



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obtención de las constantes cinéticas y diseño de
una cámara de contacto con ozono para la
desinfección de *Helicobacter pylori* en solución
acuosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Ingeniera Química

PRESENTA
Lidia Alicia López Vega



México, Ciudad de México.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Víctor Manuel Luna Pabello

VOCAL: Prof. José Landeros Valdepeña

SECRETARIO: Prof. María Teresa Orta Ledesma

1^{er} SUPLENTE: Prof. Carlos Alberto Sagredo Suazo

2^o SUPLENTE: Prof. Alejandra Mendoza Campos

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Ingeniería, UNAM.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Teresa Orta Ledesma

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Isaura Yáñez Noguez

SUSTENTANTE:

Lidia Alicia López Vega



Este trabajo se realizó con apoyo del CONACYT a través del proyecto “Desinfección eficaz de agua con presencia de bacterias emergentes resistentes (*Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*) evaluando las formas viables no cultivables mediante técnicas moleculares” el cual pertenece al programa de desarrollo científico para atender problemas nacionales 2014, con número de solicitud 247605.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) con registro RSGC 960 de fecha 11 de enero de 2016, vigente al 11 de enero de 2019”





RESUMEN

Las enfermedades transmitidas a través del agua representan un tema de interés global, ya que cada año provocan aproximadamente 502 000 muertes por diarrea e innumerables casos de enfermedades a nivel mundial; por lo que el abastecimiento de agua para uso o consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir dichas enfermedades. Algunos de los patógenos transmitidos a través del agua incluyen bacterias, virus y protozoarios. Se ha demostrado que diversas bacterias pueden sobrevivir en ambientes acuáticos o resistir a concentraciones de cloro residual comúnmente encontradas en los sistemas de distribución domésticos, tal es el caso de *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria que en condiciones normales presenta una morfología espiral; sin embargo, bajo condiciones de estrés es capaz de entrar en un estado denominado viable no cultivable (VNC) y presentar una nueva morfología cocoide. Una vez que un organismo ha adquirido el estado VNC, su detección por medios convencionales de cultivo se vuelve inútil, lo que puede dar lugar a falsos negativos en los análisis de muestras de agua contaminadas. Por lo que la detección debe llevarse a cabo con métodos moleculares, los cuales no dependen del crecimiento de los microorganismos.

La desinfección es la eliminación o inactivación de bacterias, virus y parásitos y es una operación de suma importancia para el suministro de agua potable. Se pueden emplear diferentes tecnologías de desinfección para lograr un buen nivel de inactivación de patógenos. Sin embargo actualmente la aplicación de ozono en el tratamiento de agua potable es una tecnología usada en países desarrollados.

Con la finalidad de proponer el uso del ozono en sistemas de distribución de agua, en la presente tesis se diseñó una cámara de contacto que permitiera inactivar en un 99.99% *H. pylori* en su estado VNC. Se estudió la aplicación de ésta tecnología en agua contaminada sintéticamente, con una concentración de 10^5 células·mL⁻¹ de *H. pylori*. Se encontró que para lograr el porcentaje de inactivación requerido de *H. pylori* en estado VNC, se requiere de una concentración de ozono de 0.84 min·mg·L⁻¹ y una constante de velocidad de -1.44min^{-1} . Para tratar un flujo de agua de $1\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ las dimensiones requeridas de la cámara deben ser 13.5m de largo por 9.00m de ancho, con una altura de 5.00m. Los resultados obtenidos muestran que *H. pylori* cuenta con una mayor resistencia a la desinfección, lo cual fue comparado con lo reportado en la bibliografía para otros microorganismos tales como *Giardia*.

Se pretende que los resultados obtenidos sirvan de base para proponer ésta tecnología de desinfección como estrategia para proveer de agua limpia y segura a la población.



Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Particulares.....	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Calidad del agua	6
3.1.1 Evaluación de la calidad del agua.....	8
3.1.2 Contaminantes patógenos	9
3.2 <i>Helicobacter pylori</i>	13
3.3 Estado Viable No Cultivable	19
3.4 Métodos de detección de patógenos en el agua.....	21
3.4.1 Ácidos Nucleicos.....	23
3.5 Desinfección de agua	26
3.5.1 Cloración	27
3.5.2 Dióxido de cloro	27
3.5.3 Cloraminación.....	27
3.5.4 Radiación Ultravioleta (UV).....	28
3.5.5 Ozonización	28
3.6 Desinfección de agua con ozono.....	30
3.6.1 El ozono.....	30
3.6.2 Cinética de la desinfección	33
3.6.3 Ingeniería de la desinfección con ozono	39
4. METODOLOGÍA.....	47
4.1 Microbiología.....	48
4.1.1 <i>H. pylori</i> en estado viable.....	50
4.1.2 <i>H. pylori</i> en estado VNC.....	50
4.2 Desinfección.....	51
4.2.1 Diseño experimental	51
4.2.2 Unidad de oxidación	53
4.2.3 Proceso de desinfección	55





4.3	Análisis q – PCR	57
4.3.1	Recuperación de las muestras	57
4.3.2	Extracción de ADN	58
4.3.3	Ensayo de q – PCR	61
4.4	Cinética y cámara de contacto	63
4.4.1	Cinética	63
4.4.2	Cámara de contacto	63
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	65
5.1	<i>H. pylori</i> en estado viable	65
5.1.1	Ley de Chick	67
5.1.2	Modelo Chick – Watson	67
5.2	<i>H. pylori</i> en estado VNC	68
5.2.1	Ley de Chick	70
5.2.2	Modelo Chick – Watson	70
5.3	Propuesta de diseño de la cámara de contacto	74
5.2.1	Objetivo del proceso	74
5.2.2	Cantidad de ozono requerida	74
5.2.3	Diseño de la cámara de contacto	75
6.	CONCLUSIONES	79
7.	BIBLIOGRAFÍA	81





1. INTRODUCCIÓN

El agua salubre y fácilmente accesible es importante para la salud pública, ya sea que se utilice para beber, para uso doméstico, para producir alimentos o para fines recreativos (OMS, 2008).

La cantidad de agua dulce existente en la Tierra es limitada y su calidad está sometida a altas exigencias, dicha calidad puede verse comprometida por la presencia de agentes infecciosos, productos químicos tóxicos o radiaciones. Las enfermedades relacionadas con el consumo de agua incluyen aquellas causadas por microorganismos y sustancias químicas presentes en el agua potable (OMS, 2008).

La garantía de inocuidad microbiana en el abastecimiento de agua de consumo se basa en la aplicación, desde la cuenca de captación, de múltiples barreras para evitar la contaminación o para reducirla a niveles que no sean perjudiciales para la salud de los consumidores.

Sin embargo lo más frecuente es que sea necesario someter el agua a tratamiento para retirar o destruir los microorganismos patógenos, en muchos casos es preciso aplicar múltiples etapas de tratamiento, incluidas por ejemplo, la coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección.

El agua contaminada puede transmitir enfermedades como la diarrea, el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la poliomielitis, entre otras. Se calcula que la





contaminación del agua potable provoca más de 500 000 muertes por diarrea al año. Esto debido a que en todo el mundo 1.8 millones de personas se abastecen de una fuente de agua potable que se encuentra contaminada por heces (OMS, 2014).

El cáncer por ejemplo, se encuentra clasificado como enfermedad no transmisible sin embargo se asocian infecciones como factores de riesgo para su desarrollo, algunos ejemplos son: la Hepatitis B y la Hepatitis C asociadas ambas al cáncer de hígado; la infección por virus del papiloma humano asociada al cáncer de útero, y lo que concierne a éste trabajo, la infección por *Helicobacter pylori* asociada al cáncer de estómago. Alrededor del mundo más de dos terceras partes de las defunciones por cáncer se producen en países de ingresos bajos y medianos, y la mayoría de ellas se deben a cánceres de pulmón, de mama, de colon y recto, de estómago o de hígado (Estadísticas Sanitarias Mundiales OMS, 2012).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC por sus siglas en inglés (subdivisión de la OMS) declaró a la bacteria *H. pylori* como un cancerígeno humano de grado 1. En los tumores de grado 1 las células tumorales y la organización del tejido tumoral muestran una apariencia muy cercana a la normal, además de una evolución muy lenta.

H. pylori es una bacteria Gram negativa, que usualmente se encuentra en forma espiral, sin embargo cuando es sometida a un ambiente hostil puede cambiar a una forma celular distinta llamada cocoide (Moblely, 2001). En dicha forma la bacteria *H. pylori* no es cultivable por medio de técnicas ordinarias, es decir que entra en un estado viable no cultivable (Moreno *et al.*, 2003).

La epidemiología de la bacteria *H. pylori* muestra un comportamiento distinto en los países desarrollados que en los países que se encuentran en vías de desarrollo (Moblely *et al.*, 2001).



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar los parámetros de diseño para la obtención de las constantes cinéticas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, para el posterior diseño de un reactor de desinfección con ozono de agua contaminada con *Helicobacter pylori* en sus dos estados metabólicos (viable y viable no cultivable).

2.2 Objetivos Particulares

Establecer los parámetros de diseño para la obtención de las constantes cinéticas de la desinfección con ozono de *H. pylori* en estado viable y viable no cultivable.

Evaluar los efectos de la desinfección con ozono sobre la bacteria *H. pylori* en estado viable y viable no cultivable, por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (q-PCR por sus siglas en inglés).

Obtención de la constante cinética en la desinfección con ozono de la bacteria *H. pylori*.

Propuesta de diseño de una cámara de contacto para la desinfección de agua contaminada con *H. pylori*.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Calidad del agua

Se estima que en el 2012 perdieron la vida 12.6 millones de personas por vivir o trabajar en ambientes poco saludables, lo que representa casi una cuarta parte del total de las muertes en el mundo (OMS, 2016). Las enfermedades transmitidas a través del agua representan un tema de interés global que cada año provoca aproximadamente 502 000 muertes por diarrea e innumerables casos de enfermedades a nivel mundial (Centro de Prensa OMS, 2015). A pesar de la magnitud del problema es difícil monitorear los brotes epidémicos, y la información disponible tiende a ser una subestimación debido a la falta de sistemas de desinfección y vigilancia eficientes. Mientras tanto, la situación es alarmante ya que la calidad del agua va empeorando y ésta sigue siendo una de las principales causas de enfermedades y muertes, pues se estima que la mitad de la población de los países en vías de desarrollo como México, se encuentra expuesta a fuentes de agua contaminada (UNESCO, 2003).

Las causas son diversas, desde el incremento en la demanda, el aumento de la resistencia en los agentes patógenos a los procesos de desinfección, el aumento de la densidad poblacional y el crecimiento de la actividad económica que resulta en la descarga de residuos agrícolas, industriales y humanos en el agua, así como la creciente incidencia de desastres naturales relacionados con el agua como inundaciones, tormentas tropicales y tsunamis, los cuales tienen una enorme





repercusión en la vida y en los sistemas de abastecimiento de agua. Aunado a esto, se encuentra la creciente incidencia de nuevos patógenos emergentes asociados al agua, los cuales no sólo tienen la capacidad de crear nuevos brotes epidémicos, sino que han adquirido resistencia al ambiente o a diversos antibióticos, por lo que el agua limpia y segura es un recurso cada vez más escaso.

En muchos países los sistemas de abastecimiento de agua potable presentan un sinnúmero de problemas de continuidad, cantidad o calidad de agua, así como limitaciones de cobertura o confiabilidad de las unidades de desinfección. Específicamente, el agua de suministro para consumo humano puede provenir de una fuente subterránea (acuíferos) o superficial (ríos o lagos). Algunos acuíferos son más vulnerables a la contaminación que otros y se pueden ver afectados por un gran número de contaminantes que se han descargado en la superficie terrestre o la han atravesado. Los incidentes de contaminación están normalmente relacionados con vertidos provenientes de industrias; sin embargo, los problemas más persistentes tanto para las fuentes subterráneas como superficiales en lo que a contaminación se refiere, provienen de fuentes difusas generadas por la intensificación de los cultivos agrícolas o por las aguas residuales provenientes de los desarrollos urbanos e industriales (UNESCO, 2003). Por ello, es indispensable elaborar estrategias para el mejoramiento de la calidad del agua y la protección de la salud.

En la presente tesis se estudió la aplicación del ozono como tecnología para la desinfección de agua contaminada sintéticamente con una concentración de 10^5 células·mL⁻¹ de *H. pylori* en sus dos estados metabólicos (viable y viable no cultivable).

Se pretende que los resultados obtenidos sirvan de base para proponer ésta tecnología de desinfección como estrategia para proveer de agua limpia y segura a la población.





3.1.1 Evaluación de la calidad del agua

Los parámetros recomendados para el monitoreo mínimo de los sistemas de abastecimiento de agua comunitarios, son aquellos que permiten evaluar mejor la calidad higiénica del agua y por tanto su riesgo de transmisión de enfermedades. Los parámetros fundamentales en la evaluación de la calidad del agua son los siguientes:

- *E. coli* o la detección de coliformes termotolerantes (fecales).
- Cloro residual (en caso de practicar la cloración): El sabor del agua no permite juzgar de manera confiable la concentración de cloro que presenta, por lo tanto debe determinarse *in situ* mediante comparadores de color.
- pH: Mientras más alcalina sea el agua mayor será el tiempo de contacto necesario o mayor será la concentración de cloro libre residual al final del tiempo de contacto, necesario para lograr una desinfección adecuada (0.4 – 0.5mg/L a pH 6 – 8, que aumenta a 0.6mg/L a pH 8 – 9, con un pH superior a 9 la cloración puede ser ineficaz).
- Turbidez: Este parámetro afecta adversamente la eficiencia de la desinfección. Se mide para determinar qué tipo y nivel de tratamiento se requiere.

El abastecimiento de agua para uso o consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales entre otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características.

En México los límites permisibles para evaluar la calidad del agua para consumo humano son establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2000 que se refiere a: “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”.

Dicha norma plantea los límites permisibles relacionados con las características bacteriológicas, las características físicas y organolépticas, las características





químicas así como las características radiactivas. Sin embargo dentro del apartado “Límites permisibles de características bacteriológicas” únicamente se encuentran contemplados los coliformes totales y los coliformes fecales, dejando a la bacteria *H. pylori* fuera de regulación.

3.1.2 Contaminantes patógenos

Existen diversos tipos de agentes patógenos que pueden transmitirse por medio del consumo de agua contaminada. La gama de agentes patógenos cambia en función de factores variables como el aumento de las poblaciones de personas y animales, el incremento en la producción de aguas residuales, los cambios de los hábitos de la población, además de las migraciones o viajes de la población. También existe una considerable variabilidad en la inmunidad de las personas, ya sea adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada por factores como la edad, el sexo, el estado de salud y las condiciones de vida (OMS, 2008).

En la Tabla 1 se muestra una lista de algunos agentes patógenos transmitidos a través del agua y su importancia en los sistemas de abastecimiento según las Guías para la calidad del agua de la OMS, 2008.





Tabla 1 Agentes patógenos transmitidos a través del agua.

Agente Patógeno	Importancia para la salud	Presencia en los sistemas de abastecimiento de agua	Resistencia al cloro	Infectividad relativa	Fuente animal importante
Bacterias					
<i>Helicobacter pylori</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Si
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alta	Moderada	Baja	Moderada	Si
<i>Escherichia coli</i> patógena	Alta	Moderada	Baja	Baja	Si
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	Alta	Moderada	Baja	Alta	Si
<i>Legionella spp</i>	Alta	Prolifera	Baja	Moderada	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Moderada	Puede proliferar	Moderada	Baja	No
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baja	Baja	No
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	Baja	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Larga	Baja	Baja	Si
Virus					
Adenovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Enterovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Hepatitis A	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Hepatitis B	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencial
Norovirus y sapovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencial
Rotavirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Protozoos					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Si
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Si
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar	Alta	Alta	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Si
Helmintos					
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Moderada	Alta	No
<i>Sschistosoma</i> spp.	Alta	Corta	Moderada	Alta	Si
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Alta	Corta	Alta	Alta	No





La transmisión de los agentes patógenos hacia los humanos, a través del agua de consumo es uno de los vehículos; sin embargo además de éste existen otros, como los alimentos contaminados, las manos, los utensilios y la ropa. Como se muestra en la Figura 1 las vías de infección relacionadas al agua son tres diferentes: ingestión (bebidas), inhalación y aspiración (aerosoles), así como por contacto (baño); que se asocian a su vez a padecimientos gastrointestinales, respiratorios y dérmicos, respectivamente (OMS, 2008).

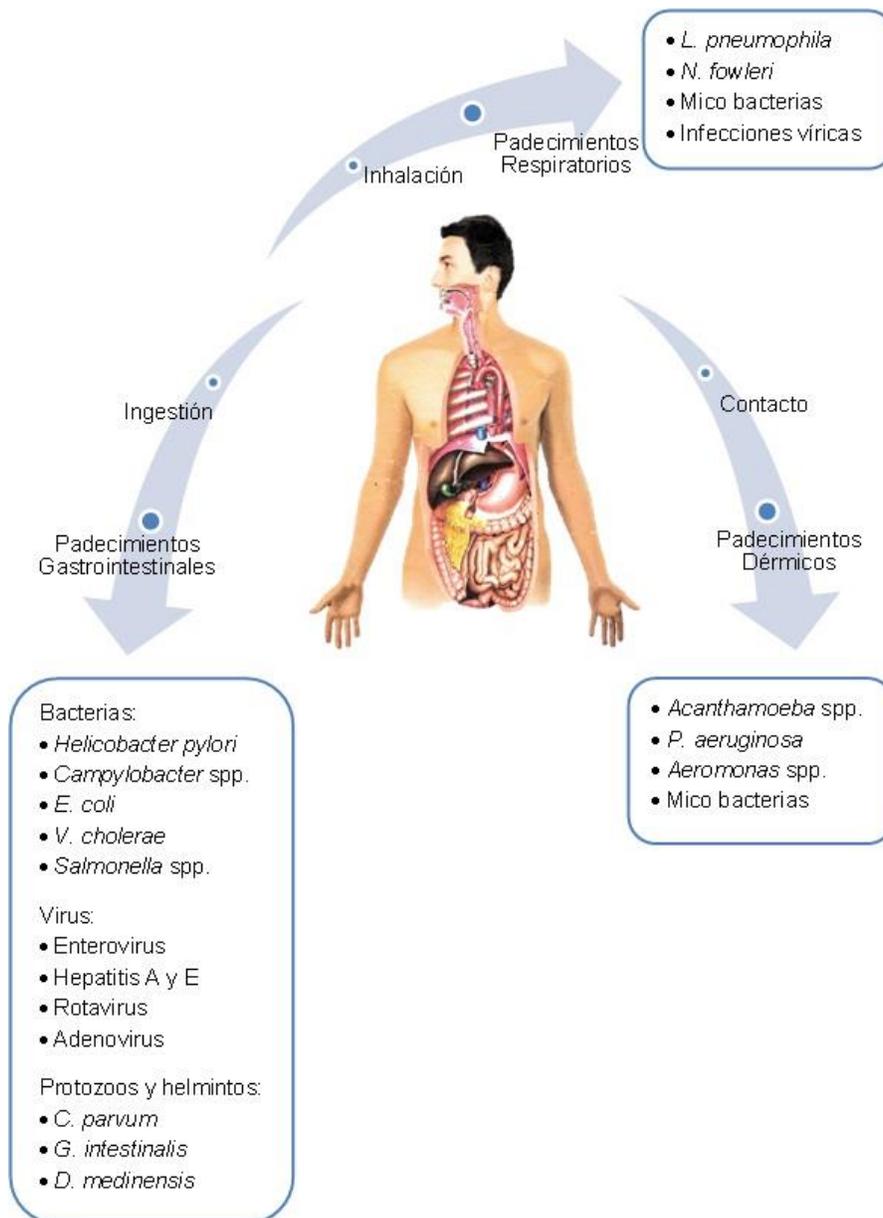


Figura 1 Vías de infección y padecimientos relacionados a diversos patógenos.





No obstante en la actualidad se observa frecuentemente la emergencia de nuevos patógenos confirmados como tal y nuevas cepas de patógenos ya establecidos, conocidos como patógenos emergentes, los cuales poseen infectividad alta y resistencia en ambientes adversos. Una enfermedad emergente es aquella que aparece en una población por primera vez o que, habiendo existido previamente, presenta un rápido incremento de su incidencia o de su distribución geográfica (OMS, 2016). Los cambios en los agentes causales explican la emergencia o reemergencia y se pueden deber a mecanismos de selección o mutación, o adaptación a nuevos huéspedes (Orta Ledesma, 2013) o incluso por la resistencia a desinfectantes comunes como el cloro (Gião, 2010).

En este contexto, es preciso mencionar que algunos de éstos patógenos emergentes incluyen bacterias, virus y protozoarios. Al respecto, se ha demostrado que diversas bacterias pueden sobrevivir en ambientes acuáticos hasta por 30 meses cuando se encuentran en biopelículas (Linke *et. al.*, 2010) o resistir a concentraciones de cloro residual comúnmente encontradas en los sistemas de distribución domésticos, tal es el caso de *Helicobacter pylori* (Baker *et. al.*, 2002).

Esto representa un problema de salud pública, impactando directamente la calidad del agua de consumo, sobre todo en ciudades con sistemas de distribución de agua complejos o en comunidades rurales con pozos como fuente de abastecimiento de agua potable; pues se estima que en todo el mundo, al menos 1800 millones de personas se abastecen de una fuente de agua contaminada por heces. En los países de ingresos bajos y medios, el 38% de los centros sanitarios carecen de fuentes de agua, el 19% de saneamiento mejorado y el 35% de agua y jabón para lavarse las manos. El agua contaminada puede transmitir enfermedades como la diarrea, el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la poliomielitis, por lo que se calcula que la contaminación del agua potable provoca más de 502 000 muertes por diarrea al año (OMS, 2016).





3.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, que usualmente se encuentra en forma espiral. Dicha bacteria presenta estructuras y características morfológicas como seis flagelos que facilitan su movilidad, producción de ureasa, secreción de fosfolipasa, producción de citotoxinas, así como la habilidad para adherirse a células objetivo; las cuales favorecen su penetración en la mucosa ocasionando colonizaciones en el antro gástrico así como en el duodeno humano (Lopes *et al.*, 2014).

La Figura 2 muestra una microscopía electrónica de la bacteria *H. pylori*, donde las barras en negativo indican una longitud de 0.05 μm (Moblely *et al.*, 2001).

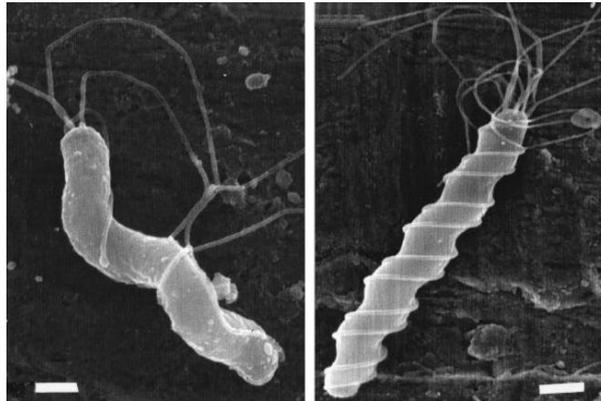


Figura 2 Microscopía electrónica de *Helicobacter pylori*

En el 2005 el premio Nobel en la rama de Fisiología o Medicina fue otorgado a Barry J. Marshall y J. Robin Warren, por el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su papel en el desarrollo de la inflamación estomacal, mejor conocida como gastritis; así como la ulceración del duodeno, también llamada úlcera péptica. En 1982 el estrés y el estilo de vida eran consideradas las mayores causas del desarrollo de úlceras pépticas, hoy en día existen pruebas fehacientes de que la bacteria *H. pylori* es la causa de más del 90% de las úlceras duodenales y más del 80% de las úlceras gástricas. La relación entre la infección por *H. pylori* y la subsecuente gastritis o úlcera péptica se ha establecido por medio de estudios en personas voluntarias y tratamientos con antibióticos, además de estudios epidemiológicos (Premio Nobel, 2005).





En lo correspondiente a las dosis infectivas de *H. pylori*, Solnick *et al.* 2001 reporta que la dosis necesaria para infectar a un mono Rhesus es de 1.0×10^5 UFC, mientras que Graham *et al.* 2004 reporta que la dosis necesaria para infectar a un ser humano es de 1.5×10^5 UFC. El proceso de infección por *H. pylori* se describe en las siguientes figuras. En la Figura 3 se observa cómo la bacteria se implanta en la parte baja del estómago, denominada antro, iniciando así con la infección.

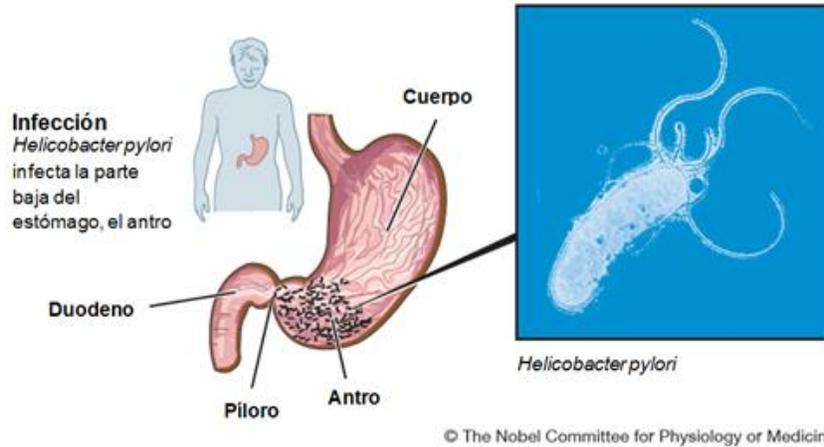


Figura 3 Infección estomacal por *H. pylori*

Mientras que en la Figura 4 se observa cómo una vez que la bacteria se ha establecido en el antro, cruza la mucosa protectora del estómago causando la inflamación comúnmente conocida como “gastritis”. La severidad de la inflamación y su localización en el estómago es crucial para detectar el tipo de enfermedad resultante por infección de *H. pylori*, aunque las úlceras son más comunes en el duodeno que en el estómago mismo.

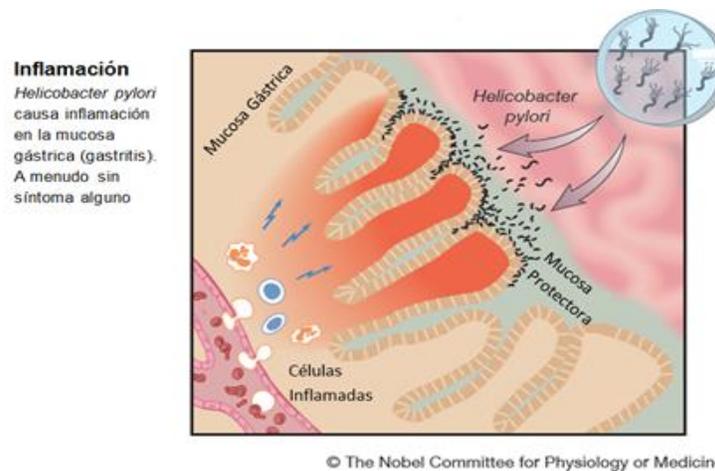


Figura 4 Inflamación estomacal por *H. pylori*





En la Figura 5 se observa cómo la inflamación causada por la bacteria es capaz de conducir a daños mucho más severos dentro del estómago o incluso del duodeno, ocasionando ulceraciones y sangrados (Premio nobel, 2005).



Figura 5 Ulceración estomacal por *H. pylori*

La inflamación crónica derivada de la infección por la bacteria es la fuente de un carcinoma gástrico, por lo cual la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC por sus siglas en inglés (subdivisión de la OMS), declaró a la bacteria *H. pylori* como un cancerígeno humano de grado 1.

Dadas las complicaciones que existen para llevar a cabo el aislamiento de la bacteria, se sugiere que el contacto directo persona – persona es el medio más probable de transmisión y aunque el mecanismo exacto de transmisión de la bacteria no queda aún muy claro, se han propuesto las siguientes rutas: gastro – oral, oral – oral y fecal – oral (Mobley *et al.*, 2001).

En la ruta gastro – oral se sugiere que la presencia de *H. pylori* en el jugo gástrico de los pacientes infectados, tiene la posibilidad de llegar a la cavidad oral por medio del reflujo o vómito, encontrando así un vehículo de transmisión. Aunado a esto se descubrió que en las cercanías de la zona donde un paciente infectado vomitó (0.3m aproximadamente) también existió crecimiento de la bacteria *H. pylori* incrementando la posibilidad de contagio hacia otros individuos que aún no poseen la infección (Mobley *et al.*, 2001).





Por otra parte en la ruta oral – oral se ha logrado aislar la bacteria *H. pylori* en placa dental y saliva; sin embargo los pacientes que mostraron estos resultados son muy pocos teniendo en cuenta que ya poseen la infección en el estómago; es decir, no hay una relación directa entre el hecho de que posean la infección estomacal con el hecho de que también exista la bacteria dentro de la cavidad oral (Mobley *et al.*, 2001).

Mientras tanto en la información relativa a la ruta fecal – oral se han encontrado discrepancias, pues aunque existen evidencias del paso de *H. pylori* a través del intestino, no se tiene comprobada la capacidad de adaptación de la bacteria para lograrlo. Los primeros cultivos exitosos de la bacteria proveniente de heces fecales se registraron en 1994, sin embargo debido a diversas condiciones en los pacientes, como la desnutrición que presentaban, los resultados no fueron aceptables. Por lo que se llegó a la conclusión de que los pacientes que presentaban la infección no necesariamente presentaban *H. pylori* viable en sus heces (Mobley *et al.*, 2001).

Por otra parte, la posibilidad de que *H. pylori* pueda ser considerada como una zoonosis (cualquier enfermedad o infección capaz de transmitirse naturalmente desde los animales vertebrados hacia los humanos y viceversa), surgió a raíz de la publicación de estudios epidemiológicos, que mostraron la prevalencia de la infección en trabajadores que se encontraban en contacto directo con carne, en comparación con aquellos que no se encuentran implicados en el manejo de animales o productos derivados de ellos. Desde entonces se han realizado diversos estudios en los cuales se ha concluido que existen diversos animales infectados con la bacteria *H. pylori*, actuando como reservorios de la infección, entre los cuales se encuentran las ovejas, los perros ovejeros (que se encuentran en contacto con ovejas infectadas), los cerdos, los monos Rhesus y los gatos (OMS, 2015; Mobley *et al.*, 2001).

Otro factor de importancia es la epidemiología de la bacteria *H. pylori*, pues muestra un comportamiento distinto en los países desarrollados en comparación con los países que se encuentran en vías de desarrollo (Mobley *et al.*, 2001). El





hacinamiento, el bajo nivel educativo y el bajo nivel socioeconómico son factores de riesgo para la infección, sin embargo el factor más importante es la edad pues la infección es contraída durante la infancia y prevalece durante la adultez (Torres *et al.*, 1998). En los países que se encuentran en vías de desarrollo alrededor del 50% de la población infantil la presenta mientras que en los países desarrollados la tasa llega a tan solo el 10%. En México se estima que el 20% de la población infantil de 1 año de edad, el 50% de la población infantil de 10 años de edad y más del 80% de la población adulta de 25 años de edad, han contraído la infección (Torres *et al.*, 1998).

Aunque existen pocos estudios al respecto, se ha observado que la bacteria *H. pylori* es capaz de sobrevivir en agua destilada, agua salina y agua de mar artificial por un período de 1 a 16 días; en medios con pH de entre 5.8 y 6.9; en condiciones microaerófilas, así como en temperaturas de 37°C. En medios acuosos la bacteria con morfología espiral, inclusive mutilada, puede sobrevivir por un año o más (West *et al.*, 1990).

Se ha encontrado *H. pylori* en el 65% de las aguas subterráneas de Estados Unidos, también ha sido encontrada en pozos de agua, agua municipal y agua tratada de Suecia, además de haber sido localizada en dos comunidades de Canadá (Hulten *et al.* 1998; McKeown *et al.* 1999; Hegarty *et al.* 1999). En México se han realizado estudios en los diversos cuerpos de agua que se encargan de abastecer a la Ciudad de México de dicho servicio y los resultados muestran que la bacteria *H. pylori* es capaz de sobrevivir tanto en aguas residuales como en aguas superficiales (Mazari *et al.*, 2001).

Por lo tanto en nuestro país la situación es más delicada pues para atender la demanda de agua potable de los habitantes de la Ciudad de México, una tercera parte del caudal proviene de fuentes superficiales. El caudal suministrado es de 32m³/s, de dicho caudal el 67% se obtiene de fuentes subterráneas (55% del acuífero del Valle de México y 12% del Valle del Lerma); mientras que el caudal restante se obtiene de fuentes superficiales (3% de manantiales al surponiente de la ciudad y 30% del sistema Cutzamala) (Transparencia Distrito Federal, 2016).





La Gerencia Regional de Aguas del Valle de México y el sistema Cutzamala, suministran agua potable a la Zona Metropolitana de la Ciudad de México mediante la operación de dos sistemas: el Cutzamala y los pozos denominados Plan de Acción Inmediata o PAI (CONAGUA, 2005).

Las fuentes del caudal que se encuentran dentro del Distrito Federal son varios pozos de las redes Norte, Centro, Sur y Poniente, además del Río Magdalena y de los Manantiales ubicados en las delegaciones Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Magdalena Contreras y Tlalpan. Por otra parte, dentro de las fuentes del caudal que se encuentran fuera del Distrito Federal destacan el Sistema Cutzamala y el Sistema Lerma (Transparencia Distrito Federal, 2016).

Según los estudios llevados a cabo por Mazari *et al.*, 2001 la bacteria ha sido localizada en algunos de los canales que conducen agua superficial hacia una planta de tratamiento denominada “Los Berros”, la cual forma parte del Sistema Cutzamala; también ha sido localizada en varios canales de Xochimilco, los cuales forman parte de los pozos de la red Sur; además también fue localizada en canales de aguas residuales como el Río de los Remedios y el Gran Canal.

Aunque dichos estudios no permitieron conocer la cantidad de *H. pylori* presente en los canales y pozos, la sola presencia de la bacteria en estos cuerpos de agua es una situación de gran importancia, pues el agua de los canales contaminados es empleada para irrigación en campos de cultivo, que se encargan de abastecer a la Ciudad de México de vegetales. O en canales como los de Xochimilco que es una zona altamente turística el riesgo es mayor pues las personas se encuentran en contacto directo con el agua contaminada (Mazari *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante relacionado con la bacteria *H. pylori* son los estudios que demuestran que puede ser clasificada en dos categorías: una es la forma cultivable (presenta crecimiento y un estado mucho más infeccioso) y la otra es la viable no cultivable o cocoide (presenta un cambio en la morfología y un nulo crecimiento en placa) (Azevedo *et al.*, 2007).





3.3 Estado Viable No Cultivable

Todos los organismos vivos se encuentran equipados con mecanismos que les permiten sobrevivir bajo condiciones adversas. Dichos mecanismos van desde cambios en su metabolismo hasta cambios en su morfología. De manera similar el patógeno *H. pylori* conocido por presentar una morfología espiral dentro de su hábitat natural (un huésped humano), es capaz de cambiar dicha morfología a una denominada “cocoide” cuando es expuesto a condiciones ambientales desfavorables (Azevedo *et al.*, 2007). En la Figura 6a se puede observar a *H. pylori* en su morfología bacilar tradicional, mientras que en la Figura 6b se puede observar a *H. pylori* en su morfología cocoide propia del estado VNC (Dus *et. al.* 2013).

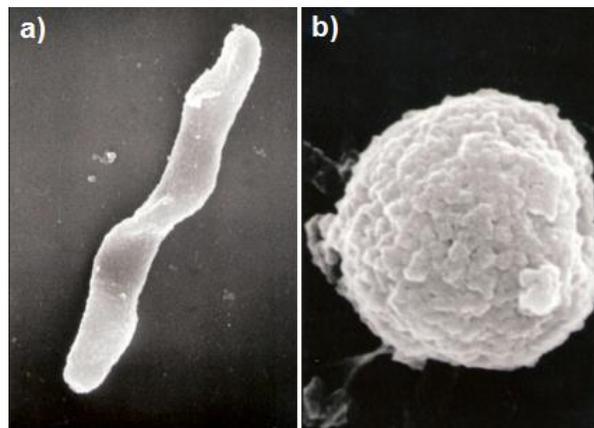


Figura 6 a) *H. pylori* en estado viable **b)** *H. pylori* en estado VNC

En 1982 en el laboratorio de Rita Colwell se describió por primera vez que las bacterias *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* eran capaces de entrar en un estado no recuperable, sin embargo viable. Es así como se comienzan a dividir los conceptos “cultivable” y “viable”, pues normalmente la viabilidad de las células se evalúa a través de su capacidad de cultivo. Desde entonces diversos autores han intentado obtener una definición de las células viables no cultivables (VNC) (Pinto *et al.*, 2013).

En general existen dos vías para determinar la viabilidad de una bacteria: con métodos dependientes de cultivos y con métodos no dependientes de cultivos. Los





métodos dependientes de cultivos recurren al crecimiento de las bacterias dentro de una placa y su conteo o a técnicas de número más probable (NMP); mientras que los métodos no dependientes de cultivos incluyen mediciones en la actividad y en otros métodos que confían en la integridad de la membrana como una medida de su viabilidad (Wahman *et al.*, 2009).

A diferencia de las células normales que son cultivadas en un medio adecuado y desarrollan colonias; las células VNC son células vivas que han perdido la capacidad de crecer en el medio de cultivo rutinario en que normalmente lo harían. Las células VNC son capaces de consumir nutrientes y producir nueva biomasa; mantener activo su metabolismo y respiración; conservan bajo su membrana intacta material genético sin daño alguno, así como su producción de RNA; cuentan con una resistencia física y química superior a las células cultivables; además sus propiedades adhesivas y de virulencia pueden cambiar; sin embargo poseen un metabolismo bajo (Oliver, 2000; Li *et al.*, 2014).

Muchas especies de bacterias son capaces de entrar en un estado VNC cuando son expuestas a condiciones de estrés, es así como se comienza a aceptar que el estado VNC es una estrategia de sobrevivencia de las células (Li *et al.*, 2014).

Se han descrito innumerables condiciones ambientales y químicas adversas que inducen a un estado VNC; entre ellas se encuentran altas temperaturas, luz solar, bajo oxígeno disponible, dióxido de azufre, bajo potencial de reducción, altas concentraciones salinas, desecación, exposición a metales pesados así como un pH no óptimo (Oliver, 2010; Pinto *et al.*, 2013).

Después de que las células VNC y las condiciones que impulsan su desarrollo fueran descritas, se han identificado un extenso número de especies de bacterias capaces de entrar en dicho estado y un amplio espectro de medios en los que pueden ser localizadas. Por ejemplo se han encontrado en agua de mar, agua de estuarios, agua de grifo, sedimentos en el fondo del mar o incluso en suelos; en el ámbito alimenticio se han encontrado en agua potable, vino, cerveza, jugo de uva, jugo de manzana, lechugas y perejil (Pinto *et al.*, 2013).





Sin embargo la capacidad de las bacterias para entrar en el estado VNC ha sido puesta en duda por una parte de la comunidad científica, pues se cree que la bacteria ha sido degradada y de ninguna manera puede ser viable; esto debido a que una vez que *H. pylori* ha sido inducida a su forma cocoide no cultivable, es incapaz de reestablecerse cuando se coloca bajo condiciones óptimas de crecimiento; además los ensayos de reversión en otros microorganismos (transformación desde la morfología cocoide a la espiral) no han tenido éxito hasta ahora; aunado a esto, la poca actividad metabólica que presenta la bacteria en su forma cocoide y las condiciones a las que fue sometida para entrar en el estado VNC, dan a la bacteria muy pocas posibilidades de sobrevivir (Azevedo *et al.*, 2007).

Es aquí donde radica la prioridad en los controles de calidad aplicados a los sistemas de distribución de agua que permitan reducir la transmisión de enfermedades (OMS, 2008).

Por lo tanto se vuelve prioritario mejorar la calidad del agua, mediante la aplicación de tecnologías de desinfección eficaces, pues las epidemias de enfermedades transmitidas por el agua pueden afectar a numerosas personas.

Las estrategias a desarrollar para preservar la calidad del agua, deben estar basadas en objetivos de salud y la satisfacción de los consumidores, para ello es necesario dirigir metodologías en las que se evalúen y controlen los riesgos en la fuente de agua, el control de los tratamientos en múltiples etapas, la desinfección terminal como barrera de seguridad, la distribución y una buena gestión en el abastecimiento.

3.4 Métodos de detección de patógenos en el agua

Los seres humanos requerimos un continuo abastecimiento de agua potable, por lo tanto la calidad microbiológica del agua debe ser monitoreada constantemente,





siendo necesarias pruebas de detección e identificación de patógenos capaces de transmitirse por dicho medio.

Para determinar la calidad microbiológica del agua, los análisis se enfocan en la búsqueda y detección de ciertos agentes patógenos que funjan como indicadores de contaminación fecal, estos indicadores son conocidos como “Coliformes fecales” entre los cuales se encuentra *Escherichia coli*, *Enterococos* y *Clostridium perfringens* (Gilbride, 2014).

Sin embargo los análisis microbiológicos tradicionales no son prácticos para llevarse a cabo de manera rutinaria, además de que no son capaces de detectar una larga lista de posibles agentes patógenos contenidos en una muestra de agua, pues los patógenos que se transmiten por el agua pertenecen a distintos grupos de organismos los cuales pueden ser bacterias, protozoos, virus y helmintos; por lo tanto no puede existir un método universal para su identificación.

Así es como durante los últimos 20 años surge el desarrollo de los denominados “Métodos moleculares”; estos métodos son herramientas rápidas, sensitivas y cuantitativas, capaces de lograr la detección de agentes infecciosos en muestras clínicas o en la evaluación de la calidad microbiológica de los alimentos y el agua.

En muchos casos, estos métodos no requieren del aislamiento o del cultivo de los microorganismos para determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de organismos objetivo contenidos en las muestras, pues se basan en la composición de ácidos grasos, péptidos o incluso material genómico contenido en el organismo (Gilbride, 2014).

Y ya que las bacterias en estado VNC no pueden ser cultivadas con las técnicas convencionales y a los diversos debates en la comunidad científica, se recurrieron a estos nuevos métodos moleculares que probaran que aún en dicho estado las bacterias continúan vivas.



3.4.1 Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos, como el Ácido Desoxirribonucleico (ADN), son polímeros compuestos de nucleótidos, cuya estructura es extremadamente estable y tiene una gran capacidad de reproducibilidad, lo cual los convierte en una excelente opción para detectar e identificar organismos.

3.4.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de Biología Molecular, que permite sintetizar o amplificar moldes específicos de ADN una y otra vez, para producir desde cientos hasta millones de copias de esa misma secuencia (Life technologies, 2012).

Una vez obtenida la amplificación mediante la PCR, se procede a un análisis post – PCR el cual consiste en la detección y cuantificación de la secuencia tratada. Uno de los medios que se pueden emplear para el análisis post – PCR puede ser la electroforesis en gel y su correspondiente análisis de imágenes.

Esta técnica también es conocida como PCR de punto final y se usa ampliamente para la secuenciación y la clonación (Life technologies, 2012).

Para llevar a cabo la PCR se requieren de reactivos especiales: polimerasa termoestable de ADN, nucleótido trifosfato y primers (dos oligonucleótidos con secuencias diferentes pero complementarias al molde original de ADN que se desea amplificar) (Wilding and Kricka 1996).

La metodología de la PCR se encuentra perfectamente establecida. Dicha metodología se conforma por ciclos, que a su vez se dividen en tres etapas, diferenciadas por la temperatura a la que se llevan a cabo cada una de ellas. Las etapas dentro de un ciclo son las siguientes: (Wilding and Kricka 1996; Gilbride 2013)

- **Desnaturalización:** Esta etapa consiste en la deshibridación o separación de la doble cadena de ADN original. Se lleva a cabo a una temperatura de 94°C aproximadamente.



- **Alineación:** Esta etapa consiste en la hibridación de los cebadores o “Primers” complementarios a los flancos de la cadena de ADN original. Se lleva a cabo en temperaturas de entre 40 y 60°C.
- **Extensión:** Esta etapa consiste en la polimerización de la polimerasa termoestable o Taq, que se encarga de extender los Primers desde los flancos hacia el resto de la cadena de ADN original. Se lleva a cabo en temperaturas de entre 70 y 75°C.

Un ciclo de reacción repetida entre desnaturalización, alineación y extensión, proporciona una amplificación exponencial de la plantilla inicial de ADN (Wilding and Kricka 1996). En la Figura 7 se muestra de manera esquemática cada una de las etapas contenidas en cada ciclo y el crecimiento exponencial que presenta la cadena de ADN original.

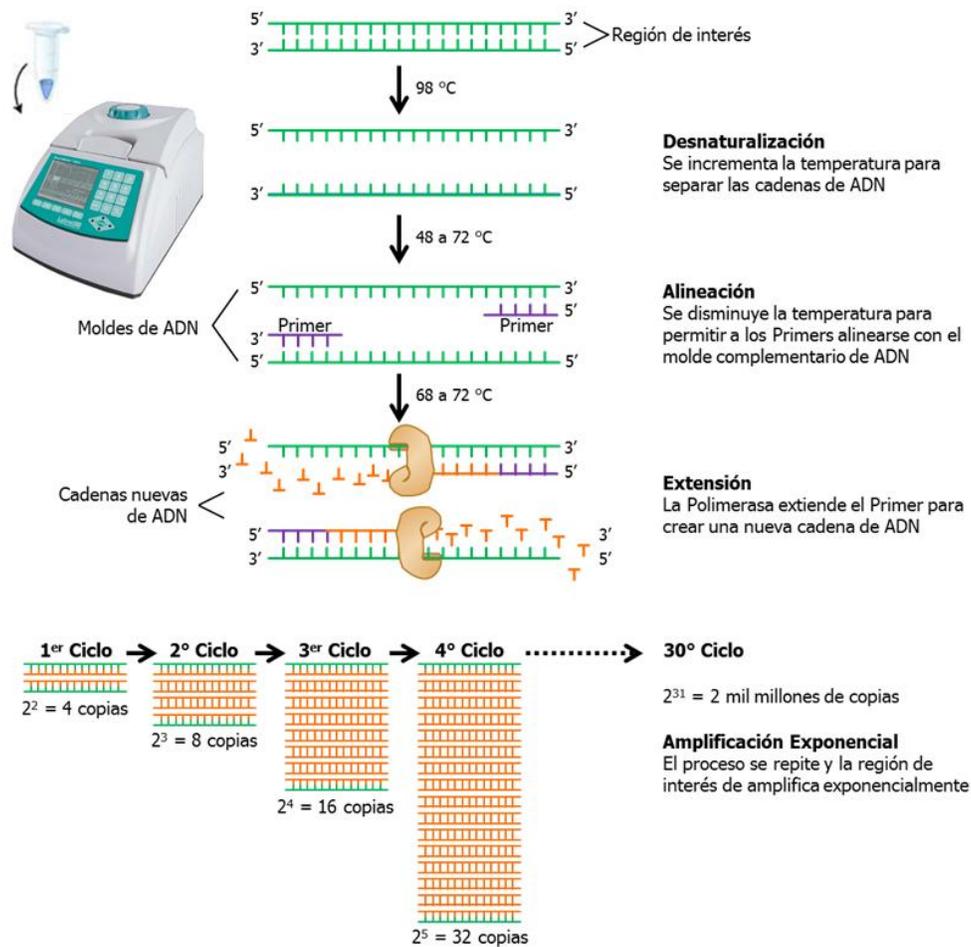


Figura 7 Esquema de la metodología de PCR





3.4.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

En teoría la PCR de punto final amplifica el ADN exponencialmente, duplicando en cada ciclo las cadenas de interés ya existentes; por lo que se llegó a la conclusión de que se podría calcular la cantidad inicial de ADN en comparación con un estándar conocido. Así, con la necesidad de una cuantificación concreta se desarrolló la técnica denominada “Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real” (q – PCR por sus siglas en inglés).

En la q – PCR, la cantidad existente de ADN en la muestra es medido cada ciclo por medio de colorantes fluorescentes, que brindan una señal proporcional al número de moléculas producto o “Amplicones” generados en dicho ciclo. Los colorantes fluorescentes empleados en ésta técnica pueden ser ADN de doble cadena con colorantes unión (dsDNA), moléculas de colorante unidas a los Primers o incluso sondas que hibriden con los productos de la PCR (Life technologies, 2012).

Una vez que se tiñen los amplicones, el cambio en la fluorescencia a través de la reacción, es medido por un instrumento que combina los ciclos térmicos con un escáner de fluorescencia. Por medio de una gráfica Fluorescencia vs Ciclos dicho instrumento nos muestra la acumulación del producto a través del tiempo en que se desarrolla la PCR. En la Figura 8 podemos observar un ejemplo de gráfica arrojada por el equipo encargado de detectar el crecimiento de la fluorescencia en cada ciclo (Life technologies, 2012).

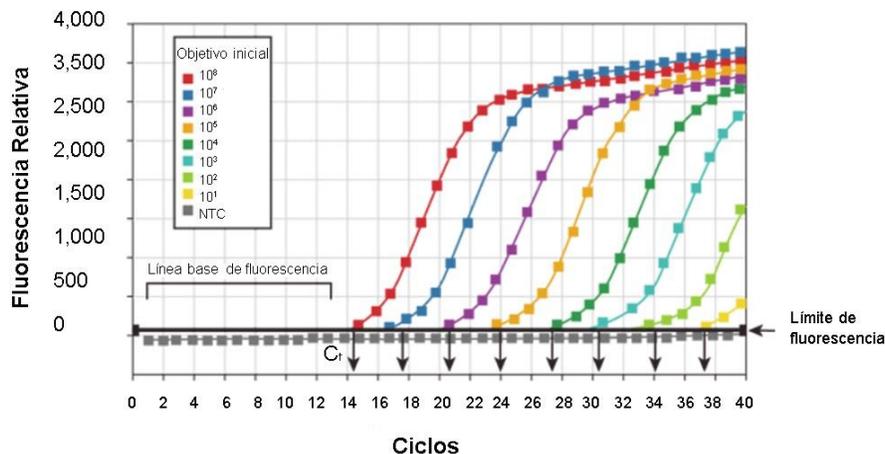


Figura 8 Gráfica de fluorescencia vs ciclos de q-PCR





3.5 Desinfección de agua

La desinfección es la eliminación o inactivación de bacterias, virus y parásitos; es uno de los mayores objetivos de los proveedores de agua para consumo humano (Langlais *et al.*, 1991). Ésta es una operación de importancia incuestionable para el suministro de agua potable y constituye una barrera eficaz para numerosos patógenos (EPA, 2011).

Es importante que las plantas encargadas del tratamiento de agua se encuentren equipadas con sistemas de desinfección adecuados, pues el principal objetivo del tratamiento de aguas es la remoción o inactivación de los agentes patógenos que se puedan encontrar en el agua a tratar. El proceso de remoción se lleva a cabo por medio de coagulantes químicos, sedimentadores y membranas de filtración. Mientras que el proceso de inactivación se lleva a cabo por medio de la aplicación de desinfectantes; los cuales actúan de manera distinta tratándose de virus (evitan la formación de placas), bacterias (evitan que se reproduzcan y formen colonias) o protozoos (evitan su multiplicación) (EPA, 2011).

Se pueden emplear diferentes tecnologías de desinfección para lograr un buen equilibrio entre las demandas de inactivación de patógenos y la generación de subproductos. Existen algunos factores clave que nos pueden ayudar a determinar el sistema de desinfección idóneo para el proceso de tratamiento, dichos factores son los siguientes:

- La efectividad del desinfectante en la destrucción de los agentes patógenos de interés.
- La calidad del agua a tratar.
- La formación de subproductos indeseables como resultado de la desinfección.
- La capacidad de verificar fácilmente el funcionamiento del sistema de desinfección.
- La extensión del sitio donde se encuentra ubicada la planta de tratamiento.





- La facilidad, las implicaciones para la salud y la seguridad en el manejo del desinfectante.
- Los procesos de tratamiento precedentes.
- El costo global.

Las tecnologías de desinfección más empleadas son la cloración, la cloraminación, la ozonización, la radiación ultravioleta y la aplicación de dióxido de cloro.

3.5.1 Cloración

El cloro es la tecnología de desinfección más usada en el tratamiento del agua residual doméstica, gracias a su capacidad de oxidación en el material celular de los microorganismos. Las vías de suministro de cloro son diversas, entre ellas se encuentran el gas cloro y las soluciones de hipoclorito, además de otros compuestos clorados en forma sólida o líquida. El grado de desinfección requerido puede ser obtenido mediante la variación de la dosis y el tiempo de contacto (EPA, 1999).

3.5.2 Dióxido de cloro

El dióxido de cloro se genera mediante la reacción que se lleva a cabo entre el clorito de sodio y el ácido clorhídrico, o entre el clorito de sodio y el cloro. Si se agrega el dióxido de cloro en estado puro, la reacción de desinfección no produce Trihalometanos (THM's), sin embargo requiere un especial cuidado para asegurar que la formación de subproductos sea pequeña. Además el dióxido de cloro es un desinfectante con mayor potencia, aunque de mayor costo, en comparación con el cloro (EPA, 2011).

3.5.3 Cloraminación

Se le conoce como Cloraminación al proceso de desinfección por medio de Monocloramina. La monocloramina se forma cuando se hacen reaccionar amoníaco y cloro, bajo condiciones controladas; dicho control es esencial para evitar la formación de subproductos y fuertes sabores en el efluente. La capacidad



de desinfección que posee la monocloramina es pobre, comparada con la cloración, por lo que su uso se reserva para proveer una desinfección residual a lo largo de la red de distribución del agua (EPA, 2011).

3.5.4 Radiación Ultravioleta (UV)

La radiación UV penetra en el material genético de los microorganismos acabando con su habilidad de reproducción, esto gracias a la energía electromagnética generada por una lámpara de vapor de mercurio; la cual puede ser de baja o de mediana presión. La eficacia de la desinfección depende de las características del agua residual, la intensidad de radiación y la configuración del reactor. La longitud de onda óptima para lograr una inactivación eficaz de los microorganismos se encuentra en un rango de entre 250 y 270nm (EPA, 1999).

3.5.5 Ozonización

El ozono (O_3) es un gas inestable que se produce cuando las moléculas de oxígeno (O_2) son disociadas por medio de una fuente de energía, produciendo átomos de oxígeno, que posteriormente chocan con una molécula de oxígeno. El ozono es un oxidante y agente germicida muy fuerte, pues posee varios mecanismos de desinfección, como por ejemplo la destrucción directa de la pared celular. La eficacia de la desinfección depende de la susceptibilidad de los microorganismos a ser tratados, del tiempo de contacto y de la concentración de ozono. Este tipo de tecnología de desinfección se emplea una vez que el agua residual ha recibido por lo menos tratamiento secundario. Otro uso común del ozono en el proceso de tratamiento de aguas residuales es para el control de malos olores (EPA, 1999).

En la Tabla 2 se muestra una comparación entre las características y las limitaciones de dichas tecnologías (EPA, 2011).



Tabla 2 Comparación de las tecnologías de desinfección.

Proceso	Ventajas	Limitaciones
Cloración	Su capacidad de desinfección está bien definida. Tecnología de dosificación establecida.	Genera subproductos de desinfección. El sabor y olor pueden afectar su aceptabilidad. Inefectivo contra <i>Cryptosporidium</i> .
Dióxido de cloro	Comparado con el cloro puede ser más efectivo en un pH elevado, tiene menores problemas de sabor, olor y subproductos.	Como oxidante es más débil que el ozono o el cloro. La dosis está considerablemente limitada debido a los subproductos inorgánicos (clorato y clorito)
Cloraminación	No hay problemas significativos con subproductos de desinfección. Generalmente presenta menos problemas con el sabor y olor en comparación con el cloro.	Comparado con la cloración, es considerablemente menos efectivo. Usualmente no es empleado como proceso de desinfección primario.
Radiación ultravioleta	Generalmente es altamente efectivo contra protozoarios, bacterias, la mayoría de virus y particularmente para <i>Cryptosporidium</i> . No hay implicaciones significativas en la generación de subproductos.	Menor efectividad contra virus en comparación con el cloro. No genera residual para distribución.
Ozonización	Es un fuerte oxidante y un desinfectante altamente efectivo comparado con el cloro. Destruye micro – contaminantes orgánicos (pesticidas, componentes del sabor y olor).	El bromato subproducto y el incremento de carbono orgánico asimilable (AOC) pueden impactar en la regeneración en la distribución. El equipo es complejo, de alto consumo energético y de mayor costo en comparación con la cloración. El residual no es lo suficientemente duradero para la distribución.





3.6 Desinfección de agua con ozono

A principio de los años 60 en Francia la necesidad de un desinfectante al menos tan efectivo como el cloro, pero sin el aroma y el sabor desagradables que éste deja en el agua, se vuelve la principal razón para aplicar la ozonización en el agua para consumo humano (Langlais *et al.*, 1991). Actualmente la aplicación de ozono en el tratamiento de agua potable es usada en todo el mundo, principalmente por su efectividad en el proceso de desinfección debida a su gran capacidad oxidante (Casasola, 2012).

3.6.1 El ozono

El científico alemán Van Marum describió al ozono como “el olor de la electricidad”, cuando en 1785 realizó experimentos con descargas eléctricas en presencia de oxígeno, en la máquina más grande de electricidad estática de ese entonces. Por mucho tiempo el aroma del ozono fue asociado con tormentas eléctricas, pues en la naturaleza dicho compuesto es producto de las descargas eléctricas de los relámpagos (Gottschalk *et al.*, 2010).

Sin embargo, no fue sino hasta 1839 que el científico alemán Christian Schönbein, al también identificar un aroma proveniente del ánodo de una celda electrolítica, postuló por primera vez la producción de una nueva sustancia, a la cual posteriormente le asignó el nombre en griego para el olfato: “ozein” (οζειν) (Gottschalk *et al.*, 2010).

El ozono es un gas tóxico con un marcado olor irritante. La exposición a concentraciones de entre 0.1 y 1.0 ppm, es capaz de generar dolor de cabeza, ardor en los ojos e irritación de las vías respiratorias. El O_3 es un componente importante de las capas altas de la atmósfera, donde impide el paso de la radiación ultravioleta. El ozono es un agente oxidante más fuerte que la molécula de oxígeno por sí sola, de hecho oxida todos los metales comunes. En la Figura 9 se muestra la estructura y características físicas de la molécula de O_3 (Brown *et al.*, 2004).



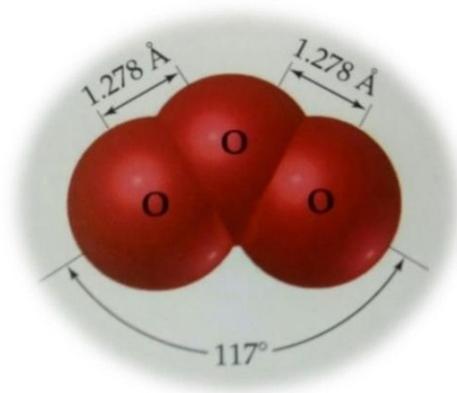
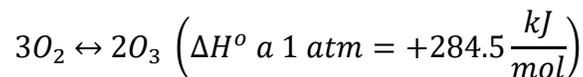


Figura 9 Molécula de ozono

El ozono es una molécula metaestable por lo que su producción presenta aspectos conflictivos desde el punto de vista termodinámico. La reacción de formación del ozono es endotérmica y se describe de manera general a continuación:



Además el valor de la entropía de formación es alto y desfavorable:

$$\Delta S^\circ (\text{a } 1 \text{ atm}) = -69.9 \frac{\left(\frac{\text{J}}{\text{mol}} \right)}{\text{grado}}$$

Por otra parte el valor de la energía libre de Gibbs nos indica que el ozono no puede ser generado a partir de la activación térmica del oxígeno:

$$\Delta G^\circ (\text{a } 1 \text{ atm}) = +161.3 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

En conclusión, el ozono se puede descomponer fácilmente por calentamiento, por lo que la temperatura es un aspecto fundamental a controlar en la producción del mismo (Langlais *et al.*, 1991).

La producción de ozono a nivel industrial se lleva a cabo por medio de descargas eléctricas, en un proceso conocido como “Descarga Corona”, capaz de producir altas concentraciones de ozono a un bajo costo.





El efecto corona se basa en la producción de una descarga eléctrica en un campo eléctrico de alta energía con oxígeno o bien aire seco; la reacción se inicia cuando los electrones libres de la corona, disocian a las moléculas de oxígeno formando iones; el choque de uno de estos iones con otra molécula de oxígeno forma una molécula de ozono (Román, 2013). En la Figura 10 se puede observar un esquema general de la formación de ozono por medio de la descarga corona.

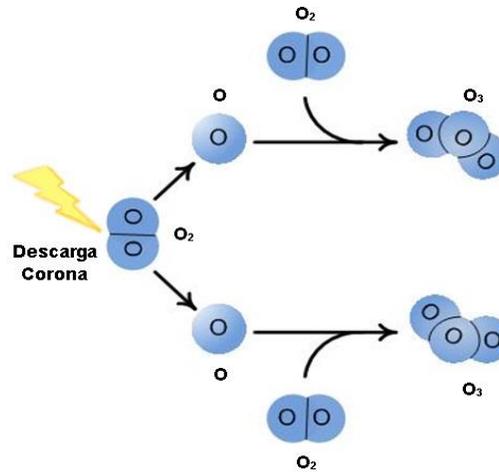


Figura 10 Descarga corona para la formación de ozono

A la temperatura y presión del ambiente, el ozono es un gas inestable que se descompone rápidamente para formar nuevamente moléculas de oxígeno; es debido a esta característica que se vuelve imposible almacenarlo o envasarlo, por lo que debe generarse *in situ* y emplearse al momento (Román, 2013). Por otra parte la estabilidad del ozono disuelto se ve afectada por diversos parámetros como el pH, la luz ultravioleta, la propia concentración del ozono, así como la concentración de radicales libres. Según Hoigné, Staehelin y Bader existe un mecanismo de descomposición del ozono, que se expresa mediante las siguientes reacciones en cadena (Langlais *et al.*, 1991):

1. $O_3 + OH^- \xrightarrow{k_1} HO_2 + O_2^-$; $k_1 = 7.0 \times 10^1 M^{-1}s^{-1}$; HO_2 : radical hidropéroxido
 $HO_2 \xrightleftharpoons{k_2} O_2^- + H^+$; k_1 (cte de ionización) = $10^{-4.8}$; O_2^- : ión radical superóxido
2. $O_3 + O_2^- \xrightarrow{k_2} O_3^- + O_2$; $k_2 = 1.6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$; O_3^- : ion radical ozónido
3. $O_3^- + H^+ \xrightleftharpoons{k_{-3}} HO_3$; $k_3 = 5.2 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$; $k_{-3} = 2.3 \times 10^2 s^{-1}$





4. $HO_3 \xrightarrow{k_4} OH + O_2; k_4 = 1.1 \times 10^5 s^{-1}$
5. $OH + O_3 \xrightarrow{k_5} HO_4; k_5 = 2.0 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$
6. $HO_4 \xrightarrow{k_6} HO_2 + O_2; k_6 = 2.8 \times 10^4 s^{-1}$
7. $HO_4 + HO_4 \rightarrow H_2O_2 + 2O_3$
8. $HO_4 + HO_3 \rightarrow H_2O_2 + O_3 + O_2$

Como toda reacción en cadena, cuenta con tres diferentes etapas características: la iniciación, la propagación y el rompimiento. La iniciación se puede identificar como el paso 1, la propagación se lleva a cabo de los pasos 2 a 6, mientras que el rompimiento se da en los pasos 7 y 8. El patrón general del mecanismo de descomposición del ozono se muestra en la Figura 12 (Langlais *et al.*, 1991).

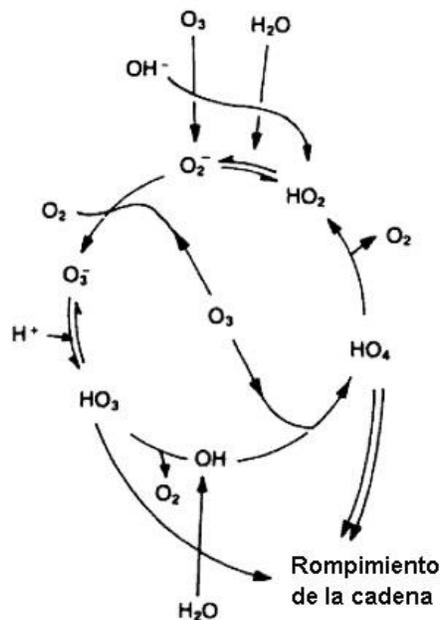


Figura 11 Mecanismo de descomposición de ozono

3.6.2 Cinética de la desinfección

La cinética química es el estudio de la velocidad y el mecanismo por medio de los cuales una especie química se transforma en otra; depende de distintos parámetros de operación como la temperatura, la presión y la composición de una mezcla reaccionante. En la cinética es importante el cálculo preciso de las





velocidades de reacción, las constantes de velocidad y las energías de activación, además de determinar los errores en las mediciones (Smith, 1991).

Por su parte la cinética de consumo de ozono en el agua, es un parámetro que depende de diversos factores, como las pérdidas de ozono por oxidación de la materia orgánica contenida en el agua, la temperatura, el pH del agua, la presión parcial del gas sobre el líquido o la difusión del ozono (Román, 2013; Langlais et al., 1991).

En el caso particular de la desinfección, la cinética generalmente se describe con los parámetros principales de la misma desinfección: la dosis del desinfectante, el tiempo de contacto, la concentración microbiana y dependiendo del caso los demás parámetros fisicoquímicos habituales, como la temperatura o el pH. Para lograrlo se han propuesto diversos modelos matemáticos, con la finalidad de describir la inactivación de los microorganismos bajo la acción de los desinfectantes. Estos modelos se muestran en la Tabla 3 (Azzellino et al., 2010).

Tabla 3 Modelos matemáticos de desinfección

Modelo	Ecuación
Chick – Watson	$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\Lambda C^n t$
Hom	$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -k C^n t^m$
Selleck	$\frac{N_t}{N_0} = \left(\frac{C \cdot t}{b}\right)^{-d}$
S – Model	$\ln\frac{N_t}{N_0} = -\frac{kC^n}{1 + \left(\frac{h}{C \cdot t}\right)^m}$

3.6.2.1 Ley de Henry

El ozono no reacciona con el agua, por lo tanto forma una solución, con la capacidad de oxidar gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua. Generalmente en la literatura se encuentra reportado que la





disolución del ozono en agua obedece la Ley de Henry (Román, 2013; Casasola, 2012).

La relación entre la presión y la solubilidad de un gas, se expresa mediante la Ley de Henry; la cual establece que la solubilidad de un gas en cualquier disolvente aumenta al incrementar la presión del gas sobre el disolvente. Cuando se establece el equilibrio, la rapidez con la que las moléculas del gas entran en la disolución es igual a la rapidez con que moléculas del soluto escapan de la disolución, para entrar en la fase gas. Por lo tanto la solubilidad del gas aumenta en proporción directa a su presión parcial sobre la disolución (Brown *et al.*, 2004).

La expresión de la Ley de Henry para la disolución de ozono en el agua se muestra en la Ecuación 1:

$$C_s = \beta M \times P_\gamma$$

Dónde:

- C_s : Concentración de saturación $\left(\frac{kgO_3}{m^3H_2O}\right)$
- M : Masa volumen de ozono $\left(\frac{kg}{m^3}\right)$
- β : Coeficiente de absorción, volumen de ozono disuelto por unidad de volumen de agua
- P_γ : Presión parcial del ozono en la fase gas

El valor de C_s para el ozono es de 1.400 para valores de β de 0.64, de P_γ de 1 y de M de 2.14 (Langlais *et al.*, 1991).

Además de la disolución física del ozono en el agua, existen otros parámetros que tienen la capacidad de afectar el equilibrio en su solubilidad, como por ejemplo el pH. Sin embargo, el parámetro más importante es probablemente la temperatura, pues se han encontrado reportados en la literatura diversos valores que indican la relación termodinámica existente entre la temperatura y la solubilidad del ozono





A partir de la solubilidad obtenida a diferentes temperaturas y la gráfica del $\ln(S)$ versus temperatura, se obtuvo la Ecuación 2 para el cálculo de la constante aparente de Henry:

$$\ln(H_a) = 22.3 - (4030 * T)$$

Esta ecuación expresa la alta solubilidad del ozono en el agua a bajas temperaturas (Langlais *et al.*, 1991).

3.6.2.2 Modelo Chick – Watson

La Ley de Chick se expresa con la Ecuación 3 (Langlais *et al.*, 1991):

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

Dónde:

- N_t : *Conteo microbiano final*
- N_0 : *Conteo microbiano inicial*
- k : *Constante de velocidad (Depende del microorganismo y del desinfectante)*
- t : *Tiempo de contacto*

La forma más usual para expresar y representar la Ley de Chick es mediante la Ecuación 4:

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -k t$$

Esta forma de expresar la Ley de Chick facilita su uso e interpretación pues normalmente los resultados se representan en gráficas del $\ln(N_t/N_0)$ versus tiempo.

En el modelo de Chick – Watson se incorpora un parámetro más, denominado “Coeficiente de letalidad” y se expresa mediante la Ecuación 5:

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\Lambda C^n \cdot t$$





Dónde:

- Λ : *Coefficiente de letalidad (Depende del microorganismo y del desinfectante)*
- C : *Concentración del desinfectante*
- t : *Tiempo de contacto*
- n : *Constante conocida como Coeficiente de dilución y se relacionan al $C \cdot t$*

En la desinfección, la relación dosis – respuesta es determinada por una concentración residual y su decaimiento, por lo que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) ha especificado un término denominado “ $C \cdot t$ ” para asegurar la adecuada desinfección, donde C corresponde al valor de la concentración del desinfectante (en miligramos por litro), mientras que t corresponde al tiempo de contacto (en minutos). Relacionando el concepto de “ $C \cdot t$ ” con la Ecuación 5, tenemos varios casos:

- Si $n = 1$, $C \cdot t$ se mantiene constante, independientemente de la concentración del desinfectante.
- Si $n > 1$, $C \cdot t$ se incrementa bruscamente cuando la concentración del desinfectante se incrementa, en este caso la variable de la concentración del desinfectante es la variable predominante, mientras que el tiempo de contacto es menos importante.
- Si $n < 1$, $C \cdot t$ se incrementa cuando la concentración del desinfectante se incrementa sin embargo no lo hace de manera tan dramática como en el caso anterior, pues ahora el tiempo de contacto se vuelve la variable predominante.

Sin embargo en la mayoría de los casos el valor del coeficiente de dilución o n es igual a 1, este valor nos indica que el proceso de desinfección es una reacción de primer orden (Casasola, 2012).

A diferencia de la Ley de Chick, el modelo de Chick – Watson se expresa en gráficas de $\ln(N_t / N_0)$ versus $C \cdot t$.





La EPA desarrolló un método para calcular la inactivación microbiana y así evaluar la eficacia del sistema de desinfección en un sistema de agua. El método consiste en tablas con diferentes valores de $C \cdot t$ que se relacionan con distintos niveles de desinfección, bajo diferentes condiciones de operación. El $C \cdot t$ y por lo tanto el nivel de inactivación se puede extender mediante la aplicación de mayores dosis de desinfectante o incrementando el tiempo de contacto. Existen tablas para cada desinfectante.

El nivel de desinfección obtenido con el $C \cdot t$ aplicado, generalmente se expresa en términos de “inactivación log” y la inactivación log es una medida del porcentaje de microorganismos que son inactivados durante el proceso de desinfección, la inactivación se mide en una escala logarítmica, esto debido a la reducción en las órdenes de magnitud, por lo que la inactivación log y el porcentaje de desinfección se relacionan como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4 Relación de la inactivación logarítmica con el porcentaje de desinfección

Inactivación log	% de desinfección
0.0	00.000
1.0	90.000
2.0	99.000
3.0	99.900
4.0	99.990
5.0	99.999

Por lo tanto los principales parámetros de control en el proceso de la desinfección con ozono son la dosis de ozono a aplicar y el tiempo de contacto (EPA, 1999).

En todas las aplicaciones el ozono se consume, sin embargo se debe tener en cuenta que no reacciona únicamente con los organismos – objetivo, por lo tanto la dosis requerida de ozono debe diseñarse adecuadamente para lograr cubrir la demanda y alcanzar el objetivo de la desinfección. Por otra parte el tiempo de



contacto puede variar dependiendo del objetivo del ozono y debe tener la característica de ser el mínimo requerido (Langlais *et al.*, 1991).

3.6.3 Ingeniería de la desinfección con ozono

En la planeación de las instalaciones para llevar a cabo el tratamiento de aguas una parte de suma importancia es la desinfección. El diseño adecuado de esta etapa debe integrar la información correspondiente al proceso con la ingeniería necesaria que permita alcanzar los objetivos de calidad establecidos para el efluente de la planta de tratamiento.

La obtención de dicha información se lleva a cabo mediante estudios de tratabilidad, las consideraciones generales dentro de los estudios de tratabilidad contemplan la localización de los aplicadores de ozono, los requerimientos en la dosis de ozono, el tiempo de contacto, así como el efecto del ozono en el desempeño del proceso subsecuente (Langlais *et al.*, 1991).

Un sistema de desinfección con ozono se compone de tres partes fundamentales: la preparación del gas de alimentación, la generación del ozono y la disolución del ozono en el agua a tratar. Mientras que los componentes auxiliares son la unidad destructora de ozono, los sistemas de control, los materiales de construcción así como los sistemas de seguridad (Langlais *et al.*, 1991). En la Figura 12 se muestra un esquema general de un sistema de desinfección con ozono (EPA, 1999).

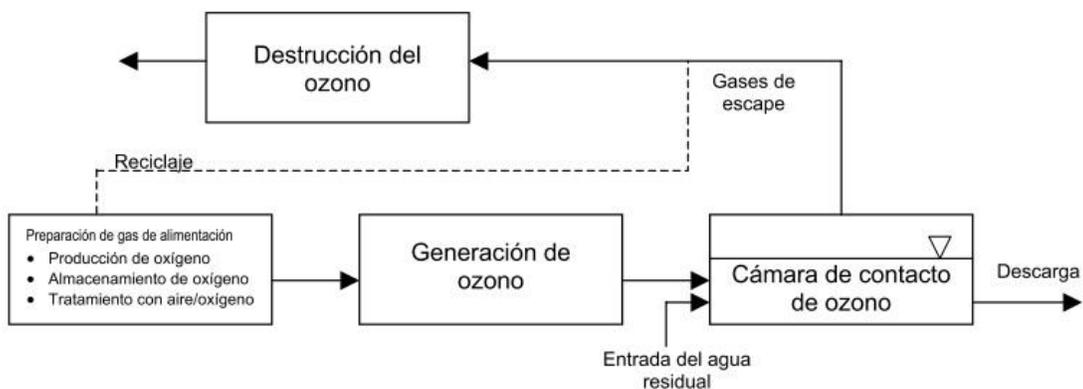


Figura 12 Sistema de desinfección con ozono



3.6.3.1 Preparación del gas de alimentación

Cada tipo de gas de alimentación posee diversos atributos dependiendo de los objetivos de aplicación de la ozonización (Langlais *et al.*, 1991). Los tipos de gas de alimentación son:

- a) Aire.
- b) Oxígeno de alta pureza (general, de generación criogénica o de separación de aire de adsorción por oscilación de presión).
- c) Oxígeno líquido de alta pureza.
- d) Oxígeno de alta pureza reciclado (externamente o internamente).
- e) Aire enriquecido con oxígeno.

Los factores que se deben considerar en la selección del gas de alimentación son:

- 1) La producción proyectada para la instalación de ozonización en el período operativo anual.
- 2) Los aspectos de aplicación a las características específicas del agua a tratar (demanda inicial de ozono, compuestos de fácil oxidación, una concentración residual).
- 3) La capacidad inicial y proyecciones futuras de crecimiento en la instalación.
- 4) La capacitación del personal encargado de la operación y del mantenimiento.
- 5) La filosofía operativa de la empresa.

En la calidad del gas de alimentación los parámetros a considerar son la humedad pues el gas debe estar extremadamente seco para evitar la formación de compuestos indeseables como ácidos, además de evitar la presencia de partículas u otros contaminantes. Los sistemas de preparación del gas de alimentación pueden trabajar a diferentes presiones: a la presión ambiental, a baja presión (<1 bar – 14.5 psi), a media presión (<4 bar – 58 psi) o a alta presión (>4 bar – >58 psi) (Langlais *et al.*, 1991).



3.6.3.2 Generación del ozono

Los generadores de ozono se pueden describir en base al tipo de dieléctrico, la frecuencia y el tipo de refrigeración del generador.

Los dieléctricos pueden ser platos de cristal, tubos de cristal metalizados o platos de cerámica. Mientras que la frecuencia se puede clasificar en baja (50 a 60 Hz), media (60 a 1000 Hz) o alta (>1000 Hz) (CONAGUA, 2000). Por su parte el tipo de refrigeración es agua generalmente o incluso aceite o Freón.

El ozono empleado en la gran mayoría de plantas de tratamiento de agua es provisto mediante el proceso denominado “Descarga Corona”, el cual es generado por electrodos tubulares concéntricos, dieléctricos de cristal y con agua como sistema de enfriamiento (CONAGUA, 2000). En la Figura 13 se muestra un esquema con las partes que integran un generador de ozono por medio de la descarga corona (Langlais *et al.*, 1991).

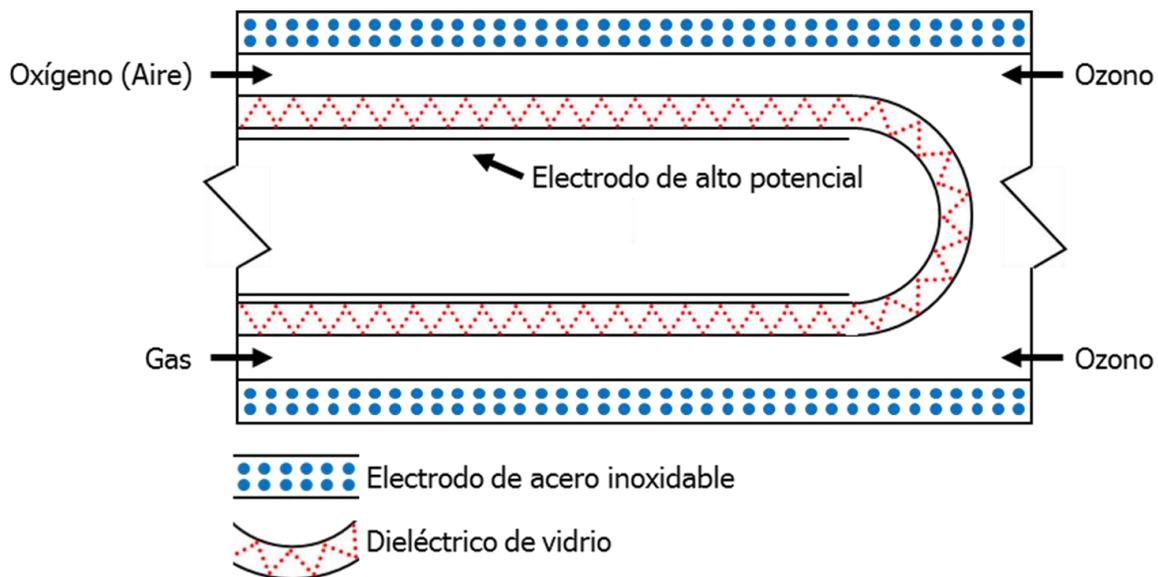


Figura 13 Generación de ozono por descarga corona

Los parámetros de diseño de los generadores de ozono son los siguientes:

- 1) Tasas de producción de ozono requeridas.
- 2) Temperatura y flujo de agua de enfriamiento disponible.
- 3) Condiciones ambientales de temperatura y humedad.



- 4) Consumo de energía requerido.
- 5) Espacio disponible y capacidad de espera requerida.
- 6) Experiencia, entrenamiento y disponibilidad del departamento de operación y mantenimiento.
- 7) Confiabilidad del sistema.
- 8) El manejo adecuado y prudente del oxígeno.

3.6.3.3 Cámara de contacto

El ozono debe ser transferido de la fase gas a la fase líquida para que sea capaz de desarrollar su función en el tratamiento de aguas, por lo tanto es de suma importancia el diseño de una unidad de disolución que maximice dicha transferencia de ozono. Para llevar a cabo la transferencia se emplea una unidad denominada cámara de contacto (CONAGUA, 2000).

Una cámara de contacto se encuentra definida en función del diseño, el tipo, las condiciones de operación, del tipo de difusor de ozono y de la función del ozono en cada uno de los puntos de aplicación (Langlais *et al.*, 1991).

En lo respectivo a la disolución del ozono existen diversas técnicas, entre las cuales se encuentran la difusión de burbujas finas, los mezcladores de turbina, los inyectores, las columnas empacadas o las cámaras de spray; sin embargo el más empleado es el difusor de burbujas convencional pues no requiere de un consumo de energía adicional (CONAGUA, 2000).

Mientras que en lo respectivo a las condiciones de operación, el tipo de difusor y la función del ozono, las cámaras de contacto se encuentran definidas con base en éste último parámetro, el objetivo de la ozonización (CONAGUA, 2000; Langlais *et al.*, 1991):

- Si el objetivo de la ozonización es una reacción para oxidar compuestos de hierro y manganeso existe una transferencia de masa limitada, se recomiendan al menos dos etapas y el uso de un difusor poroso de burbuja fina.





- Si el objetivo de la ozonización es la desinfección primaria la velocidad de reacción es limitada, por lo que se recomiendan al menos tres etapas y un difusor de burbuja fina multietapas o un difusor estático de turbina.
- Si el objetivo de la ozonización es alcanzar un $C \cdot t$ requerido, el número de etapas recomendadas se incrementa, se deben minimizar los cortos circuitos y un tiempo recomendable igual al valor de t_{10} .

Mientras más etapas se usen, la hidráulica dentro de la cámara de contacto se aproxima a un reactor de flujo pistón (PFR por sus siglas en inglés) por lo que se vuelve necesario añadir deflectores que nos permitan alcanzar la eficiencia adecuada (Langlais *et al.*, 1991).

Los cortos circuitos se producen por tiempos de residencia no ideales que se desarrollan a causa de la hidrodinámica dentro de la cámara, se ha descubierto que los cortos circuitos son capaces de afectar severamente la eficiencia de la desinfección sobre todo cuando se requiere un alto nivel de inactivación, por lo que se vuelve de suma importancia considerarlos en el diseño de la cámara. Con la finalidad de solucionar el problema de los cortos circuitos, la EPA establece el t_{10} , que es el valor del tiempo de retención en el que 10% del flujo ha pasado a través de la cámara de contacto (Van Dijk, 2001).

Por último en lo respectivo al diseño de las cámaras de contacto, existen diversos tipos (CONAGUA, 2000):

- Cámara de contacto en multietapas con difusor poroso de burbujas finas: Es la más empleada en plantas de tratamiento de agua, está hecha de concreto, con mínimo una y máximo seis etapas, el gas se aplica al fondo y a contracorriente con una presión de entre 0.7 y 1.05bar y con recirculación de gases Figura 14.
- Cámara de contacto tipo Kerag con mezclador de turbina con presión positiva o negativa: Utiliza un propulsor giratorio rápido con base perforada, a través de la cual se introduce el ozono al fondo. Es empleada en cámaras de contacto múltiples Figura 15.



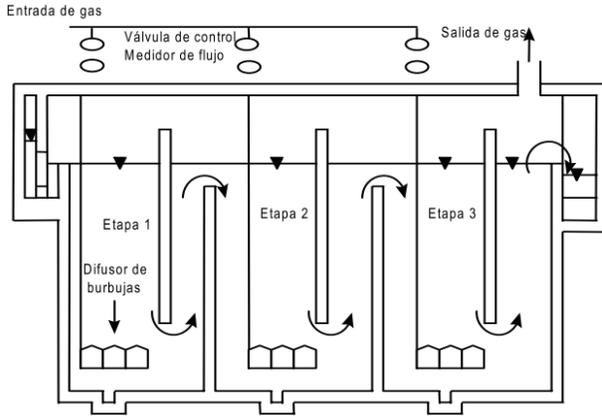


Figura 14 Cámara de contacto con difusor de burbujas.

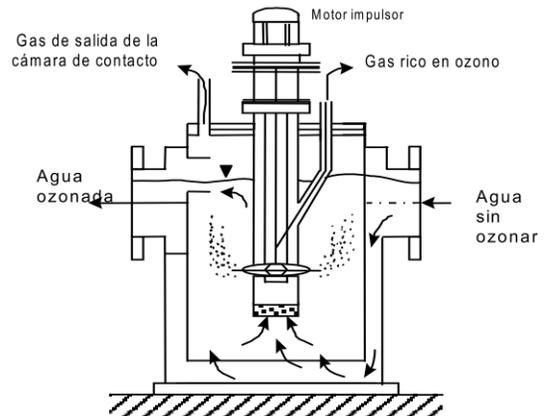


Figura 15 Cámara de contacto tipo Kerag.

- Cámara de contacto con lecho empacado y sistema de difusión por inyección: El ozono es introducido a contracorriente y se usa para facilitar la transferencia Figura 16.
- Sistema de contacto y difusión en tubo profundo en "U": Consta de dos tubos concéntricos, el ozono es inyectado en la parte superior del tubo interno Figura 17.

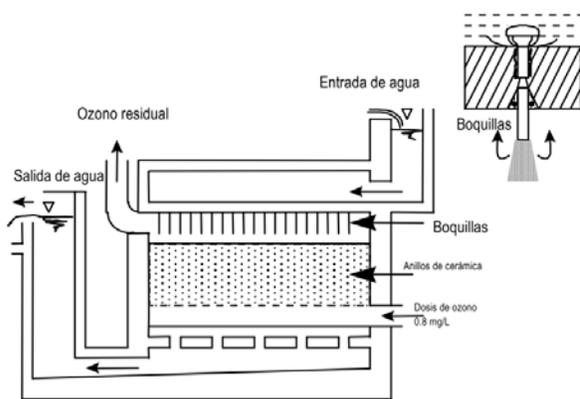


Figura 16 Cámara de contacto con lecho empacado.

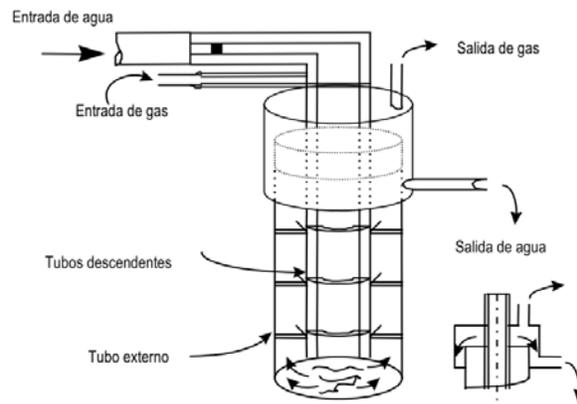
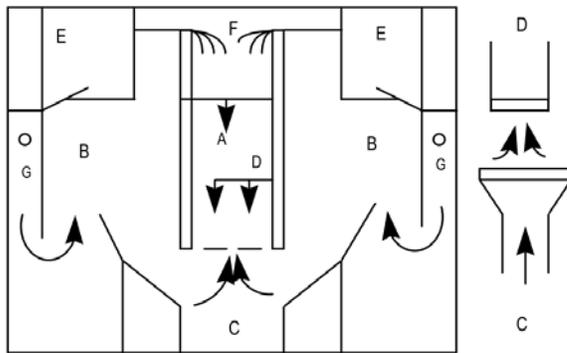


Figura 17 Cámara de contacto y difusión en tubo profundo en "U".



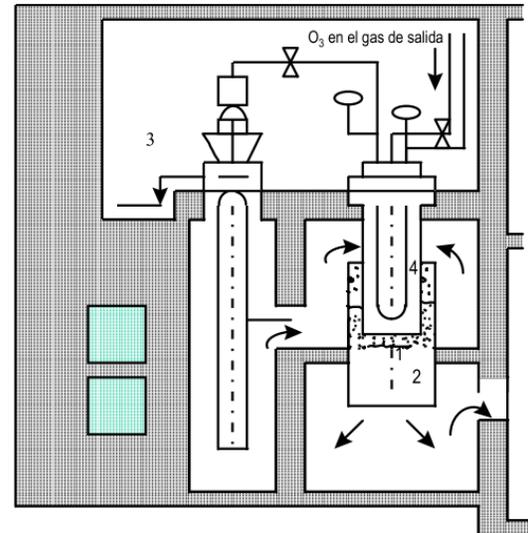


- Cámara de contacto con difusor de plato poroso: Este sistema combina la ozonización y la flotación, por lo que principalmente se emplea en la remoción de algas antes de la filtración Figura 18.
- Cámara de contacto con difusor de turbina radial estático sumergido: Consta de una turbina sumergida sin partes móviles. Una parte del agua de alimentación es mezclada con el ozono y presurizada en la cabeza de la turbina, para ser inyectada a contracorriente a través de orificios, generando cierta turbulencia que favorece la transferencia. Es un equipo costoso Figura 19.



- A: Cámara descendente de ozonización
- B: Cámaras de flotación.
- C: Platos porosos de difusión.
- D: Corriente de barrido (agua inyectada a través de orificios).
- E: Cámara de remoción de espuma.
- F: Entrada de agua a tratar.
- G: Salida de agua tratada.

Figura 18 Cámara de contacto con difusor de plato poroso.



- 1: Cabeza del difusor.
- 2: Cámara de difusión.
- 3: Bomba de corriente parcial.
- 4: Derramadero

Figura 19 Cámara de contacto con difusor de turbina radial sumergida.

- Sistema tipo Venturi: Es un sistema económico sin embargo sólo se aplica a pequeñas instalaciones. Presenta inconvenientes por corrosión, sobresaturación por oxígeno y nitrógeno.





3.6.3.4 Unidad destructora de ozono residual

A pesar de que la unidad destructora de ozono residual no es considerada como parte fundamental del sistema de ozonización, debe tomarse muy en cuenta sobre todo en sistemas que no cuentan con recirculación de los gases, pues ya que la eficiencia de transferencia del ozono es menor al 100% y que el ozono es un gas altamente contaminante, no debe ser lanzado a la atmósfera.

Existen tres formas de tratar el ozono antes de ser expulsado al ambiente:

- **Descomposición térmica:** Se lleva a cabo en un intercambiador de calor eléctrico, el cual incrementa la temperatura entre 300 y 350°C durante 5 segundos, este método es el más seguro y fácil.
- **Descomposición catalítica:** Se lleva a cabo por medio de catalizadores de paladio, manganeso u óxidos de níquel sobre diversos soportes. Los catalizadores son reversibles y pueden ser reactivados cada cinco años con óxidos de nitrógeno, compuestos de cloro o sulfitos, y bajo las condiciones que establezca el fabricante. Aunque es el método más reciente y común representa un problema ambiental debido a la disposición de los catalizadores gastados.
- **Descomposición por carbón activado:** El ozono reacciona con el carbón activado seco generando una cantidad considerable de calor, sin embargo de esta combustión se generan partículas finas de carbón que son explosivas, por lo que éste método se vuelve peligroso, difícil de monitorear y de intenso mantenimiento.





4. METODOLOGÍA

La metodología seguida en el trabajo de investigación se dividió en cuatro bloques, dependiendo de la actividad a desarrollar (Figura 20).

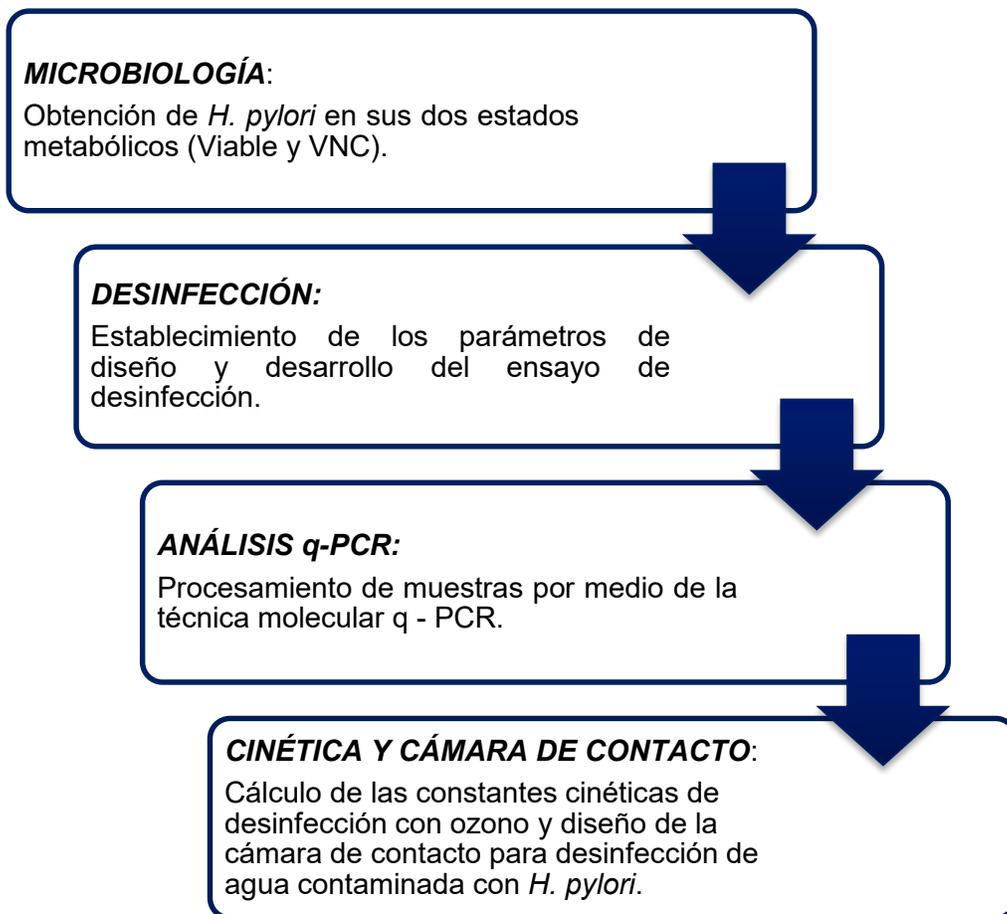


Figura 20 Esquema de metodología





Los bloques de Microbiología y de Análisis q-PCR se llevaron a cabo en los laboratorios de Infectología, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). Mientras que el bloque correspondiente a la desinfección se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del edificio 5 en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, el cual cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C.

4.1 Microbiología

El aspecto microbiológico se enfocó en la preparación de la bacteria *H. pylori* y su obtención en los dos estados metabólicos necesarios para llevar a cabo la experimentación: Viable y Viable no Cultivable.

Las condiciones de cultivo de la bacteria *H. pylori* fueron: incubación en una atmósfera de CO₂ dentro de una cámara de anaerobiosis Oxoid™ (Figura 21), con agitación constante y a una temperatura de 37°C.



Figura 21 Cámara de anaerobiosis





Inicialmente se requirió determinar el punto de crecimiento logarítmico, para así comenzar el desarrollo experimental con la bacteria *H. pylori* en su estado viable exponencial. La determinación de dicho punto de crecimiento se llevó a cabo por medio de una siembra de la bacteria y la medición de su absorbancia a través del tiempo. La siembra se realizó en un caldo BHI (Brain – Heart Infussion) con polienriquecimiento al 1%, además de 6mg/L de dos antibióticos (anfotericina y vancomicina), mientras que la medición de la absorbancia se realizó en el espectrofotómetro BIO – RAD Smart Spec™ 3000 (Figura 22).



Figura 22 Espectrofotómetro BIO – RAD Smart Spec™ 3000

Posteriormente se realizaron dos nuevos cultivos en un medio de caldo Luria con el polienriquecimiento y los antibióticos correspondientes, durante tres días (los necesarios para alcanzar el punto de crecimiento logarítmico).

Durante los tres días de crecimiento también se realizaron cultivos en agar Carnero, esto con la finalidad de verificar que no existiera contaminación alguna y así garantizar la pureza en el cultivo de *H. pylori*.

Una vez que se obtuvieron los dos cultivos desarrollados de la bacteria, uno fue destinado a la obtención de *H. pylori* en su estado viable, mientras que el otro se destinó a la obtención de *H. pylori* en su estado VNC.





4.1.1 *H. pylori* en estado viable

El caldo destinado a la obtención de *H. pylori* en su estado viable fue centrifugado a 15 000 rpm y 10°C durante 15 minutos, con el objetivo de recolectar el material celular de la bacteria.

Después de la recolección de la bacteria desde el caldo, se llevaron a cabo dos lavados. Cada lavado consistió en resuspender el material celular de la bacteria en 25mL de solución salina estéril (SSE) y su correspondiente centrifugación.

Por último se realizó una resuspensión del material celular limpio en 40mL de SSE. Esta nueva resuspensión se empleó en el ensayo de desinfección.

4.1.2 *H. pylori* en estado VNC

El caldo destinado a la obtención de *H. pylori* en su estado VNC fue centrifugado a 15 000 rpm y 10°C durante 15 minutos, con el objetivo de recolectar el material celular de la bacteria. Después de la recolección de la bacteria desde el caldo, se llevaron a cabo dos lavados. Cada lavado consistió en resuspender el material celular de la bacteria en 25mL de SSE y su correspondiente centrifugación.

La última resuspensión del material celular limpio se llevó a cabo en 40mL de SSE, en esta nueva resuspensión de la bacteria se inició el proceso de inducción hacia el estado VNC.

Para llevar a cabo la inducción de *H. pylori* a su estado VNC fue necesario verificar la morfología de la bacteria por medio de tinción de Gram (BD™ Gram Stain Kits and Reagents). El monitoreo del estado VNC se realizó durante 10 días, bajo tres controles diferentes: el cultivo en placa, la tinción de Gram y q-PCR (PMA), con el fin de determinar la pérdida en la capacidad de cultivo pero no la viabilidad.

Las suspensiones finales de la bacteria en ambos estados fueron colocadas cada una en un tubo Corning™ de 50mL, como se muestra en la Figura 23. Cada suspensión se estandarizó en una concentración aproximada de 3 en la escala nefelométrica de McFarland (9×10^8 células·mL⁻¹), esto se determinó por medio de un equipo denominado Nefelómetro como el mostrado en la Figura 24.





Figura 23 Suspensiones de *H. pylori*



Figura 24 Nefelómetro

4.2 Desinfección

4.2.1 Diseño experimental

Los parámetros de diseño para llevar a cabo el proceso de desinfección son los siguientes:

- Concentración residual del ozono.
- Selección de un rango de valores de C·t.
- Unidades experimentales aplicadas a la bacteria en su estado viable y VNC.
- Triplicado de cada unidad experimental.

Se determinó emplear una concentración residual constante de 0.6mg/L de ozono en la fase líquida. Este valor se determinó gracias a diversas pruebas realizadas en el equipo de ozonización, con la única finalidad de verificar que la concentración del ozono en la fase acuosa a lo largo del tiempo permaneciera lo más estable posible.





Por su parte el rango de valores de $C \cdot t$ fue seleccionado con base en datos reportados por la EPA 1999, para la inactivación de diversos microorganismos (*Giardia* $C \cdot t = 0.72 \text{ mg/L min}$ y *Virus* $C \cdot t = 0.50 \text{ mg/L min}$), así como el dato reportado por Baker et al., 2002 para *H. pylori* ($C \cdot t = 0.24 \text{ mg/L min}$). Así el rango de valores de $C \cdot t$ se estableció entre 0.2 mg/L min y 2 mg/L min , además se incluyeron dos puntos extras: uno en el que no se aplicó desinfectante y otro en el que se aplicó el desinfectante por un tiempo prolongado.

Así, conociendo el valor de la concentración residual y los valores de $C \cdot t$, se calculó el tiempo de contacto requerido para cada uno de los experimentos.

De manera estándar se establecieron 10 unidades experimentales como se observa en la Tabla 5, dichas unidades experimentales se aplicaron a la bacteria *H. pylori* en su estado Viable y VNC, por lo que se extendieron a 20 unidades experimentales; aunado a esto, el triplicado en las unidades experimentales dio como resultado un total de 60 unidades experimentales.

Tabla 5 Diseño de las unidades experimentales

Experimento	C_R (mg/L)	Tiempo (min)	$C \cdot t$ (mg/L min)
1	-	0	0
2	0.6	0.33	0.2
3	0.6	0.66	0.4
4	0.6	1	0.6
5	0.6	1.33	0.8
6	0.6	1.66	1.0
7	0.6	2.33	1.4
8	0.6	3	1.8
9	0.6	3.33	2
10	0.6	∞	∞



4.2.2 Unidad de oxidación

La unidad de oxidación empleada en la preparación de la solución stock de ozono se muestra en las Figura 25, mientras que el generador de ozono se muestra en la Figura 26.



Figura 25 Unidad de oxidación Labo 76 Emery Trailigaz.



Figura 26 Generador de ozono.

La unidad de oxidación se encuentra conformada por un Separador de Aire (Airsep modelo AS-12, USA), un Generador de Ozono (Labo 76 Emery Trailigaz, USA), un Medidor de flujo gas, una Columna de Burbujeo, un Filtro, un Analizador de Ozono Fase Gas (Ozone Monitor 465H, Teledyne Instruments) y un Destructor de Ozono (PCI Ozone & Control Systems Inc.). El diagrama de la unidad se muestra en la Figura 27.

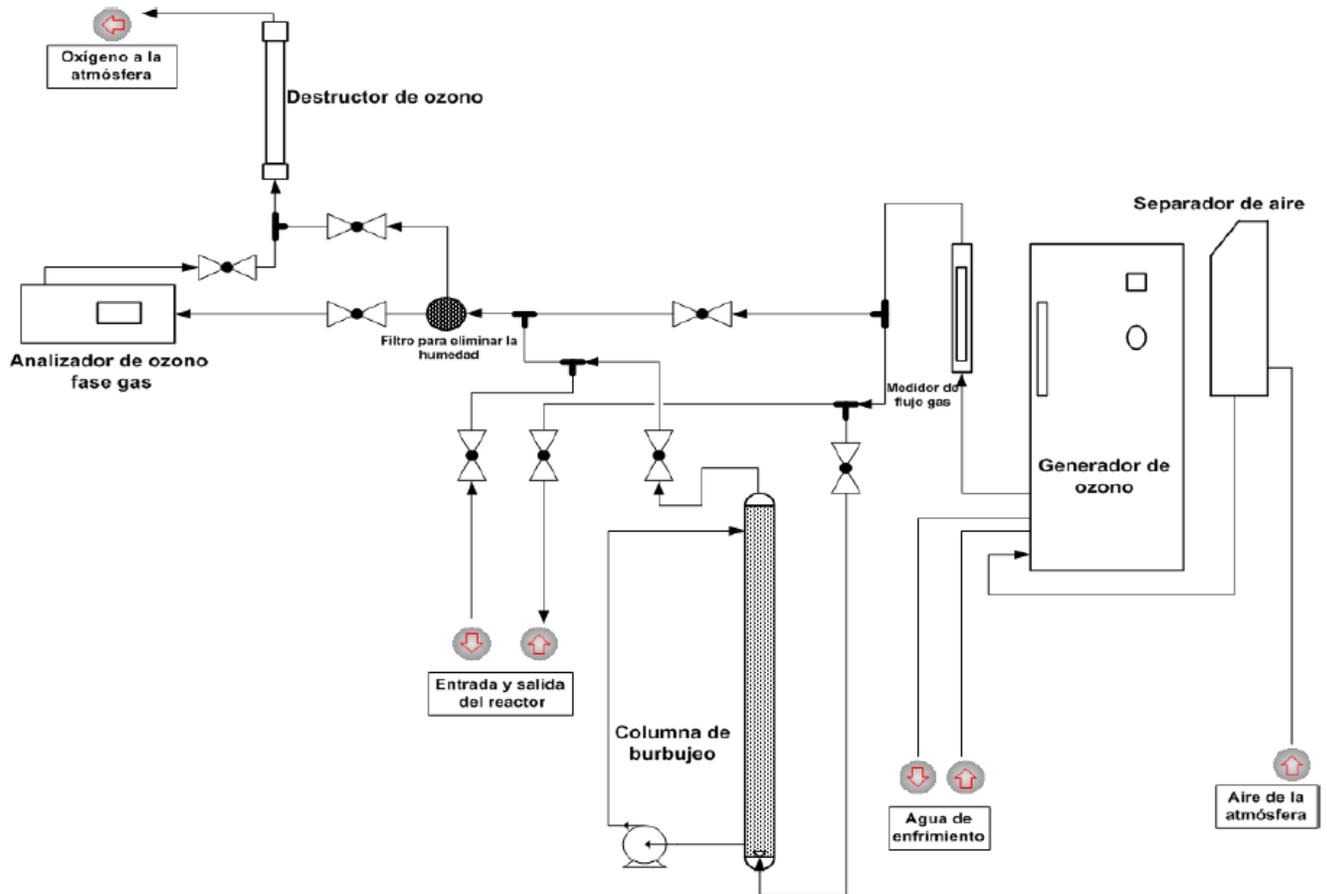


Figura 27 Diagrama del sistema de ozonización

El generador de ozono emplea aire proveniente de la atmósfera, el cual es enriquecido con oxígeno en el Separador de aire. Una vez que el ozono es producido, circula por un medidor de flujo para después entrar a la columna de burbujeo. La columna de burbujeo es de cristal con 5cm de diámetro, 110cm de altura y una capacidad de 2L, además se encuentra equipada al fondo con un difusor de vidrio poroso cuyo tamaño de poro es de 10µm. Una vez que el ozono no disuelto sale de la columna de burbujeo, se hace pasar por un filtro para retirar la humedad, un analizador de ozono y por último una unidad destructora de ozono, para expulsar aire libre de ozono hacia la atmósfera.



4.2.3 Proceso de desinfección

Dentro de la columna de burbujeo (Figura 28) fue preparada la solución stock de ozono con 1.5L de agua destilada y un flujo en el generador de ozono de 0.5L/min durante un tiempo de saturación de 30 minutos.

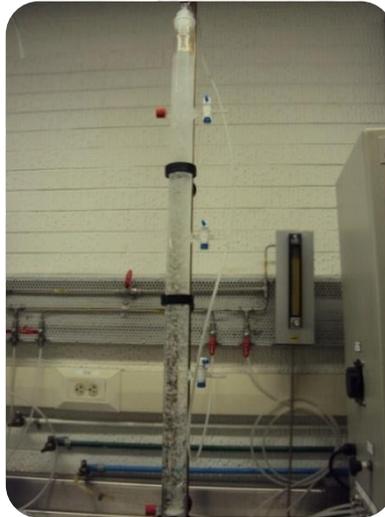


Figura 28 Columna de burbujeo de ozono

El cálculo de la concentración de ozono en la fase líquida se realizó mediante el “Método colorimétrico de índigo” (Bader and Hoigné, 1981), el cual relaciona la disminución de la absorbancia con el incremento de la concentración de ozono, debido a que el oxidante actúa sobre el reactivo índigo trisulfonato de potasio ($C_{16}H_7K_3N_2O_{11}S_3$) decolorando la solución, llevándola de azul a incolora. La disminución de la absorbancia fue determinada mediante un espectrofotómetro HACH DR3900 (Figura 29) a una longitud de onda de 600nm.



Figura 29 Espectrofotómetro HACH DR900



Una vez obtenida la absorbancia en el espectrofotómetro la concentración residual se calculó mediante la Ecuación 6:

$$C_r = \frac{(A_b - A_m) * 100}{0.42 * V_m * C}$$

Dónde:

- C_r = Concentración residual del ozono en la fase acuosa.
- A_b = Absorbancia del blanco.
- A_m = Absorbancia de la muestra.
- 0.42 = Factor de sensibilidad de 20000/cm para el cambio de absorbancia (600nm) por mol de ozono añadido por litro.
- V_m = Volumen de la muestra (mL).
- C = Recorrido de la luz en la celda (cm).

Una vez que se obtuvo la concentración residual de la solución stock de ozono, se procedió al cálculo de la cantidad de solución stock requerida para alcanzar la concentración residual requerida por el experimento (0.6mg/L), esto mediante la Ecuación 7:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Dónde:

- C_1 : Corresponde al valor de la concentración residual requerida por el experimento (0.6mg/L).
- V_1 : Corresponde al valor del volumen en nuestro reactor (40mL).
- C_2 : Corresponde al valor promedio de la concentración residual dentro de la columna de burbujeo. (el valor obtenido con la Ecuación 6)
- V_2 : Corresponde al valor de la solución stock de ozono necesario dentro de cada reactor (la incógnita).





El proceso de desinfección en cada una de las unidades experimentales, se llevó a cabo en reactores por lotes (tubos Corning™ de 50mL) como se muestra en la Figura 30. En cada reactor se colocó 1mL de la solución bacteriana correspondiente, el volumen de solución stock calculada con la Ecuación 7, además de SSE hasta alcanzar un volumen de 40mL dentro del reactor.

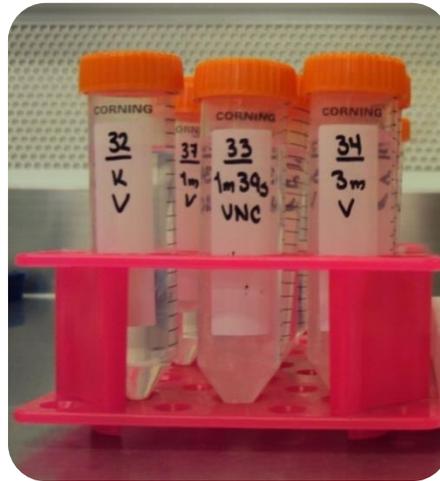


Figura 30 Reactores de desinfección

Una vez transcurrido el tiempo de desinfección establecido para cada unidad experimental se agregaron 2mL de una solución de Na_2SO_3 (1M) y así detener la acción del ozono sobre las bacterias.

4.3 Análisis q – PCR

4.3.1 Recuperación de las muestras

Una vez que se llevó a cabo el proceso de desinfección se procedió a la recolección del material celular de la bacteria contenido en cada uno de los reactores.

Dicha recolección se llevó a cabo por medio de filtración en vacío con equipos estériles (Figura 31) y filtros de policarbonato Millipore™ con tamaño de poro de $2\mu\text{m}$ y diámetro de 47mm (Figura 32).





Figura 31 Equipo de filtración al vacío



Figura 32 Filtros de polycarbonato
Millipore™

Una vez que se llevó a cabo la filtración, cada uno de los filtros empleados fueron colocados por separado en un tubo Falcon nuevo de 15mL, al que se le agregaron 3mL de SSE para obtener una nueva resuspensión (Figura 33).



Figura 33 Tubos Falcon

4.3.2 Extracción de ADN

El desarrollo de las pruebas moleculares requiere de un pretratamiento en las muestras, pues al ser técnicas altamente especializadas y precisas, requieren llevarse a cabo directamente sobre el ADN de la bacteria.





Por lo tanto el primer paso fue la extracción del ADN contenido en cada una de las unidades experimentales. Dicha extracción se llevó a cabo en un equipo automatizado denominado NucliSENS® easyMAG® (Figura 34). Este equipo es capaz de realizar 24 pruebas en cada corrida.



Figura 34 Equipo de extracción de ADN NucliSENS® easyMAG®

El proceso de extracción dentro de en este equipo se basa en partículas de sílice magnéticas, las cuales permiten la captura dinámica de los ácidos nucleicos así como lavados que no presentan pérdida de materia. Dicho proceso consta de cuatro etapas (Figura 35):

- A. Incubación: En esta etapa todo el ácido nucleico lisado es capturado por las partículas magnéticas de sílice.
- B. Lavado: El dispositivo magnético dentro del equipo atrae toda la sílice, permitiendo al sistema purificar los ácidos nucleicos.
- C. Elución: Por medio de calentamiento se liberan los ácidos nucleicos de la sílice.
- D. Purificación: En esta última etapa las partículas magnéticas son separadas con el dispositivo magnético



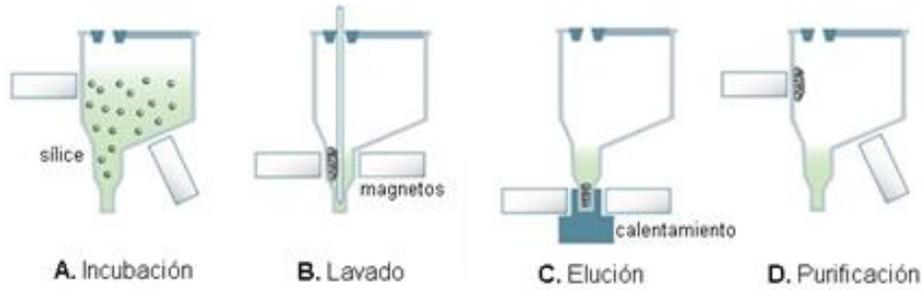


Figura 35 Etapas en el proceso de extracción de ADN

Como se observa en la Figura 35 cada una de las pruebas se lleva a cabo en pequeños contenedores; dentro de cada contenedor se colocaron 2mL de una solución compuesta por 1.5mL de solución buffer de lisis y 0.5mL de la resuspensión contenida en los tubos Falcon, además de 200 μ L de sílice. En la Figura 36 se pueden observar ocho de los 24 contenedores que el equipo es capaz de procesar, ya con la preparación de la muestra y la sílice lista, mientras que en la Figura 37 se puede observar los contenedores dentro del equipo una vez que las muestras fueron procesadas.



Figura 36 Contenedor de muestra para extracción de ADN

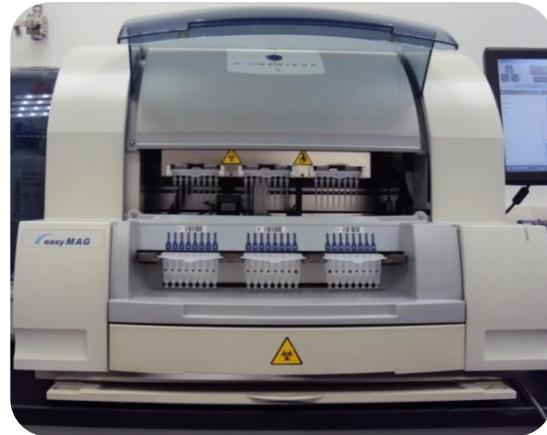


Figura 37 Equipo de extracción de ADN con las muestras procesadas



4.3.3 Ensayo de q – PCR

Una vez que se llevó a cabo la extracción del ADN se procedió al desarrollo de la prueba molecular denominada q – PCR. Inicialmente se agregó una mezcla de reacción directamente sobre la muestra de ADN obtenida, para posteriormente llevar a cabo el proceso de q – PCR.

Dicha mezcla de reacción estuvo compuesta por secuencias de cebadores y sondas específicas de una subunidad del gen *ureA* encontrado en la bacteria *H. pylori*; la cantidad de reactivos, así como de ADN empleados para cada una de las muestras se presenta en la Tabla 6:

Tabla 6 Composición de reactivos de PCR para cada muestra

Reactivo	Cantidad (μL)
Taq Man universal master mix 2x	12.25
Primer HpyF	0.25
Primer HpyR	0.25
Sonda HpyP1	0.25
H ₂ O	7
ADN	5
Total	25

Cada muestra se colocó dentro de uno de los pozos en una placa como la mostrada en la Figura 38:



Figura 38 Placa para muestras de PCR

El desarrollo del q-PCR se llevó a cabo en un equipo denominado Applied Biosystems™ Fast 7500, como el mostrado en la Figura 39. Este equipo es capaz de procesar un total de noventa y seis muestras en cada corrida, sin embargo dentro de cada una de esas corridas es necesario colocar material genético para construir una curva estándar de cinco puntos y tomando en cuenta que cada una de las muestras se lleva a cabo por triplicado, al final sólo se procesaron 27 muestras en cada corrida, por lo que fueron necesarias tres corridas para procesar todas las muestras del experimento.



Figura 39 Equipo de q-PCR Applied Biosystems™ Fast 7500

Las condiciones de operación en el equipo fueron: 10 minutos a 95°C y 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

En este ensayo se realizaron triplicados de cada una de las unidades experimentales, es decir que de las 60 unidades experimentales iniciales se obtuvieron un total de 180, por lo que se requirieron tres corridas en total para procesar cada una de las muestras.

4.4 Cinética y cámara de contacto

4.4.1 Cinética

En la sección 3.6.2 Cinética de la desinfección, se menciona el uso de distintos modelos para obtener los valores de la cinética, la obtención de dichos valores es única y corresponde a cada par desinfectante – patógeno, en este caso el par de interés es ozono – *H. pylori* y los modelos matemáticos empleados fueron la Ley de Chick y el modelo chick – Watson.

La ley de Chick en su forma descrita por la Ecuación 4 nos permite conocer la constante cinética de desinfección.

$$\ln\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = k t$$

Mientras que el Modelo Chick – Watson en su forma descrita por la Ecuación 5 nos permite conocer el valor del coeficiente de letalidad. En este caso el valor del coeficiente de dilución n tiene un valor de 1 (el valor del $C \cdot t$ se mantiene constante, independientemente de la concentración del desinfectante).

$$\ln\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = \Lambda C^n \cdot t$$

Tanto la Ley de Chick como el modelo Chick – Watson fueron empleados en su forma lineal por lo que el manejo de los datos se llevó a cabo por medio de regresiones lineales.

4.4.2 Cámara de contacto

Como parte del cálculo de la cámara de contacto es necesario determinar el decaimiento de ozono. Dicho decaimiento se determinó midiendo el ozono residual sucesivamente en una muestra de agua que fue ozonizada lo suficiente para satisfacer cualquier demanda inicial que pudiera existir y además establecer un residual. En este caso el decaimiento del ozono se determinó en agua destilada, ozonizada con la unidad de oxidación Labo 76 Emery Trailigaz USA, a una temperatura de 23°C y con un pH de 7.



Una vez obtenida la constante de decaimiento del ozono se procedió al cálculo de cada etapa, el cual debió llevarse a cabo por separado, pues cada una de ellas cuenta con características especiales que deben ser tomadas en cuenta. En la Figura 40 se muestra un esquema general de las características y metodología abordada para el cálculo de cada una de las etapas.

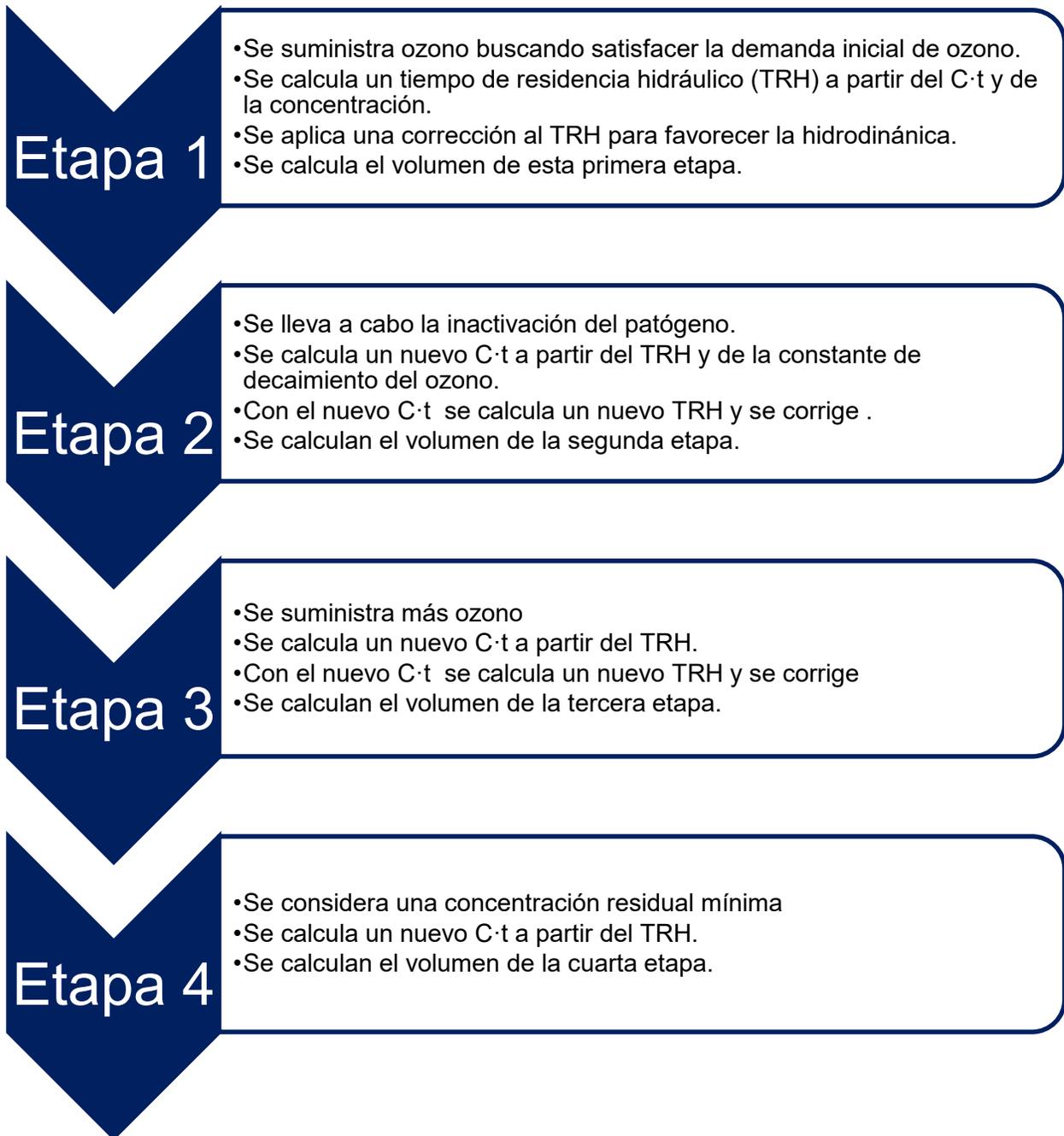


Figura 40 Esquema de cálculo de las etapas de la cámara de contacto



5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados se dividen en tres secciones: la primera corresponde a la bacteria *H. pylori* en el estado viable, la segunda corresponde a la bacteria *H. pylori* en el estado VNC y la última corresponde a la propuesta de diseño de la cámara de contacto con ozono para la desinfección de agua sintética contaminada con *H. pylori*. En las dos primeras secciones se llevaron a cabo los cálculos que permitieron determinar la cinética: la constante de velocidad (Ley de Chick) y el coeficiente de letalidad (Modelo Chick – Watson).

5.1 *H. pylori* en estado viable

En la Tabla 7 se pueden observar los resultados obtenidos para la bacteria *H. pylori* en su estado viable. En la primer columna se muestran los valores de C·t que fueron aplicados a cada muestra, en la segunda columna se muestran los tiempos de contacto, en la tercer columna se muestran los resultados de la cuantificación arrojados por el equipo de q-PCR Applied Biosystems™ Fast 7500, en la cuarta columna se muestra el promedio del triplicado de las cuantificaciones, por lo que en la quinta columna se muestra el valor de la desviación estándar para el triplicado de las cuantificaciones en cada uno de los C·t's correspondientes, por último en la sexta columna se muestra el valor del logaritmo del cociente entre el número de bacterias cuantificadas y el número de bacterias iniciales.



Tabla 7 Resultados de q-PCR para *H. pylori* en estado Viable

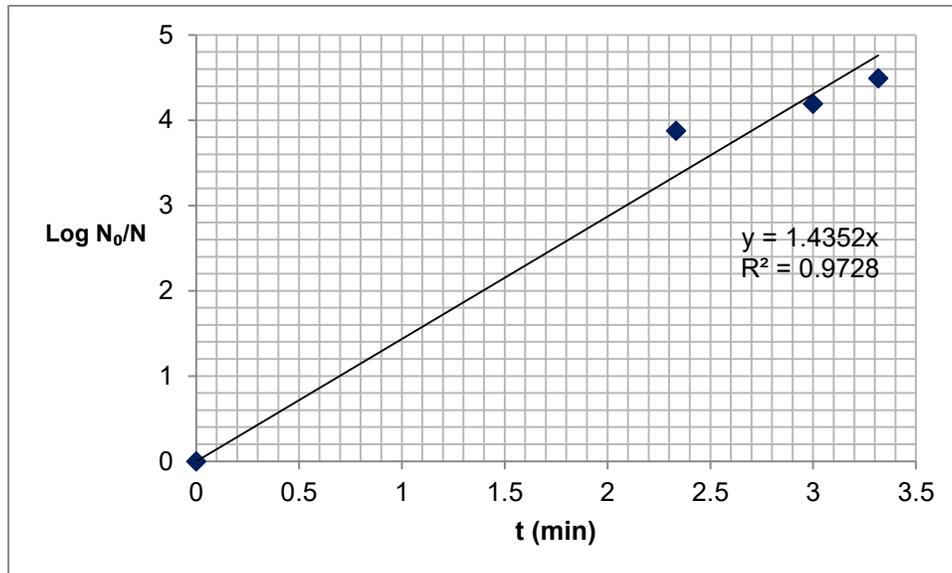
C·t (min·mg·L ⁻¹)	t (min)	Qty	Promedio	Desv. Est.	Log (N ₀ /N)
0	0.00	8.80E+08	8.47E+08	3.51E+07	0.00
		8.50E+08			
		8.10E+08			
0.2	0.33	3.16E+06	3.48E+06	4.62E+05	2.39
		3.27E+06			
		4.01E+06			
0.4	0.60	1.99E+06	2.36E+06	3.75E+05	2.56
		2.34E+06			
		2.74E+06			
0.6	1.00	1.01E+06	1.25E+06	2.15E+05	2.83
		1.33E+06			
		1.42E+06			
0.8	1.33	2.26E+05	2.82E+05	4.88E+04	3.48
		3.09E+05			
		3.12E+05			
1	1.65	1.34E+05	1.45E+05	1.55E+04	3.77
		1.39E+05			
		1.63E+05			
1.4	2.33	1.02E+05	1.13E+05	1.51E+04	3.88
		1.06E+05			
		1.30E+05			
1.8	3.00	5.34E+04	5.45E+04	3.97E+03	4.19
		5.12E+04			
		5.89E+04			
2	3.32	2.82E+04	2.72E+04	1.42E+03	4.49
		2.79E+04			
		2.56E+04			
4	∞	9.90E+03	9.42E+03	4.54E+02	4.95
		9.35E+03			
		9.00E+03			





5.1.1 Ley de Chick

Con la Ley de Chick en su forma lineal (Ecuación 4) y con resultados de la Tabla 7 se llevó a cabo la Gráfica 1, en la cual podemos observar que la regresión lineal llevada a cabo por Excel 2013 arroja una constante de velocidad de $k = 1.4352 \text{ min}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0.9728 y un valor de desviación estándar de 0.30.

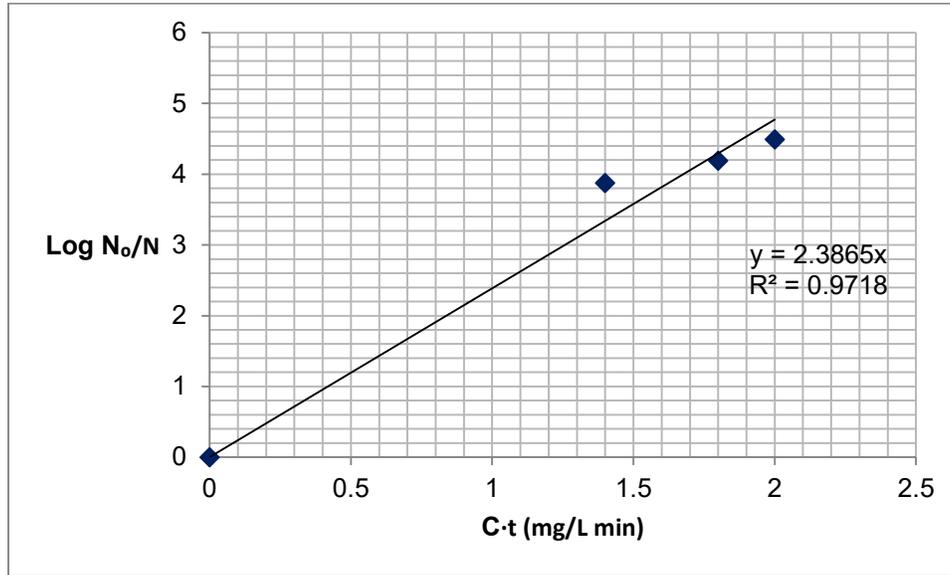


Gráfica 1 Log N_0/N vs t de *H. pylori* en estado viable

5.1.2 Modelo Chick – Watson

Con el Modelo Chick – Watson (Ecuación 5) y con resultados reportados en la Tabla 7 se llevó a cabo la Gráfica 2, en la cual podemos observar que la regresión lineal llevada a cabo por Excel 2013 arroja un coeficiente de letalidad de $\Lambda = 2.3865 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0.9718 y un valor de desviación estándar de 0.31.





Gráfica 2 Log N/N_0 vs $C \cdot t$ de *H. pylori* en estado viable

Por lo tanto la ecuación de Chick – Watson para *H. pylori* en su estado viable, según la Ecuación 5 es la siguiente (Ecuación 8):

$$\ln\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = (2.3865 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) * C \cdot t$$

Esto quiere decir que para lograr una desinfección 2–Log (99%) se requiere de un valor de $C \cdot t_{99}$ de $0.84 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

5.2 *H. pylori* en estado VNC

En la Tabla 8 se pueden observar los resultados obtenidos para la bacteria *H. pylori* en su estado viable. En la primer columna se muestran los valores de $C \cdot t$ que fueron aplicados a cada muestra, en la segunda columna se muestran los tiempos de contacto, en la tercer columna se muestran los resultados de la cuantificación arrojados por el equipo de q-PCR Applied Biosystems™ Fast 7500, en la cuarta columna se muestra el promedio del triplicado de las cuantificaciones, por lo que en la quinta columna se muestra el valor de la desviación estándar para el triplicado de las cuantificaciones en cada uno de los $C \cdot t$'s correspondientes, por





último en la sexta columna se muestra el valor del logaritmo del cociente entre el número de bacterias cuantificadas y el número de bacterias iniciales.

Tabla 8 Resultados de q-PCR para *H. pylori* en estado VNC

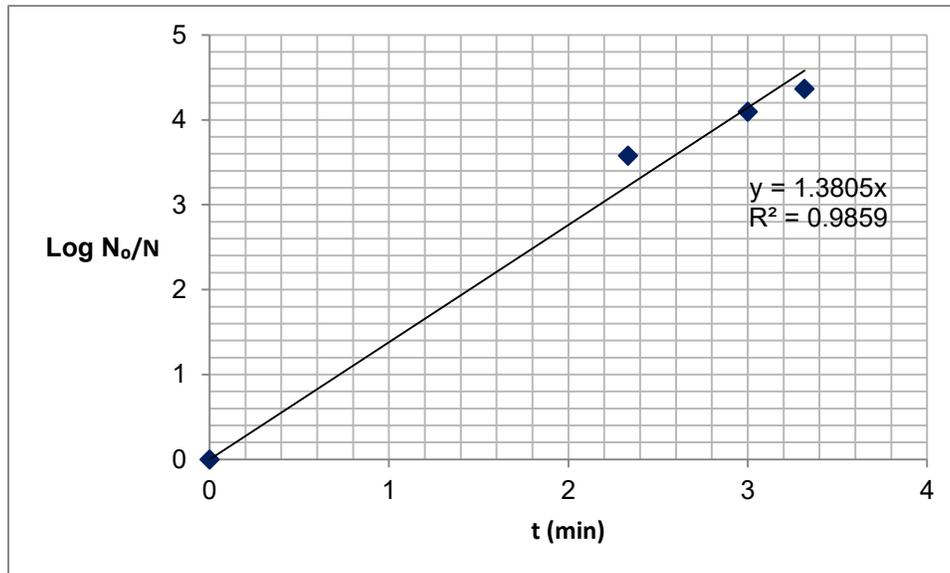
C·t (min·mg·L ⁻¹)	t (min)	Qty	Promedio	Desv. Est.	Log (N ₀ /N)
0	0.00	9.10E+08	9.22E+08	1.26E+07	0.00
		9.35E+08			
		9.20E+08			
0.2	0.33	8.96E+06	9.05E+06	4.08E+05	2.01
		9.50E+06			
		8.70E+06			
0.4	0.60	2.10E+06	1.92E+06	2.10E+05	2.68
		1.97E+06			
		1.69E+06			
0.6	1.00	2.50E+06	2.71E+06	2.01E+05	2.53
		2.73E+06			
		2.90E+06			
0.8	1.33	4.26E+05	5.16E+05	9.16E+04	3.25
		6.09E+05			
		5.12E+05			
1	1.65	2.54E+05	2.72E+05	1.97E+04	3.53
		2.69E+05			
		2.93E+05			
1.4	2.33	2.42E+05	2.43E+05	2.30E+04	3.58
		2.66E+05			
		2.20E+05			
1.8	3.00	7.24E+04	7.38E+04	5.49E+03	4.10
		6.92E+04			
		7.99E+04			
2	3.32	3.82E+04	3.96E+04	2.63E+03	4.37
		3.79E+04			
		4.26E+04			
4	∞	9.50E+03	9.45E+03	3.28E+02	4.99
		9.75E+03			
		9.10E+03			





5.2.1 Ley de Chick

Con la Ley de Chick en su forma lineal (Ecuación 4) y con resultados de la Tabla 8 se llevó a cabo la Gráfica 3, en la cual podemos observar que la regresión lineal obtenida mediante Excel 2013 arroja una constante de velocidad de $k = 1.3805 \text{ min}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0.9859 y un valor de desviación estándar de 0.21.

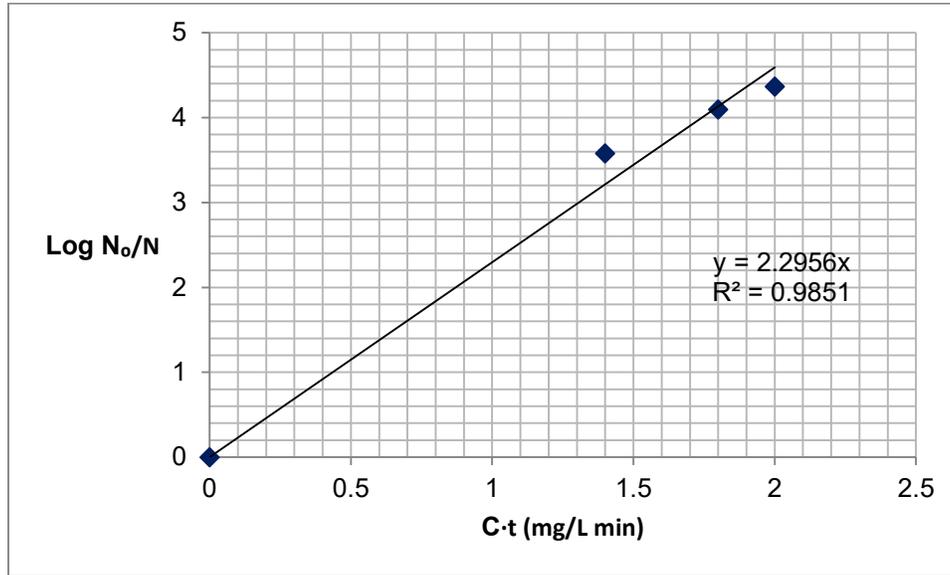


Gráfica 3 Log N/N₀ vs t de *H. pylori* en estado VNC

5.2.2 Modelo Chick – Watson

Con el Modelo Chick – Watson (Ecuación 5) y con resultados reportados en la Tabla 8 se llevó a cabo la Gráfica 4, en la cual podemos observar que la regresión lineal llevada a cabo por Excel 2013 arroja un coeficiente de letalidad de $\Lambda = 2.2956 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0.9851 y un valor de desviación estándar de 0.22.





Gráfica 4 Log N/N₀ vs C·t de *H. pylori* en estado VNC

Por lo tanto la ecuación de Chick – Watson para *H. pylori* en su estado VNC, según la Ecuación 5 es la siguiente (Ecuación 9):

$$\ln\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = (2.2956 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) * C \cdot t$$

Esto quiere decir que para lograr una desinfección 2–Log (99%) se requiere de un valor de C·t₉₉ de 0.87 min·mg·L⁻¹.

Los resultados se pueden resumir como se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9 Cinética de desinfección de *H. pylori*

<i>H. pylori</i>	Cte de velocidad (min ⁻¹)	Coef. de letalidad (L·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	Ct ₉₉ (min·mg·L ⁻¹)
Viable	1.44	2.39	0.84
VNC	1.38	2.30	0.87



Langlais *et al.*, 1991 reporta diversos valores de coeficiente de letalidad para los diferentes tipos de patógenos; para quistes de bacterias reporta $0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, para esporas de bacterias $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, mientras que para virus $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Los valores obtenidos de 2.39 y $2.30 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para *H. pylori* en el estado viable y VCN respectivamente, se encuentran por encima de los reportados para las esporas de bacteria.

En la Tabla 10 se muestran los valores de $C\cdot t_{99}$ para la desinfección con ozono de los diversos microorganismos patógenos reportados por la OMS:

Tabla 10 Valores de $C\cdot t_{99}$ reportados por la OMS para diferentes patógenos.

Grupo de patógenos	Patógeno	$C\cdot t_{99}$ ($\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	T (°C)
Bacterias	-	0.02	5
Virus	-	0.9	1
		0.3	15
Protozoos	<i>Giardia</i>	1.9	1
		0.63	15
	<i>Cryptosporidium</i>	40	1
		4.4	22

Los valores de $C\cdot t_{99}$ obtenidos para *H. pylori* (a 20°C) se encuentran por encima de los valores típicos reportados por la OMS para las bacterias, superando además a los valores reportados para los virus, incluso se encuentran ligeramente por encima de los valores reportados para *Giardia*.

Los parámetros tanto de coeficiente de letalidad como de $C\cdot t_{99}$ indican que la bacteria *H. pylori* presenta cierto grado de resistencia a la desinfección, lo cual probablemente ha influido en su propagación, pues se estima que actualmente alrededor del 50% de la población mundial ha contraído la infección (Wannmacher, 2011).



Para determinar si existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de la velocidad de reacción y del coeficiente de letalidad, se llevó a cabo una prueba estadística denominada “t de Student”, la cual nos permite comparar los valores obtenidos para cada parámetro en cada uno de los estados metabólicos de la bacteria *H. pylori* (el estado viable y el estado VNC).

➤ **Velocidad de reacción:**

- Estado viable: Cuatro puntos, promedio de -3.10min^{-1} y desviación estándar de 0.30.
- Estado VNC: Cuatro puntos, promedio de -2.99min^{-1} y desviación estándar de 0.21.
- Resultados: No se encontró diferencia significativa entre los valores obtenidos de la velocidad de reacción en la desinfección con ozono de la bacteria *H. pylori* en los dos estados metabólicos (viable y VNC).

➤ **Coeficiente de letalidad:**

- Estado viable: Cuatro puntos, promedio de $-4.19 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y desviación estándar de 0.31.
- Estado VNC: Cuatro puntos, promedio de $-3.01 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y desviación estándar de 0.22.
- Resultados: Se encontró un 98% de diferencia significativa entre los valores obtenidos del coeficiente de letalidad en la desinfección con ozono de la bacteria *H. pylori* en los dos estados metabólicos (viable y VNC).

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para la velocidad de reacción entre ambos estados metabólicos de la bacteria *H. pylori* con el ajuste lineal realizado, mientras que sí existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para el coeficiente de letalidad entre ambos estados metabólicos de la bacteria *H. pylori* con el ajuste lineal realizado.



5.3 Propuesta de diseño de la cámara de contacto

Para la propuesta de diseño de la cámara de contacto se seguirán los siguientes criterios de diseño:

- Objetivo del proceso
- Cantidad de ozono requerida
- Diseño de la cámara de contacto

5.2.1 Objetivo del proceso

El objetivo del proceso puede ser brindar un pretratamiento que permita eliminar el hierro y el magnesio, así como favorecer la coagulación o incluso incrementar la biodegradabilidad de cianuros, nitritos, sulfuros o fenoles. Sin embargo no es el único, pues otro objetivo puede ser, llevar a cabo una desinfección que nos permita eliminar bacterias, virus, hongos o incluso esporas en el influente de agua.

En este caso el objetivo del proceso es la desinfección de agua contaminada con *H. pylori* en el estado VNC y la cámara de contacto más empleada en plantas de tratamiento de agua para esta finalidad es la “Cámara de contacto en multietapas con difusor poroso de burbujas finas”.

5.2.2 Cantidad de ozono requerida

En la desinfección con ozono el factor más importante a considerar es la velocidad de inactivación de los microorganismos y no la transferencia de masa, por lo que es necesario aproximar el comportamiento del flujo de la cámara de contacto al de un reactor tipo pistón o PFR para asegurar un tiempo de contacto adecuado.

Con el objetivo de mantener las condiciones hidrodinámicas adecuadas se recomienda mantener la siguiente relación entre el flujo de alimentación de ozono y el flujo de alimentación de agua:

$$\frac{Q_{GO_3}}{Q_{LH_2O}} = de\ 0.15\ a\ 0.20$$



Si el flujo a tratar es de $1 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ($3600 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) y si fijamos una relación de 0.17, el flujo de ozono debe ser de:

$$Q_{GO_3} = (0.17) * \left(3600 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right) = 612 \frac{\text{m}^3}{\text{h}}$$

5.2.3 Diseño de la cámara de contacto

Como ya se había mencionado el tipo de cámara de contacto a diseñar es la “Cámara de contacto en multietapas con difusor poroso de burbujas finas”, la cual puede tener desde 1 hasta 6 etapas divididas por mamparas.

En este caso la cámara de contacto contará con 4 etapas y suministro de ozono a contra corriente en las etapas 1 y 3 (Figura 40). Se estima alcanzar una desinfección 4-Log (99.99%).

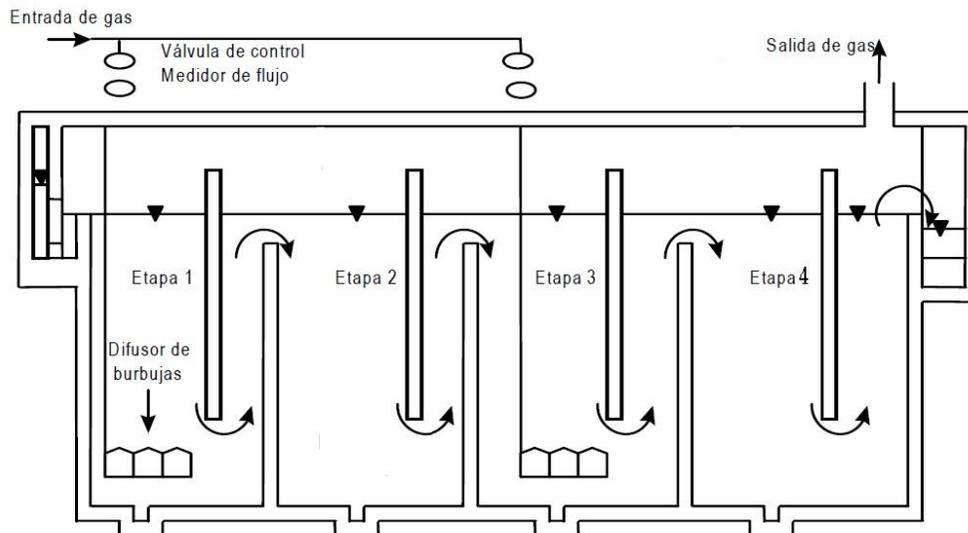
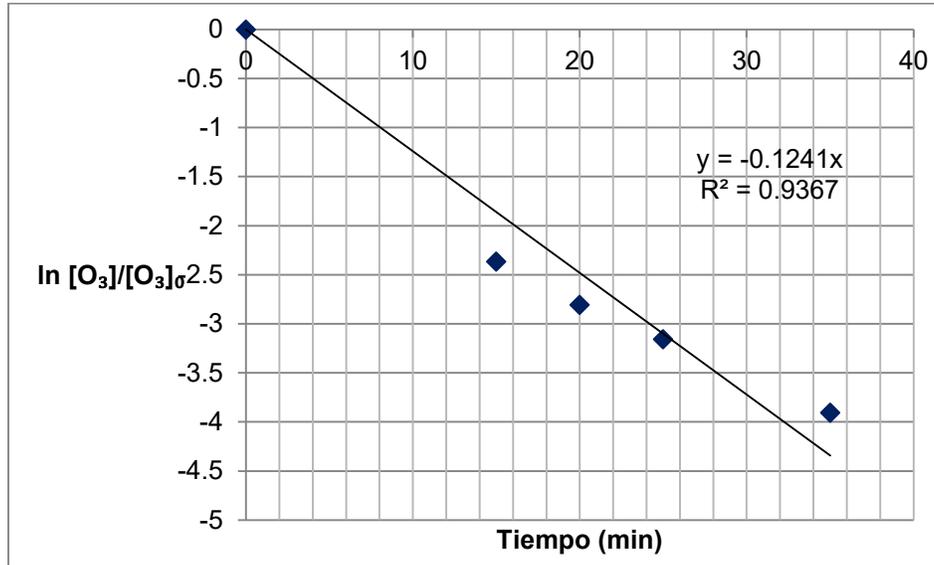


Figura 41 Cámara de contacto para desinfección de *H. pylori* con ozono

En la sección 4.4.2 Cámara de contacto, se señala la importancia del desarrollo de la constante de decaimiento del ozono. Las pruebas realizadas para determinar dicho decaimiento arrojaron los resultados que se observan en la Gráfica 5.





Gráfica 5 Decaimiento de ozono

Por lo tanto el valor de la constante de decaimiento para las condiciones de laboratorio en que se trabajaron es de: $k' = -0.1241 \text{ min}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.9367, obtenida con una regresión lineal en Excel 2010.

Una vez obtenida la constante de decaimiento de ozono se procedió al cálculo de las etapas correspondientes a la cámara de contacto, según la Figura 40 de la sección 4.4.2 Cámara de contacto. Por lo tanto las condiciones de inicio para el desarrollo de dichos cálculos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 Condiciones de inicio de la cámara de contacto.

Patógeno	<i>H. pylori</i>
Estado	VNC
Desinfección	4-Log
C·t	1.74 min·mg·L ⁻¹
Flujo de agua	1 m ³ ·s ⁻¹
Relación O₃-H₂O	0.17

Una vez realizados los cálculos de diseño correspondientes a cada una de las etapas se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 12.





Tabla 12 Resultados obtenidos por etapa de la cámara de contacto.

Etapa	Superficie (m²)	Longitud (m)	Ancho (m)	Altura (m)	TRH (min)	C·t (min·mg·L⁻¹)
1	6.97	0.77	9.00	5.00	0.58	-
2	2.79	0.31	9.00	5.00	0.23	0.59
3	6.00	0.67	9.00	5.00	0.50	0.29
4	106.23	11.78	9.00	5.00	8.85	0.88

Por lo tanto los resultados globales correspondientes a la cámara de contacto se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Resultados globales de la cámara de contacto.

Longitud total	13.5 m
Ancho total	9.00 m
Relación L-A	1.5
Altura	5.00 m
C·t total	1.86 min·mg·L ⁻¹

Como se muestra en la Tabla 12 en cada una de las etapas debe calcularse un C·t que será acumulable hasta alcanzar el C·t requerido para la inactivación del microorganismo patógeno en cuestión, *H. pylori* en este caso. Los C·t de cada etapa se encuentran en función del tiempo de residencia.

Al final del proceso de desinfección el efluente tratado en la cámara de contacto habrá sido sometido a un C·t de 1.87 min·mg·L⁻¹ el cual es ligeramente mayor al requerido para llevar a cabo la inactivación de *H. pylori* en el estado VNC (1.74 min·mg·L⁻¹), esto debido a los tiempos de residencia empleados en los cálculos, pues al cambiarlos el valor de C·t se dispara o decrece (dependiendo de la etapa en que se aplique la variación), sin embargo aquí se presentan los resultados





obtenidos con los tiempos de residencia que permitan obtener el $C \cdot t$ más próximo al requerido pero sin ser inferior.

La norma europea UNE–EN 1278 denominada “Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Ozono” señala que el rango de $C \cdot t$ requerido para la desinfección (incluyendo virus y parásitos) va de 1.6 a 2.4 $\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, aplicando una concentración de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ozono en un tiempo de contacto de 4 a 6 minutos. Por lo tanto el $C \cdot t$ para inactivar *H. pylori* en cualquiera de sus dos estados metabólicos, así como el $C \cdot t$ obtenido en el cálculo de la cámara de contacto se encuentran dentro del rango contemplado por dicha norma. Cabe mencionar que ésta norma es la única a nivel mundial que establece las condiciones para llevar a cabo la desinfección con ozono.





6. CONCLUSIONES

- Los valores de $C \cdot t_{99}$ obtenidos para la inactivación con ozono de *H. pylori* fueron $0.84 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el estado viable y $0.87 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el estado VNC. Con base en estos valores de $C \cdot t_{99}$ obtenidos, la bacteria *H. pylori* en el estado VNC mostró mayor resistencia al proceso de desinfección que en estado viable.
- Los valores de coeficiente de letalidad obtenidos en la desinfección de *H. pylori* con ozono fueron $-2.39 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para el estado viable y $-2.30 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para el estado VNC. Según los valores obtenidos de $C \cdot t_{99}$ y del coeficiente de letalidad, la bacteria *H. pylori* en cualquiera de sus dos estados metabólicos ha mostrado poseer mayor resistencia al proceso de desinfección con respecto a otros patógenos como *Giardia*.
- Con base en las diferencias observadas entre los valores de $C \cdot t$ requeridos para la inactivación de *H. pylori* (Tabla 9) con respecto a otros patógenos como los mostrados en la Tabla 10, se puede apreciar una aparente resistencia a la desinfección al demandar un mayor valor de $C \cdot t$ para su inactivación por lo que es mucho más recomendable el uso de ozono.
- Los valores obtenidos para la constante cinética de la desinfección con ozono de *H. pylori* a 20°C fueron -1.44 min^{-1} para el estado viable y -1.38 min^{-1} para el estado VNC. En ambos casos el valor de la constante cinética es mayor a 1, lo que significa que el proceso de desinfección requiere de un





mayor tiempo de contacto para lograr la reducción de un logaritmo en la concentración.

- El análisis “t de Student” mostró que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para la velocidad de reacción entre ambos estados metabólicos de la bacteria *H. pylori* con el ajuste lineal realizado, mientras que sí existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para el coeficiente de letalidad entre ambos estados metabólicos de la bacteria *H. pylori* con el ajuste lineal realizado.
- Una cámara de contacto que permita inactivar en un 99.99% la bacteria *H. pylori* en estado VNC, para un flujo de $1 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ debe contar con 13.5 m de largo, 9 m de ancho y 5 m de altura, un TRH de 10.1 min t y un C·t de $1.77 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para el diseño de la cámara de contacto el parámetro más importante es el C·t de inactivación, el cual se encuentra en función del patógeno a tratar y del nivel de desinfección que se desee alcanzar. El flujo es un parámetro que puede ajustarse dependiendo del espacio disponible. Mientras que las dimensiones de cada etapa se encuentran en función del tiempo de residencia y de los puntos de suministro de ozono.

Recomendaciones:

- Se recomienda realizar la propuesta de una normatividad ante las autoridades correspondientes, que permita indicar los parámetros necesarios para llevar a cabo la desinfección con ozono en el país; o que la bacteria *H. pylori* sea incluida dentro de los parámetros de características bacteriológicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.
- Se recomienda realizar un estudio a los pozos encargados de abastecer de agua potable a los habitantes de México, con la finalidad de ubicar la(s) fuente(s) de infección por *H. pylori* que permitan emprender acciones focalizadas de desinfección para erradicar a la bacteria y por ende disminuir el alto porcentaje de infección provocada por ésta en nuestro país donde se estima que la prevalencia es de entre el 70 y el 90% (Torres *et al.*, 2016).



7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de Protección Ambiental. (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales Desinfección con luz ultravioleta. *EPA*.
- Arena, D. E. (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales Desinfección con cloro. *EPA*
- Arena, D. E. (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales Desinfección con ozono. *EPA*
- Azevedo, N. F., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W., and Vieira, M. J. (2007). Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3423–3427.
- Azzellino, A., Antonelli, M., Canziani, R., Malpei, F., Marinetti, M., and Nurizzo, C. (2011). Multivariate modelling of disinfection kinetics: A comparison among three different disinfectants. *Desalination and Water Treatment*, 29(1-3), 128–139.
- Bader, H., and Hoigne, J. (1981). Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Research*, 15(4), 449–456.
- Baker, K. H., Hegarty, J. P., Redmond, B., Reed, N. a., and Herson, D. S. (2002). Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 981–984.
- Brown, T., LeMay, E., Bursten, B., and Burdige, J. (2004). “Química La ciencia central” Novena edición Pearson Education.
- Casasola, B. (2012) “Uso de PCR cuantitativa para evaluar la desinfección con ozono de agua contaminada con *Helicobacter pylori*” Tesis de Maestría. Instituto de Ingeniería UNAM.
- Comisión Nacional del Agua (2005). “Sistema Cutzamala, agua potable para millones de mexicanos” México D.F. Comisión Nacional del Agua.
- Comisión Nacional del Agua. (2000). “Desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento. Desinfección. Manual de diseño de agua potable alcantarillado y saneamiento”.
- Durán, A., Cisneros A. y Vargas A. (2005) “Bioestadística”. Segunda Edición. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM México 260pp.





- Dus, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., and Radwan-Oczko, M. (2013). Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research - New approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 67, 261–268.
- Environmental Protection Agency (United States of America) (1999). *Guidance Manual. Alternative Disinfectants and Oxidants.*
- Environmental Protection Agency (Ireland). (2013). *Water Treatment Manual : Disinfection.*
- Gião, M. S., Azevedo, N. F., Wilks, S. a., Vieira, M. J., and Keevil, C. W. (2010). Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1669–1673.
- Gilbride, K. (2013). *Molecular Methods for the Detection of Waterborne Pathogens. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Applications. Elsevier.*
- Gottschalk, C., Libra, J. and Saupe, A. (2010). *Ozonation of water and wastewater: A practical guide to understanding ozone and its applications. Wiley – VCH Weinheim.*
- Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP (2004). Challengemodel for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*; 53 (9):1235–43.
- Hegarty JP, Dowd MT and Baker KH. (1999). Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J Appl Microbiol*;87:697.
- Hulten K, Enroth H, Nyström T and Engstrand L. (1998) Presence of *Helicobacter pylori* species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol*; 85:282.
- Invitrogen Detection Technologies (2004). LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. *Molecular Probes.*
- Langlais, B., Reckhow, D. and Brink, D. (1991). *Ozone in water treatment Application and Engineering. American Water Research Lewis Publishers.*
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1.
- Life technologies. (2012). *Real-time PCR handbook*, 70.
- Linke, S., Lenz, J., Gemein, S., Exner, M., and Gebel, J. (2010). Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3), 176–182.
- Lopes, D., Nunes, C., Martins, M. C. L., Sarmiento, B., and Reis, S. (2014). Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 189, 169–86.
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., de León, S. P., and Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City. *Archives of Medical Research*, 32(5), 458–467.





- McKeown I, Orr P, MacDonald S, Kabani A, Brown R, Coghlan G, Dawood M, Embil J, Sargent M, Smart G. and Bernstein CN.(1999) *Helicobacter pylori* in the Canadian arctic: seroprevalence and detection in community water samples. *Am J Gastroenterol*. Jul; 94(7):1823.
- Mobley, H., Mendz, G. and Hazell S. (2001). *Helicobacter pylori* Physiology and Genetics ASM Press, Washington DC.
- Moreno, Y., Ferrús, M. a, Alonso, J. L., Jiménez, A., and Hernández, J. (2003). Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Research*, 37(9), 2251–6.
- Norma Europea UNE – EN 1278 (2010) Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Ozono.
- 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
- Oliver, J. (2000). The public health significance of viable but nonculturable bacteria. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press. Washington D.C.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 93–100.
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura UNESCO (2003) Agua para todos, agua para la vida. [En línea] Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001494/149406s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (2012). Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012. [En línea] Disponible en: www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/es/
- Organización Mundial de la Salud (2015) Centro de prensa [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
- Organización Mundial de la Salud (2015). Zoonosis y medio ambiente. [En línea] Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/zoonose/es/
- Organización Mundial de la Salud (2016). Organización Mundial de la Salud. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/en/>
- Organización Mundial de la Salud. (2008). Guías para la calidad del agua, Volumen 1, Tercera Edición.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Agua. [En línea] Disponible en: www.who.int/topics/water/es/
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Cada año mueren 12,6 millones de personas a causa de la insalubridad del medio ambiente. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/deaths-attributable-to-unhealthy-environments/es/>
- Orta Ledesma, M. T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B. y Monje Ramírez, I. (2013) *H. pylori* es un patógeno resistente a los niveles habituales de cloro. La desinfección del agua y la salud humana. *Agua y Saneamiento ANEAS* 49.





- Pinto, D., Santos, M. A., and Chambel, L. (2013). Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 61–76.
- Premio Nobel (2005). Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2005. [En línea] Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html
- Román, P. (2013). Efecto sobre la estructura celular de *Helicobacter pylori* presente en agua por acción de cloro y ozono. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Smith, J. (1991). Ingeniería de la cinética química. Sexta reimpresión McGraw Hill 1991.
- Solnick JV, Hansen LM, Canfield DR, Parsonnet J. (2001). Determination of the infectious dose of *Helicobacter pylori* during primary and secondary infection in rhesus monkeys (Macaca mulatta). *Infect Immun*; 69 (11):6887–92.
- Spiegel, M. y Stephens L. (2009) “Estadística”. Cuarta Edición. Mc Graw Hill. México 577pp.
- Torres, F., García, A. y Zárate A. (2016) *Helicobacter pylori* Semanario El ejercicio actual de la medicina, Facultad de medicina UNAM [En línea] Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/ene_01_ponencia.html
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, a, Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094.
- Transparencia Distrito Federal (2016). Agua. [En línea] Disponible en: http://www.transparenciamedioambiente.df.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=121&Itemid=404
- Van Dijk, J. C. (2001) Water treatment. Drinking water. Water Treatment technology. Sanitary Engineering Department. Delft University of Technology. 115 – 134.
- Wahman, D. G., Wulfeck-Kleier, K. A., and Pressman, J. G. (2009). Monochloramine disinfection kinetics of *Nitrosomonas europaea* using propidium monoazide quantitative PCR (PMA-qPCR) and LIVE/DEAD(R) BacLight™. *Appl Environ Microbiol*, 75(17), 5555–5562.
- Wannmacher, L. (2011). Review of the evidence for *H. Pylori* treatment regimens. WHO18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines.
- West AP, Millar MR and Tompkins DS. (1990). Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. *J Clin Pathol*;43:609
- Wilding, P. and Kricka, L. (1996). Mesoscale polynucleotide amplification device and method. Patente US 5498392A.

