar el concentrado que se conservó de la primera lavada al los 600 mL del segundo lavado.

D) Segunda concentración.

1. Colocar el tubo concentrador ensamblado en una placa de agitación magnética, unir la barra magnética del agitador y comenzar a agitar.

2. Conectar la bomba de mano en el tubo más corto que sale de la boca de la botella así como también conectar el tubo más largo en la llave de drenado del tubo concentrador ensamblado

3. Abrir la llave de drenado.

4. Aumentar el vacío usando la bomba de mano.

NOTA: La fuerza del vacío no debe exceder 30 cm Hg.

5. Permitir que el líquido drene hasta que la botella se llene a su nivel y después cierre la llave de drenado.

NOTA: No drenar todo el líquido. Ya que los ooquistes y los quistes pueden estar suspendidos en el líquido sobre la membrana.

6. Separar la bomba de mano de la llave de drenado, retirar el agitador magnético y enjuagarlo, sobre el tubo concentrador ensamblado, con agua destilada para recuperar todos los ooquistes.

7. Decantar el concentrado del tubo concentrador ensamblado en un tubo de 50 ml (el mismo tubo de 50mL usado para conservar el primer concentrado puede ser utilizado).

8. Enjuagar el interior del tubo concentrador ensamblado con agua destilada y agregar el agua al tubo de 50mL.

9. Separar el tubo concentrador de la base del concentrador.

NOTA: Si tiene dificultad para remover tubo concentrador, insertar la base del concentrador en las quijadas de la estación de lavado.

10. Usando el fórceps, remover la membrana y colocarla en el bolsa proporcionada.

11. Agregar 5 ml de PBST, sellar el bolso y frotar la superficie de la membrana entre tu dedo pulgar aproximadamente un minuto.

12. Usando una pipeta, retirar el líquido y agregarlo a la muestra concentrada en el tubo de 50 mL.

NOTA: Para las aguas altamente turbias, más de una membrana puede ser utilizada. Si las membranas adicionales se utilizan para el paso de la concentración, ellas pueden ser colocadas en la base del concentrador, con el lado liso hacia arriba.

## **10.2. Mantenimiento y limpieza**

Los componentes Filta-Máx se deben limpiar y mantener correctamente para evitar la contaminación y para asegurar la longevidad del equipo.

### **10.2.1. Mantenimiento**

Cheque todos los anillos de goma para evitar el desgaste o la deterioración en cada uso, cada reemplazo de los anillos deberán ordenarse como sea necesario a IDEXX.

Lubricar el anillo de la cabeza del émbolo con un lubricante a base de silicón antes de cada uso.

Lubricar los otros anillos (el del tubo concentrador y tapa del portafiltro) regularmente como medida de preservación.

### **10.2.2. Limpieza**

Todos los componentes del sistema Filta-Máx se pueden limpiar usando el agua caliente y detergente del laboratorio. Después de lavarse, enjuagar todos los componentes con agua del reactivo-grado y secarlos. Relubricar todos los anillos. Alternativamente un ciclo suave del lavaplatos a ( $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ) sin ayuda del blanqueo o del enjuague puede ser utilizado.

Lavar la cabeza desmontable del émbolo como sigue:

1. Resbalar el perno de fijación hacia fuera.

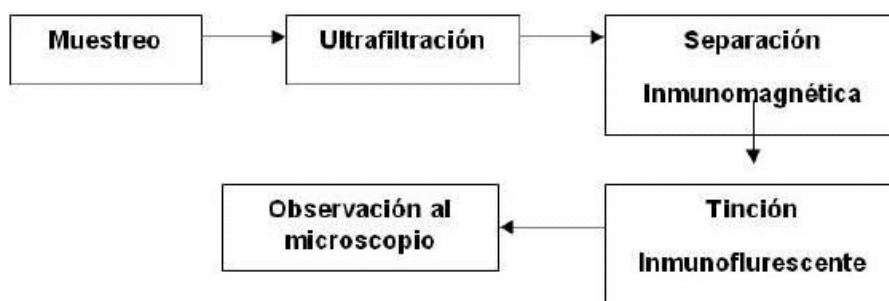
2. Usando agua caliente y el detergente de laboratorio lavar la cabeza del émbolo y el perno de fijación.

3. Enjuagar la cabeza del émbolo y el perno de fijación con agua del reactivo-grado y secarlos.

4. Lubricar ligeramente el perno de fijación y volver a montar la cabeza del émbolo.

5. Lubricar el anillo de la cabeza del émbolo adentro y hacia fuera.

La técnica empleada para evaluar la presencia de éstos parásitos en el agua está basada en la concentración de 10 litros de agua por ultrafiltración y la separación Inmunomagnética de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* con tinción posterior con inmunofluorescencia para la identificación de los parásitos según el método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de Estados unidos (EPA). Las fases del proceso de describen brevemente en el siguiente esquema.



Técnica empleada para evaluar la presencia de *Cryptosporidium* spp y *Giardia* sp, según el método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de Estados unidos (EPA), 2000.

### 10.3. Técnica Inmuno-Magnética (IMS) para separación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp y quistes de *Giardia* spp.

La pared celular consta de epítomos (parte antigénica) que es aprovechada en esta técnica ya que en ellas se unen los anticuerpos monoclonales, los cuales recubren las partículas paramagnéticas, es decir, las partículas sensibles a la acción de campos magnéticos. Éstas partículas cargadas con anticuerpos se unen a los quistes, y al ser aplicado a un campo magnético, permite que el complejo se una a la pared lateral del recipiente que

los contiene, permitiendo así la posibilidad de eliminar todo aquel residuo y contaminante extraño de la muestra. Es posible llevar a cabo la disociación de las partículas mediante fuerzas químicas y mecánicas para que una vez separadas, nos permita obtener como resultado los ooquistes purificados.

Procedimiento.

1.- Se utilizan los 250 mL resultantes del agua filtrada y se reparten en 5/8 tubos de centrifuga y se centrifugan 20 minutos a 5000 rpm.

2.- Resuspender los sedimentos en agua, hasta un volumen final de 5 mL en un tubo con tapón de rosca.

3.-Adicionar 5 mL del amortiguador del kit IMS a los 5 mL de la muestra, mas 100  $\mu$ L del reactivo conteniendo partículas paramagnéticas con Ac específicos contra *Cryptosporidium* y *Giardia*.

4.- Colocar el tubo en un orbitador durante una hora a temperatura ambiente.

5.- Magnetizar la muestra, colocando el tubo en el magneto durante un minuto.

6.- Eliminar el sobrenadante.

7.- Resuspender las partículas con 1 mL de amortiguador IMS para lavar y transferir a tubo de 1.5 mL, magnetizar de nuevo y eliminar el sobrenadante.

8.- Adicionar 1 mL de amortiguador para lavar y se magnetiza de nuevo. Eliminar el sobrenadante.

9.- Disociar las partículas adicionando 50  $\mu$ L de HCl (0.1M) durante 10 minutos. Mezclar en el Vortex cada 2 minutos.

10.- Magnetizar de nuevo y guardar el sobrenadante, transfiriéndolo a otro tubo eppendorf. Eliminar las partículas.

11.- Neutralizar con 5  $\mu$ L de NaOH 1N.

12.- Adicionar 145  $\mu$ L del amortiguador salino de fosfatos.

13.- Los quistes separados quedan listos para la tinción con inmunofluorescencia.

#### **10.4. Técnica de Tinción Inmunofluorescente con los reactivos A100FLK, Acua - Glo G/C. Waterborne Inc, usado por la EPA 1623.**

1.- Se monta la membrana del filtro de acetato de celulosa con apertura de poro de 0.8  $\mu$  y de 13 mm de diámetro un recipiente con 4.5 ml de PBS 1x y se monta el equipo de filtración de acero inoxidable (filtro de jeringa) apretando con la pinza y se monta en el soporte.

2.- Se le agrega 1ml de suero bovino al 1% (200  $\mu$ m 5 veces, drenando con vacío cada vez).

3.- Coloque 200  $\mu$ m aprox. de la muestra de agua obteniendo los ooquistes, resultante de la inmunomagnetoseparación, y drenar.

4.- Bajar el equipo de filtración del soporte y añadir 200uL de anticuerpo: reactivo A100 FLR Working Dilution 1 x (la solución Stock puede diluirse con BSA). No drenar. Tapar la boca y el extremo inferior con papel aluminio por 45 min a temperatura ambiente.

5.- Lavar con PBS, 1 min poco a poco con 3 a 5 ml de PBS (200  $\mu$ L cada vez).

6.- Aplique una gota del reactivo Counterstain por 1 min, y drene.

7.- Enjuague con PBS 1 min poco a poco con 3 a 5 ml de PBS (200  $\mu$ L cada vez).

8.- Baje el equipo de filtración del soporte, separe la membrana del filtro con mucho cuidado mediante unas pinzas y colóquelo en un portaobjetos excavado.

9.- Adicione una gota de reactivo Fade Mounting y coloque encima un cubreobjetos. Selle con barniz de uñas.

10.- Observe al microscopio de fluorescencia

#### **10.5. Tinción con Yoduro de Propidio.**

El PI es un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos incrementando sensiblemente su fluorescencia. La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente nos teñirá las células que tengan dañada su membrana (muertas) y los núcleos aislados.

Procedimiento.

Yoduro de propidio (0.5 mg/ml).

Disolver 25 mg de yoduro de propidio en 50 ml de PBS-azida. Conservar a 4 grados protegido de la luz.