



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
(INGENIERÍA AMBIENTAL) – (AGUA)

**“EFECTO DE LA PLATA, COBRE, HIERRO Y AGREGADOS MINERALES
SOBRE HUEVOS DE HELMINTO Y SU POTENCIAL USO EN UN SISTEMA DE
FILTRACIÓN”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
RAFAEL MAGAÑA LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA,
UNAM
DR. JOSÉ ANTONIO BARRERA GODINEZ, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DRA. ALMA CONCEPCIÓN CHÁVEZ MEJÍA, INSTITUTO DE INGENIERÍA,
UNAM
DRA. TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, enero de 2018.



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: Dra. María Teresa Orta Ledesma
Secretario: Dra. Georgina Fernández Villagómez
1^{er} Vocal: Dr. José Antonio Barrera Godínez
2^{d o} Vocal: Dra. Alma Concepción Chávez Mejía
1^{er} Vocal: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

El presente trabajo ha participado en:

El presente trabajo ha sido de utilidad para la concepción y desarrollo de los proyectos académicos interdisciplinarios que se realizaron en específico en el rubro de mejoramiento funcional de una planta piloto tipo humedal artificial de flujo combinado para eliminar organismos patógenos y parasitarios, instalada dentro de la Facultad de Química de la UNAM.

Asimismo, en el PAIP (VMLP) 50009111, durante el periodo de 2014 a 2017 y en el proyecto UNAM/DGAPA PAPIIT IT103312. Diseño, construcción y evaluación de un sistema de tratamiento móvil para depuración y reúso de aguas residuales de tipo municipal. Enero 2012 a diciembre de 2014.

Los resultados obtenidos contribuyeron a la obtención de la PATENTE: Sistema móvil de flujo ascendente y descendente para depurar aguas contaminadas de materia orgánica, microorganismos patógenos y parásitos, septiembre de 2017, la cual fue otorgada por el IMPI en septiembre de 2017, bajo el número 349668.

Por otro lado, los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo se publicaron en la revista *Ecological Engineering* como:

Magaña-López, R., y Luna-Pabello, V.M., Barrera-Godínez, J.A., Orta de Velásquez, M.T. y Fernández-Villagómez, G., 2016. *Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of Toxocara canis eggs*, *Ecol. Eng.* 90:125-134.

Actualmente se encuentran en proceso:

Performance evaluation of experimental disinfectant filters as an alternative for helminth ova inactivation, para ser enviado a la revista *Ecological Engineering*.

Inactivation mechanisms by copper and iron silver compounds in helminth eggs, para ser enviada a la revista *Science of The Total Environment*.

Evaluation of different culture conditions for the artificial hatching of helminth eggs, para ser enviada a la revista *Water Research*.

Agradecimientos académicos:

Se hace patente el apoyo recibido por parte de CONACYT y UNAM por la beca otorgada para la realización del Doctorado en Ingeniería, dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería, UNAM.

Al Comité por la paciencia, empeño y trabajo desarrollado en el presente trabajo:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello: por la confianza absoluta en el proyecto, por la dirección, realización y redacción de la tesis. “Gracias Doc.”.

Dra. Georgina Fernández Villagómez por aceptar ser parte del comité, por el apoyo en la realización del presente trabajo, por toda la gran cantidad de apoyo y por las atenciones que ha tenido desde siempre conmigo. Muchas Gracias.

Dra. Alma Chávez Mejía por ser parte del comité, por todos los consejos y orientación que me ha brindado. Muchas Gracias.

Dr. José Antonio Barrera por la paciencia, entrega e interés que ha tenido con el trabajo. Muchas Gracias.

Dra. María Teresa Orta Ledesma por su valiosa revisión y comentarios para mejorar el trabajo. Muchas Gracias.

A g r a d e c i m i e n t o s :

A Dios por todo lo que me ha dado desde siempre

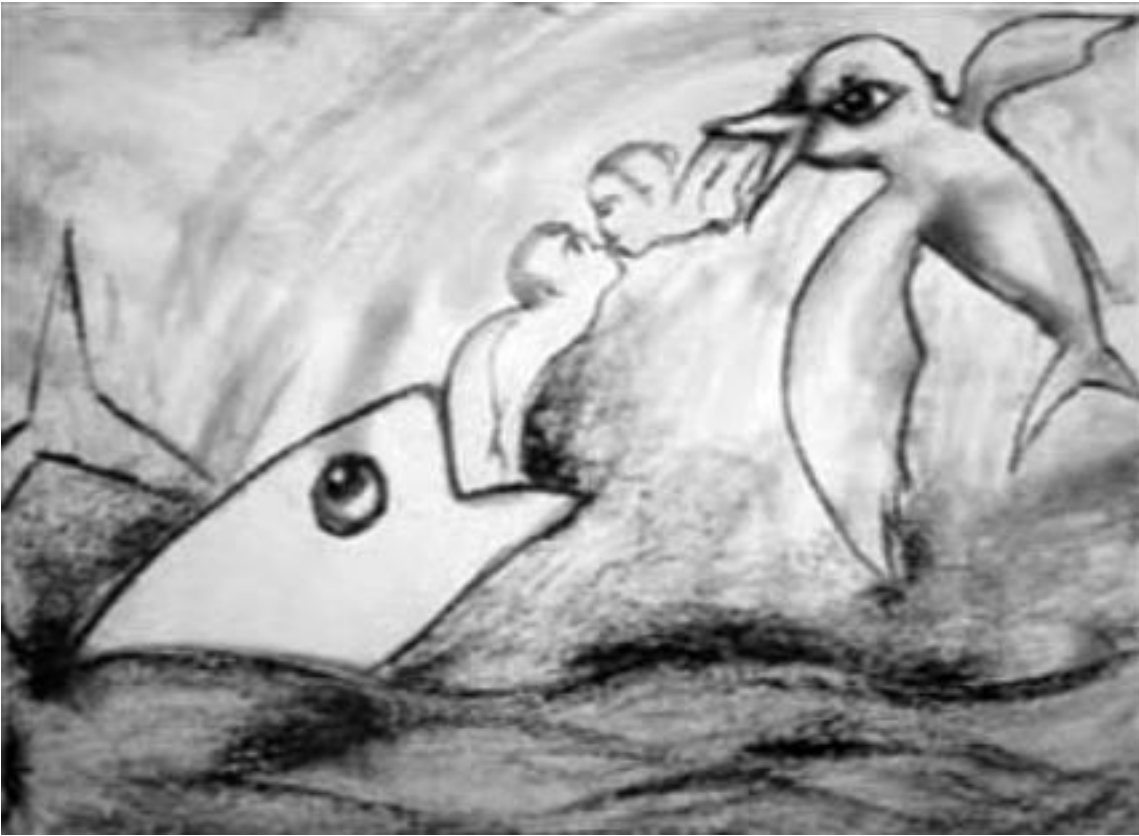
A la UNAM por dejarme ser parte una vez, más no...la última de ellas.

A la Prepa 4. Muchísimas gracias por haberme aceptado, cobijado, guiado e inspirado tanto, tanto, tanto...

A todos y todas las que han formado parte de mí y mi historia. Sin ustedes jamás estaría aquí. Cada uno sabe cómo influyó. Muchas gracias

A los que han permanecido, por uno o muchos instantes conmigo, compartiendo experiencias, así como a l@s que por diversas razones se han tenido que ir. Muchas gracias por todo.

Imagina que tan diferente sería mi mundo, si tan solo una cosa, por mínima que esta fuera...no hubiera ocurrido.



Un día soñé con un ángel, y él me dijo: mi jefe me autorizó a que vuelva tus sueños realidad.

-A lo cual contesté: ¿En verdad? ¿Algún sueño en particular o todos mis sueños?...

Sono sempre i sogni a fare la realtà" è un ossimoro, ma per me non lo è. Credo moltissimo che la realtà sia composta proprio dal nostro modo di vederla, di comporla, e soprattutto... mi piace pensare che sia composta da sogni necessari.

Piensa sólo, lector, lo bueno que ha sido. Me había gustado en otro tiempo, pero otro tiempo no era entonces...

La gente se inventa estadísticas con tal de demostrar algo, el 40% de la gente lo sabe...



D e d i c a t o r i a .

A mi familia:

Mi Mama Sara Elena G. López Sandoval

Salvador López Sandoval

José Luis López Sandoval

**Les doy gracias por todo el apoyo que me han brindado,
por su tiempo, cariño y atención, así como por haberme
dado toda su confianza.**

Todo lo que hago, lo hago siempre pensando en ustedes...

Muchas gracias

A Shutka.

Acrónimos

A_{prom}	= Absorción promedio de agua
ADDE	= Agua destilada, desionizada y esteril
<i>A. lumbricoides</i>	= <i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>T. canis</i>	= <i>Toxocara canis</i>
AM	= Agregado mineral
A_{max}	= Capacidad máxima de saturación de agua
CA	= Con agitación
κ	= Conductividad hidráulica
ρ	= Densidad real
ρ_{ap}	= Densidad aparente
EDRX	= Espectroscopia fluorescencia de difracción de Rayos X
EIOPAI	= Espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo
FRX	= Fluorescencia de Rayos X
Q	= Gasto
HH	= Huevo de helminto
HTC	= Huevo de <i>Toxocara canis</i>
HAL	= Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i>
LMP	= Límite máximo permisible
MEB	= Microscopía electrónica de barrido
MO	= Microscopía óptica
OM	= Operación máxima
OD	= Operación diseño
PP	= Perlas plásticas
PV	= Pérdida de viabilidad
ε	= Porosidad abierta
SA	= Sin agitación
CA	= Sin agitación
TRH	= Tiempo de residencia hidráulica
<i>T. canis</i>	= <i>Toxocara canis</i>



Resumen

La ineficiencia para inactivar organismos de alta resistencia por medio de cloro, ozono y luz UV han llevado a la exploración de alternativas en materia de desinfección, que permitan asegurar su eliminación. El control biológico es fundamental para evitar problemas de salud pública, principalmente en regiones con condiciones precarias, de economías emergentes y de infraestructura escasa. La carga biológica contenida en el agua ha constituido históricamente padecimientos recurrentes asociados directamente con estrategias de control y reúsos no adecuados.

El presente trabajo se enfocó en explorar el efecto de inactivación de la plata, cobre, hierro y dos agregados minerales (AM) extraídos de minas sobre huevos de helminto de *Toxocara canis* y *Ascaris lumbricoides* (como modelos de organismos de alta resistencia), sugiriendo también los mecanismos involucrados en la pérdida de viabilidad (PV) de los mismos. Igualmente, exploró el uso de AM como material de empaque dentro de un sistema experimental para retener e inactivar a los HH; su dimensionamiento, construcción y operación, así como la viabilidad que representa dicha tecnología, empleando para ello: análisis físicos, químicos y biológicos.

En primera instancia de forma independiente se evaluó la capacidad de inactivación que poseen los metales y los agregados sobre los HH por contacto directo a concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹) y tiempo de exposición progresivos (30, 60, 90, 120, 150 y 180 min), empleando dos técnicas (tinción diferencial por exclusión y por larvado *in vitro*). Los compuestos con plata registraron una inactivación de entre 4 y 92%, mientras con hierro registraron 10 y 91% y finalmente con cobre entre un 65 y 94%, resultando con mayor poder de inactivación las especies oxidadas en ambos casos. Por otro lado, los agregados estudiados AM₁ y AM₂ obtuvieron entre 64 y 93% y 73 y 96%, respectivamente. No obstante, la totalidad de los casos referidos anteriormente evidenciaron sensibilidades específicas por especie.

En complemento, una memoria fotográfica conformada por microscopia óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB) sugirió que los mecanismos involucrados en la pérdida de viabilidad (PV) en HH derivada del contacto con agentes con Fe, Cu y Ag se basa en la combinación de eventos de interacción con los constituyentes del huevecillo, tales como proteínas, compuestos lipídicos y material genético, cambios en la capacidad homeostática, eventos oxidativos y de intervención metabólica, que en conjunto intoxican e impiden las condiciones de homeostasis necesarias para fomentar su capacidad de larvado. Por otro lado, en los AM ocurre por estrés químico, derivado del contenido de los agregados con capacidad biocida, tal como lo señalan los ensayos de contacto directo y sin agitación (SA), el cual se lleva a cabo por eventos similares a los presentados con otros metales. No obstante, los ensayos efectuados con agitación (CA) encontraron que también puede ocurrir la inactivación por estrés de tipo mecánico, que se asocia al efecto abrasivo de las estructuras del material pétreo, tal como lo señala la evidencia fotográfica. En conjunto, el análisis de ambos ensayos indica que los agregados pueden ejercer pérdida de viabilidad de manera independiente, así como por la combinación de ambos, derivando también en efectos sinérgicos para ambos AM.

El filtro experimental resultante contó con una profundidad de 200 cm por ½ in de diámetro, con segmentos progresivos de 10 cm para dar seguimiento a las tasas de inactivación y de filtración ofrecidas por cada sección para cada empaque (AM₁ o AM₂). El

sistema se operó de forma continua en dos condiciones: a) operación de diseño (OD): durante 15 días, a un gasto de 1.33 L d^{-1} y un TRH de 120 minutos y b) operación máxima (OM): durante 3 días a un gasto de 60.5 L d^{-1} y un TRH de 1.5 min para el AM_1 y 1.9 min para el AM_2 . En ambos casos se logró la eliminación y retención de todos los HH introducidos, requiriendo 100 cm de lecho efectivo para ello, siendo los primeros para la primera operación y los últimos para la segunda, evidenciando en los organismos fenomenologías de tipo mecánico y químico, similares a los evidenciados en las pruebas de contacto directo.

El uso de AM constituye una tecnología alternativa innovadora contra HH al presentar resultados en bajas concentraciones y tiempos de contacto. Asimismo cumple con algunas de las características económicas, químicas y ambientales y que hace factible su uso, tales como ser de bajo costo, alta durabilidad, fácil obtención, aplicación, manejo, transporte y disponibilidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	15
ÍNDICE DE FIGURAS.....	16
1 INTRODUCCIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
2 ALCANCES Y LIMITACIONES.....	24
3 MARCO DE REFERENCIA.....	26
3.1 Organismos relevantes en la desinfección.....	27
3.1.1 Elección del organismo de prueba.....	28
3.1.2 Estructura de los huevos de helminto.....	28
3.1.3 Helmintiasis y morbilidad en humanos.....	30
3.1.4 Toxocara canis.....	31
3.1.5 Ascaris lumbricoides.....	34
3.2 Desinfección.....	36
3.2.1 Mecanismos de acción de los desinfectantes.....	37
3.2.2 Desinfección convencional de huevos de helminto.....	38
3.2.3 El uso de metales como agentes desinfectantes.....	39
3.2.4 Desinfección no convencional.....	42
3.2.5 Inactivación sinérgica.....	43
3.2.6 Factores fisicoquímicos que deben considerarse en la desinfección.....	43
3.2.7 Desinfectante ideal.....	44
3.2.8 Cinética de la desinfección química.....	45
3.2.9 Modelos de desinfección química.....	47
3.3 Filtración.....	48
3.3.1 Mecanismos que intervienen dentro de la filtración.....	49
3.3.2 Tipos de filtros.....	50
3.3.3 Tipos de empaques.....	51
3.3.4 Cinética de filtración.....	52
3.3.5 Modelos de filtración.....	53
3.3.6 Propuesta para contribución al conocimiento.....	54
4 METODOLOGÍA.....	56
4.1 Primera etapa.....	57
4.1.1 Obtención del medio filtrante.....	57
4.1.2 Obtención del material helmintológico.....	60
4.1.3 Sistema filtrante experimental.....	65
4.2 Segunda etapa.....	70
4.2.1 Ensayos de contacto en matraz con plata, cobre, hierro, AM, SiO ₂ y PP.....	70
4.2.2 Construcción del sistema filtrante.....	73
4.2.3 Ensayos en columnas empacadas (sistema experimental de filtración).....	76

4.2.4	Ensayos de viabilidad de los AM para ser considerado como agente desinfectante	80
5	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	85
5.1	Obtención y caracterización de los AM.....	85
5.1.1	Caracterización física	86
5.1.2	Caracterización fisicoquímica	88
5.1.3	Ensayos de viabilidad de los lotes (HTC y HAL)	95
5.1.4	Caracterización de la inactivación ofrecida por los compuestos metálicos..	118
5.1.5	Ensayos de exposición a cobre	123
5.1.6	Ensayos de exposición a hierro	129
5.1.7	Mecanismos involucrados en la inactivación con AM, Ag, Cu y Fe	138
5.1.8	Mecanismo de pérdida de viabilidad de HTC inducido por AM	156
5.1.9	Caracterización de los parámetros cinéticos.....	160
5.2	Ensayos en columnas empacadas.....	163
5.2.2	Ensayos de filtración en columnas empacadas.....	166
5.2.3	Tiempo de contacto y avance promedio del HTC	171
5.2.4	Relación β	172
5.2.5	Ensayos de inactivación en columnas empacadas	173
5.2.6	Efecto sinérgico	178
5.2.7	Daño morfológico en ensayos de columnas empacadas para AM ₁ y AM ₂ ..	180
5.2.8	Curva de operación.....	181
5.2.9	Tiempo de saturación y agotamiento del sistema experimental	184
5.2.10	Características relevantes de los AM para ser considerados como agentes desinfectantes.....	186
6	CONCLUSIONES.....	198
7	REFERENCIAS	200
8	ANEXO I.....	212
8.1	Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	212
8.2	Ciclo de vida de <i>Ascaris lumbricoides</i>	214
9	ANEXO II	216
9.1	Caracterización física.....	216
9.2	Caracterización fisicoquímica.....	220
10	ANEXO III	222
10.1	Técnicas helmintológicas empleadas.....	222
11	ANEXO IV	223
11.1	Caracterización fisicoquímica de los AM.....	223
12	ANEXO V	231
12.1	Memoria fotográfica de <i>Toxocara canis</i>	231
12.2	Memoria fotográfica de <i>Ascaris lumbricoides</i>	243
13	ANEXO VI.....	255
13.1	Determinaciones cualitativas y cuantitativas del AM.....	255
14	ANEXO VII.....	259
14.1	Ensayos de larvado de HTC y HAL para agentes metálicos	259
15	ANEXO VIII	269
15.1	Memoria de cálculo del filtro.....	269
16	ANEXO IX.....	276
16.1	Tablas y nomogramas	276

17 ANEXO X	294
17.1 Anexo estadístico.....	294

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1 Estructuración general de los huevos de helminto	29
Tabla 3-2 Contenido de huevos de helminto en agua residual y en lodos en diferentes países	36
Tabla 3-3 Eficiencias de la PV en HH reportados para diferentes tratamientos de lodos	39
Tabla 3-4 Factores a considerar dentro de la desinfección.....	44
Tabla 3-5 Características que deseablemente debe poseer un desinfectante para su uso.....	45
Tabla 3-6 Algunos modelos cinéticos empleados en desinfección	48
Tabla 3-7 Clasificación de filtros según algunas características operativas.....	51
Tabla 3-8 Ecuaciones comúnmente empleadas para describir la filtración.....	54
Tabla 4-1. Escala referencia propuesta, que señala el grado de inactivación de huevos de helminto:.....	72
Tabla 5-1. Propiedades físicas de los medios sólidos empleados.	86
Tabla 5-2. Valores de k para diferentes texturas de suelos empleados como medios de empaque en filtración lenta.....	88
Tabla 5-3. Tipos de roca que componen a los AM a partir de Difracción de Fluorescencia por Rayos X.....	89
Tabla 5-4. Tipos de roca que componen a los AM a partir de EDRX.....	90
Tabla 5-5 Elementos que componen a los AM a partir de Difracción de Rayos X.....	91
Tabla 5-6. Cuadro comparativo de cuadrantes de AM ₁ y AM ₂	94
Tabla 5-7. Foto-micrográficas contrastivas de las técnicas de estimación de viabilidad empleadas	96
Tabla 5-8. Efecto de los AM, PP y SiO ₂ sobre HTC.....	105
Tabla 5-9. Efecto de los AM, PP y SiO ₂ sobre HAL.....	106
Tabla 5-10. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos con contenido de Ag, Cu y Fe.....	114
Tabla 5-11. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos con contenido de Ag, Cu y Fe.....	116
Tabla 5-11 Valores del parámetro “k” para los elementos evaluados	161
Tabla 5-12 Tiempos teóricos del inicio de la inactivación de los HH expuestos a agentes con contenido de Ag, Cu y Fe	163
Tabla 5-13. Características de la operación de los filtros operación	165
Tabla 5-14 Condiciones de operación empleadas	172
Tabla 5-15 Caracterización de la curva de operación del sistema experimental.....	183
Tabla 5-16 Caracterización de condiciones de saturación y agotamiento del medio de empaque en OD y OM.....	185
Tabla 5-17 Costo de desinfectantes comúnmente empleados	190
Tabla 5-18 Inactivación de huevos de helminto en condiciones experimentales.....	191
Tabla 5-19. Normatividad mexicana (LMP) por elemento de los AM ₁ y AM ₂ en diversas instancias	196
Tabla 11-1. Prueba de disolución de los AM 1 y 2 a tres horas (ICP-Ms).....	223
Tabla 11-2. Prueba de disolución de los AM 1 y 2 a tres meses (ICP-Ms)	225
Tabla 11-3 Normatividad mexicana aplicable al AM (ensayos en medio ácido a tres horas)	226
Tabla 11-4 Normatividad mexicana AM en medio básico a tres horas.....	228

Tabla 11-5. Memoria del ICP-MS	230
Tabla 16-1 Eficiencia del filtro empacado con AM ₁ en OD para HTC	286
Tabla 16-2 Eficiencia del filtro empacado con AM ₁ en OM para HTC	286
Tabla 16-3 Eficiencia del filtro empacado con AM ₂ en OD para HTC	287
Tabla 16-4 Eficiencia del filtro empacado con AM ₂ en OM para HTC	287

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3-1 Estructuras principales de los Huevos de helminto estudiados observados a MO 40x	30
Figura 3-2 Huevos de <i>T. canis</i> a diferentes microscopías	32
Figura 3-3 Huevo de <i>T. canis</i> visualizado por medio de microscopia	33
Figura 3-4 Hembra grávida de <i>A. lumbricoides</i>	34
Figura 3-5 MO de un huevo larvado de <i>A. lumbricoides</i>	35
Figura 3-6 Huevo de <i>A. lumbricoides</i> visualizado mediante Microscopía óptica	35
Figura 3-7 Curvas de desinfección-sobrevivencia para microorganismos	46
Figura 3-8 Comportamiento de filtración en un lecho empacado ideal	52
Figura 4-1 Esquema general de trabajo	56
Figura 4-2. Acondicionamiento y caracterización de los AM y PP.	58
Figura 4-3 Recuperación de los huevecillos a partir de un espécimen de <i>T. canis</i>	60
Figura 4-4 Metodología de obtención del material helmintológico	61
Figura 4-5 Plano de un filtro desinfectante de huevos de helminto	68
Figura 4-6 Plano del sistema experimental de filtración	69
Figura 4-7. Sistema de suministro	74
Figura 4-8. Sistema de distribución	75
Figura 4-9. Sistema de distribución	75
Figura 5-1. Zona de extracción de los AM	85
Figura 5-2. Medios de empaque	87
Figura 5-3. Distribución elemental según la Prueba de Olmstead-Tukey para el AM ₁	92
Figura 5-4. Distribución elemental según la Prueba de Olmstead. Tukey para el AM ₂	92
Figura 5-5. Ensayos de larvado de HH en diferentes medios de incubación	98
Figura 5-6. HH incubados en condiciones de aireación.	98
Figura 5-7. Efecto de diferentes condiciones sobre la obtención de la larva móvil en <i>T. canis</i>	99
Figura 5-8. Efecto de diferentes condiciones sobre la obtención de la larva móvil en <i>A. lumbricoides</i>	100
Figura 5-9. Efecto de diferentes medios de soporte y condiciones sobre la PV de HTC ...	102
Figura 5-10. Efecto de diferentes medios de soporte y condiciones sobre la PV de HAL	102
Figura 5-11 MEB a HH sometidos a condiciones SA y CA	108
Figura 5-12 Fenomenologías adicionales en HH ocurridas en los ensayos de contacto ...	110
Figura 5-13. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos estimados mediante TDE y LIV	111
Figura 5-14. Capacidad de inactivación ofrecida por los compuestos metálicos estimados mediante TDE y LIV sobre HAL y HTC	117
Figura 5-15. Efecto de plata metálica (Ag ⁰) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB ...	140
Figura 5-16 Mecanismo propuesto para la inactivación con Ag ⁰	140
Figura 5-17. Mecanismo propuesto para la inactivación con Ag ⁺¹	142



Figura 5-18. Efecto de plata +1 (Ag_2O y AgNO_3) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 143

Figura 5-19. Efecto de cobre metálico (Cu^0) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 144

Figura 5-20. Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu^0 145

Figura 5-21. Efecto de cobre metálico (Cu^{+1}) Cu_2O sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 147

Figura 5-22. Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu^{+1} 148

Figura 5-23. Efecto del (Cu^{+2}) CuSO_4 sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 149

Figura 5-24. Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu^{+2} 150

Figura 5-25. Efecto de Fe sobre HAL y HTC mediante MO y MEB..... 152

Figura 5-26. Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^0 152

Figura 5-27. Efecto de FeS_2 sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 153

Figura 5-28. Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^{+2} 154

Figura 5-29. Efecto de Fe_2O_3 (Fe^{+3}) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 155

Figura 5-30. Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^{+3} 156

Figura 5-31. Efecto de los agregados minerales 1 y 2 sin agitación sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 157

Figura 5-32. Efecto de los agregados minerales 1 y 2 con agitación sobre HAL y HTC mediante MO y MEB 158

Figura 5-33. Mecanismo propuesto para la inactivación de HH inducido por agregados minerales..... 160

Figura 5-34. Curvas de operación (longitud vs filtración) de OD y OM para AM_1 y AM_2 166

Figura 5-35. HTC retenidos por los sistemas empacados en OD y OM 168

Figura 5-36. HTC recuperados del medio filtrante..... 169

Figura 5-37. Ecuaciones de ajuste de filtración..... 170

Figura 5-38. Ensayos de inactivación en columnas empacadas para OD y OM..... 174

Figura 5-39. Efecto mecánico y químico en OD 176

Figura 5-40. Efecto mecánico y químico en OM 177

Figura 5-41. Sinergia de inactivación en columnas empacadas 180

Figura 5-42. HH recuperados de ensayos efectuados en el filtro experimenta observados mediante MO (20X) 181

Figura 5-43. Efecto sobre el ADDE al contacto con los AM..... 187

Figura 5-44. Efecto sobre las pruebas con pH extremos al contacto con los AM..... 188

Figura 5-45. Ensayos de germinación en diferentes soportes 193

Figura 5-46. Ensayos interactivos de germinación..... 194

Figura 8-1. Ciclo de vida de *Toxocara canis* 214

Figura 8-2. Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*. 215

Figura 10-1. Parte dorso-ventral-anterior de hembra adulta de *T. canis* (aclarado) visto al Microscopio estereoscópico (3x)..... 222

Figura 12-1. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Ag^0 (MO) 40X y 10X 231

Figura 12-2. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con AgNO_3 (MO) 40X y 10X 232

Figura 12-3. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con plata coloidal Ag^{1+} y Ag^0 (MO) 40X 233

Figura 12-4. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con plata coloidal Ag ₂ O (MO) 40X y 10X	234
Figura 12-5. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con Cu (MO) 40X	235
Figura 12-6. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con CuSO ₄ (MO) 40X y 10X	236
Figura 12-7. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con CuO (MO) 40X	237
Figura 12-8. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con Cu ₂ O (MO) 40X	238
Figura 12-9. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con Fe (MO) 40X	239
Figura 12-10. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con Fe ₂ O ₃ (MO) 40X	240
Figura 12-11. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con FeSO ₄ (MO) 40X	241
Figura 12-12. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>T. canis</i> con FeS ₂ (MO) 40X y 10X	242
Figura 12-13. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Ag por Microscopía Óptica 40X y 10X	243
Figura 12-14. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con plata coloidal por Microscopía Óptica 40X	244
Figura 12-15. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Ag ₂ O por Microscopía Óptica 40X	245
Figura 12-16. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con AgNO ₃ por Microscopía Óptica. 40X	246
Figura 12-17. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Cu por Microscopía Óptica 40X	247
Figura 12-18. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con CuSO ₄ por Microscopía Óptica. 40X	248
Figura 12-19. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Cu ₂ O por MO 40X	249
Figura 12-20. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con CuO por MO 40X	250
Figura 12-21. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Fe por Microscopía Óptica 40X	251
Figura 12-22. Efecto progresivo experimentado en los huevos de <i>A. lumbricoides</i> con Fe ₂ O ₃ por Microscopía Óptica 40X	252
Figura 12-23 Ensayos de medios pétreos en condiciones SA y CA para HAL.....	253
Figura 12-24 Ensayos de medios pétreos en condiciones SA y CA para HTC.....	254
Figura 13-1. Difractograma del AM ₁ (de 1-90°)	255
Figura 13-2. Difractograma perteneciente al AM ₂ (de 1-90°)	256
Figura 13-3 Caracterización del AM1 por medio de AFRX	257
Figura 13-4 Caracterización del AM2 por medio de AFRX	258
Figura 14-1 Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a plata coloidal.	259
Figura 14-2. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Ag ₂ O.....	260
Figura 14-3. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a AgNO ₃	261

Figura 14-4. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe	262
Figura 14-5. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe ₂ S	263
Figura 14-6. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe ₂ O ₃	264
Figura 14-7. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe ₂ SO ₄	265
Figura 14-8. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu	266
Figura 14-9. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu ₂ O	267
Figura 14-10. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu ₂ SO ₄	268
Figura 15-1 Esquema de vista y dimensiones a emplearse en el filtro desinfectante.....	275
Figura 16-1 Perfil de filtrado con respecto a la operación AM ₁ OD	276
Figura 16-2 Perfil de filtrado con respecto a la operación del AM ₂ OD	277
Figura 16-3 Perfil de filtrado con respecto a la operación AM ₁ OM	278
Figura 16-4 Perfil de filtrado con respecto a la operación AM ₂ OM.....	279
Figura 16-5 Curva de operación para AM ₁ en OD	280
Figura 16-6 Curva de operación para AM ₂ en OD	281
Figura 16-7 Curva de operación para AM ₁ en OM	282
Figura 16-8 Curva de operación para AM ₂ en OM	283
Figura 16-9 Nomograma de inactivación de HTC en Operación de Diseño (OD) AM ₁	284
Figura 16-10 Nomograma de inactivación de HTC en Operación Máxima (OM) AM ₂	285
Figura 17-1 Ensayos de interactividad con los medios de soporte.....	295

1 INTRODUCCIÓN

La morbilidad asociada a las helmintiasis constituye un problema de salud pública acentuado en los países con economías emergentes y en situación de pobreza. Dicho padecimiento es responsable de un estimado de tres millones y medio de muertes por año, así como patologías en una tercera parte de la población mundial (Papale et al., 2008; Jiménez, 2007; Mintz et al., 2001). Las condiciones prevalentes de infraestructura, higiene y el establecimiento del reúso de agua con calidad no adecuada constituyen factores que contribuyen de manera determinante a su prevalencia (Maya et al., 2012; Rojas et al., 2004; De Victorica y Galván, 2003).

Los métodos con mayor uso en desinfección de agua residual en plantas de tratamiento son: cloro y el ozono con 80%, seguidos de luz UV con 10% y solar con el 5%. Ellos basan su poder germicida en procesos oxidativos, así como en la desestabilización macromolecular del organismo por penetración. Sin embargo, ninguno de ellos resulta con suficiente poder para inactivar organismos que cuentan con estructuras de alta resistencia, tales como: quistes, oocistos, virus y huevos de helminto (HH), entre otros (Rojas y Orta, 2009; Rojas et al., 2008; Gross y Farrell-Poe, 2004). En Sobsey (2002) se enfatiza particularmente sobre los HH como los organismos de mayor resistencia en una escala de microorganismos de interés sanitario. Los padecimientos que ocasionan requieren de una particular atención, al constituir un problema grave de salud pública en algunas regiones del mundo.

Ello radica en la baja eficiencia de inactivación que presentan los desinfectantes antes mencionados ante los HH y la prevalencia en la población local. Los mismos resultados ineficientes se han observado ante diversos tratamientos de tipo aerobios, anaerobios, térmicos, de pH variable y filtración fina de membrana (Jiménez y Maya, 2007). No obstante que su aplicación dirigida resulta más efectiva, aunque en ocasiones de complicada implementación, debido a las condiciones de infraestructura prevalentes *in situ*, así como los costos asociados. Lo anterior ha derivado en la imposibilidad de asegurar la inocuidad absoluta del efluente tratado de las plantas de tratamiento.

Con el objeto de inactivarlos, agentes químicos "no convencionales" han sido explorados, dentro de los cuales se encuentran: fenoles y derivados aromáticos, alcoholes, aldehídos, ácidos y halógenos, entre otros (Agencia de protección ambiental (EPA), 2010; Alonso et



al., 2004), aunque con resultados similares. Asimismo, una vertiente de reciente exploración se constituye por el uso compuestos con contenido metálico con acción biocida, tales como Zn, Al, Ag, Cu, entre otros, ya sea de manera independiente o en conjunto. Lo anterior, al demostrar que los metales tienen capacidad sinérgica, así como un efecto oligodinámico sobre virus, bacterias y hongos (entre 50–90%) (Miranda et al., 2011; Orta et al., 2008; Ruparelia et al., 2008; Dubas et al., 2006; Panacek et al., 2006). De igual manera, se exploran en combinación con luz UV (Kim et al., 2008), como matrices conformadas (Rivera-Garza et al., 2000), inmersos en materiales cerámicos (Kim et al., 2004) y en silicatos (Kawashita et al., 2003), por solo mencionar algunos. No obstante, la exploración sobre HH ha sido nula.

En este contexto, se buscó explorar el efecto independiente producido por metales, empleando compuestos con contenido de plata, cobre y hierro, así como de agregados minerales (AM) con contenido metálico sobre HH. Asimismo, pretende emplear el material pétreo a manera de lechos filtrantes, para promover la pérdida de viabilidad en un sistema experimental de filtración. Se plantea usar en ambos casos como modelos a los huevecillos de *Ascaris lumbricoides* y *Toxocara canis*, por poseer estructuras de resistencia y por ser microorganismos que no se eliminan en su totalidad por los métodos antes mencionados. De manera adicional, por presentar la mayor prevalencia en agua residual doméstica, así como ser el helminto con mayor zoonosis con el humano, respectivamente (Romero–Núñez et al., 2013; Jiménez y Maya, 2007).

HIPÓTESIS

Alteraciones en los componentes estructurales del huevo de helminto derivados del contacto directo con plata, cobre, hierro y con agregados minerales en medio acuoso ejercen un efecto sobre la viabilidad del huevo de helminto.

Para ello se generaron las siguientes hipótesis particulares para cada especie de helminto estudiado.

Hipótesis para *Ascaris lumbricoides*

H_0 = Compuestos con hierro, plata, cobre y los agregados minerales no tienen influencia sobre la potencial viabilidad del huevo de helminto de *Ascaris lumbricoides* suspendido en agua destilada, desionizada y esterilizada.

H_1 = Compuestos con hierro, plata, cobre y los agregados minerales si tienen influencia sobre la potencial viabilidad del huevo de helminto de *Ascaris lumbricoides* suspendido en agua destilada, desionizada y esterilizada.

Hipótesis para *Toxocara canis*

$H_{0(TC)}$ = Compuestos con hierro, plata, cobre y los agregados minerales no tienen influencia sobre la potencial viabilidad del huevo de helminto de *Toxocara canis* suspendido en agua destilada, desionizada y esterilizada.

$H_{1(TC)}$ = Compuestos con hierro, plata, cobre y los agregados minerales si tienen influencia sobre la potencial viabilidad del huevo de helminto de *Toxocara canis* suspendido en agua destilada, desionizada y esterilizada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la plata, cobre, hierro y agregados minerales sobre los huevos de helminto y su potencial uso en un sistema de filtración, a través sus porcentajes de inactivación y de filtración.

Objetivos particulares

- Seleccionar la técnica de estimación de viabilidad que permita identificar la inactivación de HH derivada del contacto con los agentes metálicos evaluados, entre larvado *in vitro* y tinción diferencial por exclusión mediante
- Caracterizar la acción desinfectante ocurrida en los huevos de helminto derivada del contacto directo con compuestos con contenido de plata, cobre, hierro y dos agregados minerales, mediante los porcentajes incubación por las técnicas *in vitro* y tinción diferencial por exclusión.
- Proponer los mecanismos responsables de la inactivación en huevos de helminto derivados del contacto con compuestos con contenido metálico de plata, cobre, hierro, con base en sus respuestas morfológicas, analizadas con ensayos de incubación *in vitro* y tinción diferencial por exclusión, por microscopía óptica y de barrido.
- Proponer los mecanismos responsables de la inactivación en huevos de helminto derivados del contacto con dos agregados minerales, con base a sus respuestas morfológicas ocurridas en ensayos en matraz y en el sistema experimental, reforzado por su incubación *in vitro* y tinción diferencial por exclusión, por microscopía óptica y de barrido.
- Evaluar el uso de agregados minerales como empaque de un filtro para eliminar los huevos de helminto, mediante su tasa de filtración y de pérdida de viabilidad evaluada por su tasa de incubación *in vitro* y tinción diferencial por exclusión.
- Explorar a los agregados minerales como una alternativa en desinfección en base a algunas propiedades que deseablemente debe poseer un agente empleado para dicho fin.

2 ALCANCES Y LIMITACIONES

El presente trabajo pretende explorar una nueva propuesta en materia de desinfección, al emplear compuestos metálicos para lograrlo, así como el uso de agregados minerales con contenido metálico que combinan la inactivación por efectos mecánicos y químicos, lo cual constituye un estudio sin precedente. Para ello se emplearon como modelo huevos de helminto, que representan a organismos resistentes a otros agentes (cloro, ozono y luz UV). Asimismo, busca proponer los mecanismos involucrados en su pérdida de viabilidad con los agentes explorados. De manera adicional, plantea la idea y evaluación de un “filtro desinfectante” experimental que separe e inactive a los organismos del influente. Finalmente, explora a los agregados minerales como una alternativa tecnológica en desinfección de agua con base en algunas propiedades que posee.

Algunas particularidades a considerar dentro del presente trabajo:

- Se evaluaron y caracterizaron dos agregados minerales provenientes de dos minas de extracción de plata con contenido de cobre, hierro y sílice, ubicadas en Zacatecas, México.
- Los ensayos de inactivación para huevos de helminto se determinaron empleando como modelo biológico dos especies de nemátodos (*Toxocara canis* y *Ascaris lumbricoides*).
- La recuperación de los lotes de huevecillos empleados en los ensayos se efectuó en ambos casos a partir de hembras grávidas adultas obtenidas por purga del hospedero definitivo.
- La capacidad de inactivación ofrecida por los diferentes compuestos evaluados, así como la de los dos agregados minerales se estimó de manera independiente por medio de pruebas de contacto directo sobre ambas especies de HH empleando concentraciones de 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 y 2 g mL⁻¹ de cada agente a 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos como tiempos de contacto.
- La totalidad de los ensayos efectuados se evaluaron en agua destilada, desionizada y esterilizada para estimar solo la interacción de los huevos de helminto con los agentes de prueba.



- Los mecanismos de inactivación se propusieron a partir de los cambios morfológicos sufridos por los organismos como consecuencia de los ensayos efectuados en el presente trabajo, así como con lo ocurrido en otros organismos expuestos a agentes metálicos.
- El sistema experimental se evaluó solo mediante el porcentaje de filtración y el de la pérdida de viabilidad obtenida a partir de dos tipos de operación propuestos..
- El potencial uso que representan los metales y los agregados minerales como alternativa en materia de desinfección se analizó con base en los resultados de inactivación obtenidos en el presente trabajo.
- Se analizó la viabilidad del uso de agregados minerales como alternativa desinfectante considerando algunas características que deseablemente debería presentar un agente para dicho fin.

Aporte científico

- ✓ Generar conocimiento relativo a la inactivación en organismos de alta resistencia.
- ✓ Explorar la desinfección de manera novedosa con la exploración de agentes y formas de interacción con los organismos para lograr dicho fin.
- ✓ Obtener las condiciones de larvado en HH para la técnica de incubación *in vitro*, que ofrecen los mejores resultados
- ✓ Proponer los mecanismos involucrados en la inactivación de huevos de helminto derivados del contacto con agentes con contenido metálicos.
- ✓ Desarrollar el concepto de un “filtro desinfectante”, el cual no existe en la actualidad.
- ✓ Ofrecer una alternativa útil en materia de control de organismos para los países que presentan problemáticas de salud pública, que pueda ser implementada en las condiciones de infraestructura que usualmente prevalecen en dichos sitios.

3 MARCO DE REFERENCIA

El Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA), (2012) señala, que históricamente los asentamientos urbanos se han desarrollado cerca de zonas de abastecimiento de recursos básicos. Sin embargo, la sobreexplotación *in situ* ha derivado en un consumo no sostenible, lo cual, ha llevado a tomar medidas para mantener los aún existentes (ONU, 2012). Lo anterior se fundamenta en el manejo responsable e integral de los recursos, disminuyendo con ello una sobreexplotación del sitio. Ello, centra la problemática en su tipo de uso, tratamiento o disposición final del recurso.

En el caso particular del agua, se han implementado procedimientos, así como lugares especializados capaces de manejar su contenido químico y biológico, así como el volumen generado. Sin embargo, limitaciones tecnológicas, económicas y de espacios determinan la calidad prevalente del efluente, que en ocasiones no es la recomendada y/o la adecuada para su reúso o disposición. Con ello, la necesidad de explorar técnicas efectivas, viables y adecuadas a cada sitio para alcanzar dicha meta.

Un ejemplo de mal uso corresponde al factor de carga biológica, el cual ha protagonizado repetitivamente eventos trágicos a lo largo de la historia, tal como el sucedido en Inglaterra en 1854, que derivó en muertes masivas por consumo de agua contaminada con organismos patógenos. No obstante, en la actualidad se han caracterizado más de 20 padecimientos asociados con la carga biológica del agua. Los estudios evidenciados John Snow sentaron las bases del estudio formal de la ingeniería sanitaria y permitió un avance fundamental en el estudio de la desinfección misma, así como de la ingeniería ambiental, dejando con ello el empirismo que prevalecía hasta entonces.

Lo anterior impulsó la exploración de agentes que promovían la eliminación de organismos, así como el modelo de infraestructura relativo a tratamiento, y que prevalece hasta nuestros días, ha complicado el control del contenido. Desde entonces se ha mencionado, que la efectividad dependía directamente de la limitación del desinfectante mismo, de la reactividad con el medio donde son aplicados, del mecanismo de acción que emplean e inclusive de las características de los organismos objetivos (Metcalf, 1996). Por ello, la construcción del concepto de calidad microbiológica se modificó hacia la búsqueda

de una relación adecuada entre calidad de agua y sanidad (concepto que se tiene en la actualidad).

3.1 Organismos relevantes en la desinfección

En la actualidad, la calidad del agua limita su uso, por ello puede enfocarse en retirar elementos específicos, lo que conlleva a contener en mayor o menor cantidad de virus, bacterias, protozoarios, huevos de helminto y hongos, particularmente la no destinada para contacto humano. La patogenicidad constituye el criterio para considerar a un organismo como “de cuidado”. Sin embargo, su biología, su baja capacidad infectiva, morbilidad de la mayoría de ellos y costo de detección asociado, hacen que no sean monitoreados. Por ello, se deberían considerar factores biológicos, ambientales, ecológicos e inclusive, de usos y costumbres para el establecimiento de la normatividad en la materia, conllevando inclusive a una normatividad local.

Lo anterior se ejemplifica en la NOM-003-SEMARNAT-1997, la cual solo considera como “contaminantes patógenos y parasitarios” a organismos coliformes (totales y fecales) y huevos de helminto. Sin embargo, otros que eventualmente pueden ser patógenos y no formar parte de dicho grupo, son: virus de la hepatitis, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli*, por mencionar algunos, los cuales no se contienen en ella. De igual manera, la existencia de algunos otros asociados a mascotas, tales como *Cryptosporidium* sp., *Toxocara canis*, y *Toxocara cati*, entre otros, tampoco lo son.

Ciertamente, la mayoría no constituyen problema para los desinfectantes actuales, ni para la población humana en general, aunque sí lo es para la denominada “población sensible”, correspondiente a niños y adultos (mayores a 60 años), así como individuos con el sistema inmunológico comprometido. No obstante, los métodos de desinfección comúnmente empleados (cloro, ozono y luz UV) no son eficientes contra organismos que poseen estructuras que permiten condiciones de baja permeabilidad e intercambio con el medio, así como resistencia mecánica, tales como en quistes, esporas y huevos de helminto, por mencionar algunos.

De hecho Sobsey (2002), refiere una escala para microorganismos en agua residual doméstica, dentro de los cuales ubica a los huevos de helminto como los más resistentes ante procesos de tratamiento de remoción o eliminación comúnmente empleados en ingeniería ambiental, seguidos de quistes y oocistos de protozoarios > bacterias ácido-

alcohol resistentes (*Mycobacteria* sp., *Corynebacterium* sp. y *Nocardia* sp.)>Virus entéricos>bacterias enteropatógenas. De hecho en Aquino, (2007), se registran más de 20 padecimientos relacionados de manera directa o indirecta con el agua tratada que impactan en términos de morbilidad y mortandad humana, donde todos los grupos antes mencionados se encuentran representados, para los cuales no existe normatividad. Ello manifiesta la importancia de una desinfección efectiva en matrices ambientales.

3.1.1 Elección del organismo de prueba

- Se emplearon como organismos representativos de helmintos a los nemátodos *A. lumbricoides* y *T. canis* debido a tener mayor dispersión, prevalencia a nivel mundial dentro del agua residual, así como a la asociación del organismo a padecimientos parasitarios en asentamientos humanos (De la Fé et al., 2007; Jiménez y Maya, 2007; Rojas et al., 2004).
- La propuesta de emplear *T. canis*, obedece a que dicha especie presenta una mayor cantidad de capas (cinco) (Aycicek et al., 2001), en comparación con *A. lumbricoides* que presenta cuatro (Jiménez, 2007; Quiles et al., 2006).
- Dentro de los sistemas filtrantes se empleó *T. canis* como organismo de prueba, ya que presenta una menor capacidad infectiva por manipulación y por contacto accidental que presenta. Asimismo, ya que suele ser una infección tratable fácilmente con antihelmínticos.

3.1.2 Estructura de los huevos de helminto

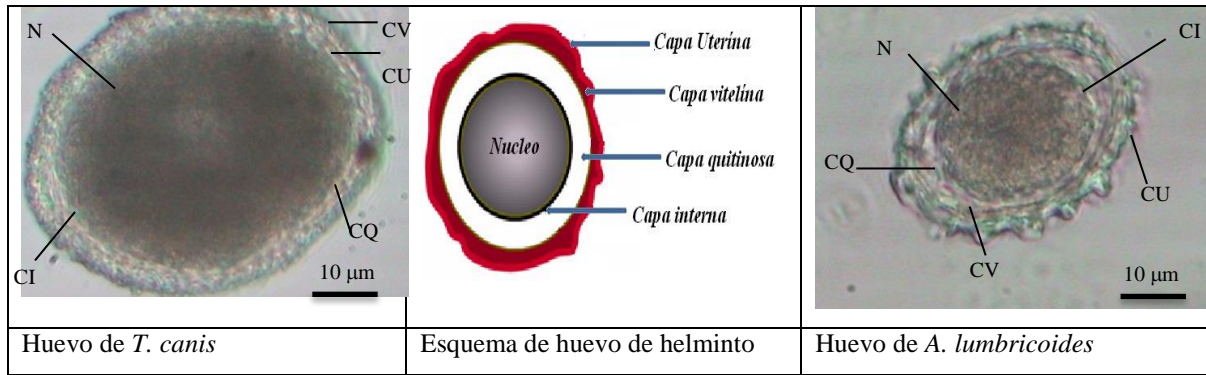
En Jiménez, (2007) se señala, que éstos son altamente resistentes por contar varias capas (de tres a cinco) que funcionan como protección ante el estrés ambiental y químico, aunque cada capa se encuentra estructurada de manera diferente, ya que cumple una función específica, tal como se detalla en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1 Estructuración general de los huevos de helminto

Capa	Composición	Función
Lipídica-Proteica (interna)	Lípidos (75%)(En ascaridos; 3,6 dideoxi-L-arabinohexosa, vinculada a una larga cadena de OH, manoles y dioles) Proteínas (25%)	Permeabilidad y protección al embrión
Quitinosa	Quitina (N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces β en una matriz polimérica) Proteínas	Estructura de resistencia
Vitelina	Lipoproteínas	Adhesión, rigidez y resistencia mecánica
Uterina (externa)	Mucopolisacáridos Proteínas Lípidos	Adhesión e intercambio gaseoso

Tomado de Quiles et al., (2006)

Su conformación general, se constituye de una cubierta externa de naturaleza lipoprotéica y de forma irregular (Aycicek et al., 2001), la cual cumple las funciones de adhesión, irritabilidad, barrera física y química, así como osmoregulación iónica, gaseosa y nutricional. Posteriormente, posee una de tipo vitelina que le confiere protección contra desecación, acidez extrema, agentes oxidantes, detergentes, entre otros. Como última, se ubica una capa quitinosa con grosor variable responsable de la resistencia mecánica. (Tay, 1993). Al centro de éstas existe una capa lipídica (líquida) que se encarga de confinar y separar las capas del el núcleo, el cual se ubica en el centro, que se encuentra compuesta de ácido nucleico, que da origen al embrión, tal como se menciona en la Figura 3-1. Es importante señalar, que aunque algunas especies no presentan la capa uterina, ni vitelina, presentan resistencia a estrés ambiental y químico. Lo anterior es solucionado por los huevecillos mediante el aumento de grosor en sus capas existentes (Tay, 1993).



Imágenes de elaboración propia

N=Núcleo; CU=Capa Uterina; CV=Capa Vitelina; CQ=Capa Quitinosa; CI=Capa Interna
Figura 3-1 Estructuras principales de los Huevos de helminto estudiados observados a MO 40x

Dicho estadio limita la permeabilidad solo a funciones homeostáticas. Sin embargo, el requerimiento de un mayor espacio incrementa su interacción con el exterior (Buendía, 2001), lo cual resulta relevante para el presente trabajo.

3.1.3 *Helmintiasis y morbilidad en humanos*

Las helmintiasis se consideraron como un problema especial importancia dentro de los países con economías emergentes a partir de la década de los 70s (Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009). Con dicho nombre se definió a la infestación por uno o más organismos de tipo gusanoide (helminto) desarrollados en un hospedero particular. Los nemátodos, céstodos y tremátodos fueron los grupos incluidos dentro de dicha clasificación, al ser principalmente los responsables del padecimiento (Organización de las Naciones Unidas para la Ciencia, la Educación y la Cultura (UNESCO), 2009).

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y la Secretaría de Salud de México, puntualizan sobre su ocurrencia en la denominada población sensible (niños, personas mayores y en la población con sistema inmunológico disminuido). También a las condiciones de pobreza, carencia de servicios y limitada sanidad, que en conjunto fomentan índices de prevalencia superiores al 90% (WHO, 2009; Jiménez, 2007; Bratton y Nesse, 1993). A pesar de ello, la patogenicidad no necesariamente se encuentra ligada a estos factores, sino que también ha sido relacionada con hábitos, costumbres, higiene y factores socioeconómicos (Vásquez-Garibay et al., 2002). Lo anterior sugiere que la combinación de ellos influye en su morbilidad.



A nivel mundial, se estima que cinco millones de personas lo presentan a niveles extremos (hiperhelminthiasis e hiperparasitosis), mientras que entre 800 y 1100 millones lo hacen de forma moderada (con sintomatologías típicas) (WHO, 2009; Jiménez, 2007; Vásquez et al., 2002). De hecho, el 80% restante de la población lo padece a un nivel menor (sin patología), ya que las condiciones de sanidad, así como los usos y costumbres relacionados con el agua propician que inclusive con la respiración sea suficiente para adquirir al huevecillo. Algunas de las especies prevalentes dentro del agua residual son *Taenia solium*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Necator americanus*, *Onchocerca volvulus*, *Schistosoma* sp. y *Trichuris trichiura* (Jiménez, 2007; Warren, 1990).

Sin embargo, la sintomatología mostrada por cada especie es diferente y frecuentemente se confunde con otros padecimientos, al presentar cuadros clínicos comunes. Algunas de las manifestaciones típicas son: hemorragias, coagulación deficiente, reacciones alérgicas a medicamentos, comida o ambiente, fiebre, urticaria, asma, dolor abdominal, meteorismo, náusea vómito, diarrea y cuadros de anemia. A pesar de que la mortalidad es baja, sus consecuencias disminuyen la calidad de vida del hospedero.

3.1.4 *Toxocara canis*

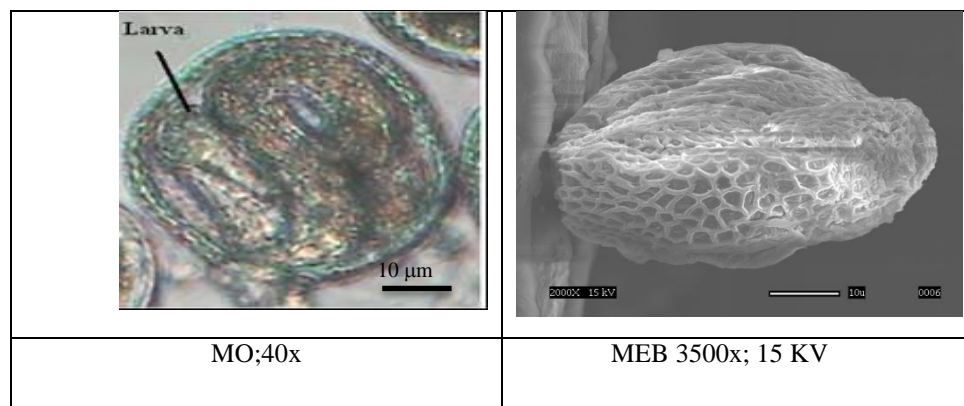
Es un nemátodo perteneciente a la familia Ascaridae, del género *Toxocara* (Anderson et al., 1979; Brusca, 2002). A nivel mundial se encuentran reportadas 24 especies (De la Fé et al., 2007). Su variabilidad tiene como base la morfología de los labios, la forma de las aletas cervicales, la longitud de las espículas y algunas características del aparato reproductor femenino, así como el hospedero definitivo (Nestor et al., 2000; Duménigo y Lao, 1994). En particular para *T. canis* suelen ser canidos, aunque existen registros en humanos, felinos, conejos, murciélagos y búfalos, como paraténicos o accidentales. Un factor importante para la dispersión del género, se relaciona con la capacidad infectiva del helminto y su ciclo de vida particular. No obstante, ambos favorecen la infestación por las costumbres y prácticas particulares del humano. En De la Fé et al., (2007), se menciona, que existen tres especies ampliamente distribuidas, tales como *T. canis*, *T. cati* y *T. vitulorum*, que suelen infestar a canidos, felinos y caprinitos; que ocasionan la mayoría de las infecciones a nivel mundial. Así mismo, existen reportes de prevalencia en humanos, de entre 3% a 46% en diferentes países latinoamericanos. En complemento, estudios realizados a nivel mundial por el

Institute for International Cooperation in Animal Biologics en 2008, donde se analizaron muestras de suelo en parques públicos, resultaron en incidencias de *Toxocara* spp., hasta en el 88% de los parques públicos estudiados, constituyendo así uno de los padecimientos parasitarios zoonóticos con mayor frecuencia.

Lo anterior se explica, ya que el perro (hospedero definitivo) es un componente importante dentro de la sociedad humana, al igual que ocurre con otras especies, ya sea de compañía o para explotación, tal como se especifica en la Figura 8-1, contenida en el ANEXO I. En particular, estos se emplean en medios rurales para labores de seguridad y trabajo de pastoreo, en tanto que, en el ambiente urbano se encuentra como animal de compañía. Por otro lado, la combinación de una estrecha convivencia, una población canina en franco incremento, las formas de crianza y normas de higiene deficientes (referidas al manejo de las excretas), constituyen por sí mismas un mecanismo altamente efectivo de supervivencia y diseminación para el helminto (Reyna et al., 2007).

3.1.4.1 Larvas

Miden aproximadamente 0.3 a 0.4 mm de longitud y 0.1 a 0.3 mm de diámetro (De la Fé et al., 2007). El desarrollo del gusano expande las cubiertas, ocasionando la pérdida de sfericidad (Figura 3-2) asemejando una estructura cilíndrica cuando ésta llega a algún estado larvario (L₁, L₂ o L₃).



MO= Microscopía óptica; MEB= Microscopía electrónica de barrido
Imágenes de elaboración propia

Figura 3-2 Huevos de *T. canis* a diferentes microscopías

3.1.4.2 Huevos

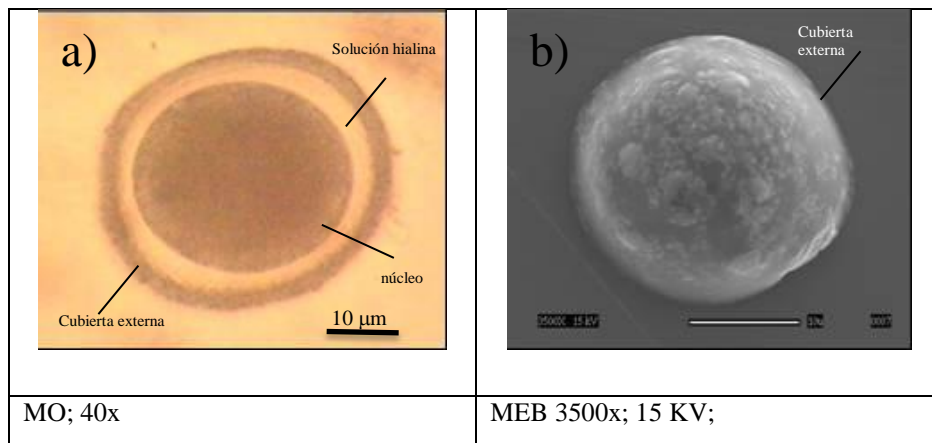
De acuerdo con De la Fé et al. (2007), los huevos poseen forma esférica, son de color pardo oscuro o grisáceo, con una circunferencia de 40 a 90 µm de diámetro y cuatro capas. La

primera ubicada en el núcleo, la siguiente interna de naturaleza lipídica, seguida de una quitinosa (triple) y finalmente una exterior de tipo proteica; principalmente compuesta por albúmina. Al exterior se observa un entramado con depresiones denominadas “fosetas”.

Sin embargo Aycicec et al. (2001) señala, que las tres estructuras realmente se pueden dividir en cinco. Adicionalmente, señala la existencia de una pequeña capa vitelina, modificando la conformación como sigue:

- a) Una zona lamelar formada por la superposición de cuatro o cinco capas fibrosas 0.60 μm en promedio de espesor.
- b) Una capa granular electro-densa con un ancho promedio de 0.35 μm , exteriormente es regular, pero en su parte interior se observa dentada.
- c) Una pequeña capa vitelina la cual sigue el contorno de las crestas y las depresiones de la capa subyacente.
- d) Una membrana delgada; ocasionalmente con “fosetas” de hasta 0.5 μm . En De la Fé et al., (2007) se concluye, que el huevo de *T. canis* sí posee una cubierta vitelina y también una adicional que le proporciona una alta protección en contra del estrés ambiental. Lo anterior se relaciona directamente con la exposición en condiciones adversas y el aumento de la viabilidad evaluada en condiciones silvestres, que oscila de entre cuatro y diez años.

La Figura 3-3 muestra foto-micrográficas de un huevo “tipo” observado en a) microscopía electrónica de barrido (MEB) y b) microscopía óptica (MO). En él se evidencian: el núcleo, las cubiertas homogéneas tonificadas y definidas, así como su forma característica (esférica y lisa).



MO= Microscopía óptica; MEB= Microscopía electrónica de barrido
 Imágenes de elaboración propia

Figura 3-3 Huevo de *T. canis* visualizado por medio de microscopia

3.1.5 *Ascaris lumbricoides*

Es un nemátodo perteneciente a la familia Ascaridae, del género *Ascaris* (Anderson et al., 1979 y Brusca, 2002). su diseminación y su ciclo de vida se encuentran íntimamente ligados al ser humano (Figura 8-2). El adulto posee una coloración blanca-marfil o con tintes rosados, con anillación cuticular. Las especies más estudiadas son *A. lumbricoides* y *A. suum*, por ser hospederos de humanos y cerdos, respectivamente.

Los adultos Figura 3-4 se caracterizan por tener los labios desarrollados con el extremo cefálico, poseen esófago claviforme simple o seguido por un ventrículo sencillo y carecen de alas cefálicas. Existe dimorfismo sexual, donde las hembras miden entre 20-40 cm de longitud por 4-6 mm de diámetro, mientras que los machos son aproximadamente de 15-30 cm x 2-4 mm. Se distinguen por su ápice ligeramente atenuado y romo. La vulva se sitúa ventralmente en una banda anular constreñida, la cintura genital se ubica en el primer tercio de su cuerpo y los sacos uterinos suelen tener hasta 30 millones de huevos.



A. lumbricoides extraída de un paciente con hiperparasitosis con la aplicación de un vermífugo.

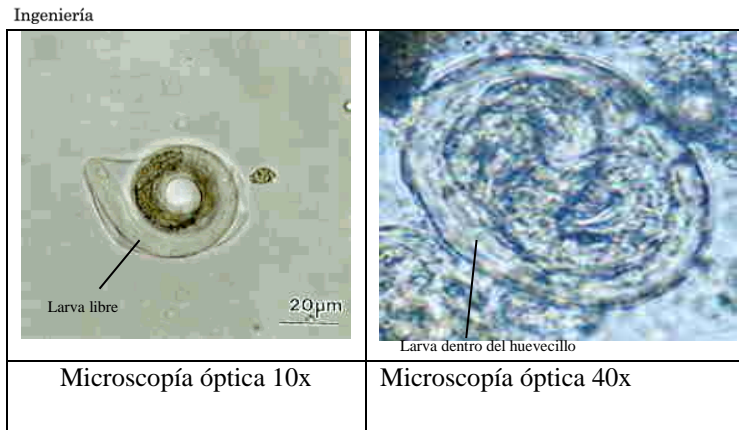
Imagen de elaboración propia

Figura 3-4 Hembra grávida de *A. lumbricoides*

3.1.5.1 Larvas

Las larvas presentan distintos orgánulos, tales como aparato bucal, esófago, anillo nervioso, glándulas esofágicas, células excretoras, intestino y primordio genital.

Las alas laterales son muy pequeñas y se extienden unos 15 mm en los extremos anterior y posterior. La cutícula carece de estriaciones, los núcleos ganglionares ocupan toda la cavidad corporal ocultando la mayor parte del esófago, excepto la porción terminal. El intestino carece de lumen y se estructura en siete células poseedoras de gránulos retráctiles. El núcleo de la célula excretora es una estructura oval de unos 6 mm de longitud y pueden observarse pequeñas columnas secretoras (Sánchez, 2002) (Figura 3-5).



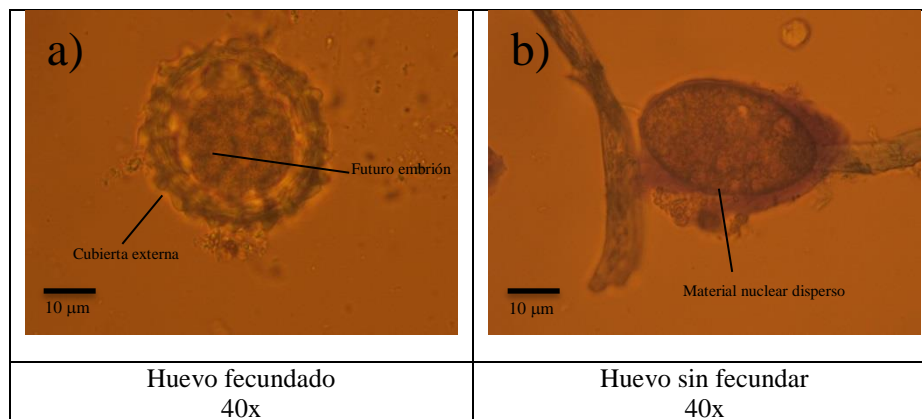
Tomado de (Sánchez, 2002)

Figura 3-5 MO de un huevo larvado de *A. lumbricoides*

3.1.5.2 Huevos

Los huevos fecundados presentan forma ovalada, suelen ser de color pardo obscuro o de tonalidad grisácea (De la Fé et al. 2007), con cápsula gruesa y transparente (Figura 3-6). Se encuentran formados por tres capas, la interna vitelina es lipóide, la media derivada del glucógeno y la externa se encuentra conformada principalmente por albumina con depresiones sobre la superficie llamadas “mamelones” (Figura 3-6(a)).

El interior presenta una masa amorfa de citoplasma. Su tamaño es de entre 40 a 80 µm de largo por 25-50 µm de ancho. Por otro lado, los huevecillos no fecundados, son depositados por las hembras que no se aparearon, ellos son más largos y estrechos. No poseen membrana vitelina, la cubierta es delgada y carecen de mamelones (Figura 3-6 (b)) y poseen tamaño 40-70 µm longitudinalmente y 30-40 µm transversalmente (Tay, 1993).



Imágenes de elaboración propia

Figura 3-6 Huevo de *A. lumbricoides* visualizado mediante Microscopía óptica

3.2 Desinfección

La normatividad mexicana la define dentro de la NOM-127-SSA1-1994 como: “la destrucción de organismos patógenos por medio de la aplicación de productos químicos o procesos físicos”. Sin embargo, dentro de las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) se considera como la eliminación de los organismos presentes (sean o no patógenos). Lo anterior con el propósito de proteger la calidad del agua y posibilitar sus usos posteriores basados en el concepto del Límite máximo permisible (LMP), el cual busca una relación entre calidad y sanidad. No obstante, la medición solo se encuentra dirigida hacia organismos coliformes.

A pesar de ello, no todos los métodos comúnmente empleados actúan sobre los organismos patógenos, particularmente en el caso de los HH, para los cuales han resultado con baja efectividad. En Jiménez (2007) se señala, que en agua residual su contenido en México va de 1 a 98 HH L⁻¹ en áreas rurales. Sin embargo, la misma autora refiere hasta 3000 HH L⁻¹ (Figura 3-2) en algunos otros sitios, siendo los países emergentes los que presentan los niveles más altos.

Tabla 3-2 Contenido de huevos de helminto en agua residual y en lodos en diferentes países

País/región	Agua residual HH L ⁻¹	Lodos HH L ⁻¹ de sólidos totales
Países emergentes	70-3000	70-735
México	6-98	73-177
Brasil	166-202	75
Egipto	*	67-735
Ghana	*	76
Marruecos	214-840	*
Jordania	300	*
Ucrania	60	*
Estados Unidos	1-8	2-13
Francia	9-10	5-7
Alemania	≤40	<1
Reino Unido	*	<6
Pakistán	≈710	*

(*)= No señalado; HH=Huevos de Helminto Tomado de Jiménez (2007)

Por su parte, la NOM-001-SEMARNAT-1996 para las descargas en aguas y bienes nacionales, señala que al ser vertidas al suelo (uso agrícola) permite ≤1 HH L⁻¹ para riego no restringido y ≤5 HH L⁻¹ en el caso de restringido. Por su parte la NOM-003-SEMARNAT-1997 establece como LMP ≤1 HH L⁻¹ para reúso en servicios públicos con

contacto directo y $\leq 5 \text{ HH L}^{-1}$ para servicios al público con contacto indirecto u ocasional. Cabe destacar que solo un huevo viable para inducir una parasitosis, lo cual pone de manifiesto la necesidad de asegurar su inocuidad.

3.2.1 Mecanismos de acción de los desinfectantes

El ozono, cloro y la luz UV basan su poder de acción en la capacidad de oxidación, que suele ser mayor a la del oxígeno, así como en la desestabilización macromolecular que puede inducir sobre los organismos.

Sin embargo, la selección del agente desinfectante obedece a factores tales como: el tamaño del organismo, calidad del caudal a tratar, ubicación, costos, tipo de operación, disponibilidad del agente, dimensión del proceso, eficiencia del tratamiento previo, por mencionar algunos (Metcalf, 1996). El Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), (2010) se recopila los mecanismos de acción que explican el fenómeno de desinfección. A continuación se detalla cada una de ellos:

a) Daño a la pared celular

Se presenta mediante la interacción entre el agente desinfectante y algún compuesto objetivo. Lo anterior provoca una alteración (física, química o metabólica) que altera vías de homeóstasis del organismo.

b) Alteración de la permeabilidad

Ocurre por la alteración de la membrana. Las principales afecciones son: la permeabilidad selectiva y la alteración de la homeóstasis. Dichos trastornos impactan en los mecanismos osmoregulación, liberando compuestos esenciales y derivando eventualmente en la ruptura por presión osmótica.

c) Alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma

El calor, ambientes estresantes, la presencia de sales y el pH (ácidos o básicos) afectan irreversiblemente al protoplasma, al desnaturalizar, coagular o inhibir a las proteínas y a los ácidos nucleicos. Dichas modificaciones impactan en las estructuras encargadas de la regulación (vacuolas, plástidos), así como en las sustancias ergásticas (sustancias de deshecho o almacenamiento)

d) Inhibición de la actividad enzimática

Los agentes desinfectantes pueden alterar la estructura química de las enzimas, dando lugar a una inactivación que puede ser explicada por el modelo de encaje inducido. Ellos pueden

describirse como ataques en las estructuras de protección, intervención a las vías metabólicas, así como en la síntesis y desempeño macromolecular.

3.2.1.1 Mecanismo de acción en la pérdida de viabilidad en helmintos

Las explicaciones particulares sobre los mecanismos de acción relacionados con metales resultan escasas o nulas para HH. De hecho, la única existente corresponde al uso de plata se encuentra en Orta et al., (2008). En ella se menciona, que los iones del agente atacan a los radicales de la superficie de la cubierta del organismo, dañando la respiración celular mediante el bloqueo de la transferencia electrónica y con ello el impedimento del intercambio de energía metabólica. No obstante, se desconocen los mecanismos para otros metales.

3.2.2 Desinfección convencional de huevos de helminto

Los agentes desinfectantes usualmente empleados para tratar agua residual consisten en la aplicación de cloro, ozono o luz UV. Sin embargo, desde las publicaciones de Northington et al., (1970) y Mujeriego, (1998), refieren la resistencia de algunos organismos ante ellos. Lo anterior se debe a las múltiples cubiertas que poseen y que le atribuyen alto soporte a esfuerzos mecánicos, así como al bajo intercambio con el medio, donde la combinación de ambas dificulta la penetración. Sin embargo, en Ayala, (2007) se reporta, que el ozono es efectivo contra helmintos, bacterias y amibas al eliminarlos hasta en un 80%. No obstante, también señala que el mecanismo de interacción no es claro. Por otro lado, Litter et al., (2005) reporta que la luz UV obtiene una efectividad promedio de 45% contra los mismos organismos, siempre y cuando exista una calidad adecuada en el proceso previo a su aplicación. Por su parte, Laurent, (2005) y Sobsey, (2002) señalan que, la radiación solar es efectiva para algunas especies (hasta en un 85%), siempre y cuando se alcancen temperaturas cercanas o superiores a 50 °C.

En Jiménez y Maya, (2007) y Rojas et al., (2008) se señala, que la sedimentación, la filtración, digestión, radiación, composteo (post-tratamientos en lodos) han sido empleados para removerlos, aunque con amplia dispersión de efectividad (30-80%). No obstante, los autores mencionan lograr hasta el 99% de efectividad, aunque bajo condiciones particulares, orientadas específicamente a eliminar a dichos organismos. Sin embargo, Aguilar *et al.*, (2006), enfatiza en los altos insumos relacionados a la aplicación de dichas

condiciones y lo difícil que resulta costearlas; en comparación con las condiciones estándar aplicadas. Por ello, la mayoría de los procesos se enfocan en la remoción y no en atentar contra la posterior viabilidad del organismo. Los trabajos de desinfección reportados en literatura especializada emplean en todos los casos como modelo a *A. lumbricoides* y *A. suum*, desconociendo los comportamientos para otras especies. En la Tabla 3-3 se señalan los procesos comúnmente empleados, así como los porcentajes de las eficiencias promedio obtenidas en cada uno de ellos. Lo anterior manifiesta la necesidad de explorar alternativas que permitan asegurar su inocuidad de una manera económica en comparación con otros métodos comúnmente empleados.

Tabla 3-3 Eficiencias de la PV en HH reportados para diferentes tratamientos de lodos

Proceso	Condiciones	Eficiencia (%)
Digestión mesofílica	15-60 d y 35-55 °C	30
Composteo	70° C	80
Digestión aeróbica termofílica	30 d y 4.5±3.2 °C	78
Tratamiento térmicos	46-48 °C	90-93
Radiación	750 Gy	100
Post-estabilización con cal	Partiendo de 8 h L ⁻¹	100
Estabilización con cal	Con cal apagada calentada a 50 °C durante 48 min con un contenido inicial de 70 <i>Ascaris</i> sp/g ST	100
Post –estabilización rápida con cal	A un pH de 12 por 12 horas, usando cal 20-40% (w/w)	65-92
Digestión aerobia termofílica (48 °C)	Con HH de alrededor de 80 h g ⁻¹ ST	75-78
Irradiación a 1000 Gy	Con contenido inicial de 80 h g ⁻¹ ST	100
Pasteurización	A 70° C con un valor inicial de 8 h g ⁻¹ ST	100
Tratamiento con ácido peracético	Con contenido inicial de 100 h g ⁻¹ ST	95
Co-composteo	Con contenido inicial de 22-83 h g ⁻¹ ST (huevos con 20% de viabilidad)	70-100

ST= Sólidos totales (Tomado de Jiménez y Maya, (2007))

3.2.3 El uso de metales como agentes desinfectantes

El Centro Panamericano de protección e Ingeniería Sanitaria (CEPIS), (2008) se menciona, que el uso de diversos metales y aleaciones se utilizaron de manera común por civilizaciones antiguas como persas, griegas, romanas, chinas y aztecas en utensilios contenedores y de manipulación. Su empleo era principalmente para transportar agua, líquidos frescos y alimentos en conserva. La frecuencia de dicha costumbre permitió notar



que los contenidos permanecían “frescos” por mayor tiempo. De ahí, creencias, supersticiones y recetas “místicas” fueron derivadas, como: “El agua debía ser expuesta a la luz del sol por dos días sin nubes”, “el agua debe ser pasada por carbón siete veces”, “el agua debe ser hervida con la inmersión de un trozo de cobre o plata bendita”, entre otras.

El avance del conocimiento microbiológico permitió conocer a los organismos causantes de la mayoría de los padecimientos de la época y terminar con las creencias asociadas a dichas costumbres. La búsqueda de alternativas para eliminarlos fue un tema recurrente entre los investigadores. El Botánico suizo Karl Wilhelm von Nägeli durante el siglo XIX exploró y explicó someramente los efectos letales del Ag, Al, Au, Bi, Cu, Fe, Hg, Zn y algunos otros metales sobre bacterias, algas, esporas, hongos y virus. Dicho investigador introdujo lo que al paso del tiempo sería denominado como “*oligodinamia*” (actividad biocida a bajas concentraciones), propiedad usual en los metales, que de hecho retoma el presente trabajo. Davies y Etris, (1997) sugieren, que la acción desinfectante del metal se debe principalmente a la liberación de iones y su interacción a nivel proteico, enzimático y genético dentro de los organismos (Lee et al., 2013; CDC, 2012; Rodríguez, 2008).

3.2.3.1 *Inactivación por plata*

Se presenta de manera estable como Ag^0 y Ag^{+1} , es altamente electronegativo, lo cual favorece a la interacción con la superficie del organismo. La Ag^{+1} reacciona en particular con los grupos amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$) y sulfhidrilo ($-\text{SH}$), siendo potenciada por su acumulación, alcanzando un mayor poder oxidante al combinarse con oxígeno. Esta interacción modifica los mecanismos de transporte de membrana y promueve la formación de compuestos complejos con la plata e inactiva enzimas superficiales que interfieren con la respiración del organismo. De hecho en Orta et al., (2008) se menciona, que los iones plata actúan como venenos protoplasmáticos que al unirse con las proteínas forman enlaces R-S-S-R, que interrumpen la transferencia de electrones, ya que el enlace S-Ag es estable. Dicha interacción afecta al metabolismo en la asimilación de nutrientes y provoca envenenamiento enzimático. Su inhibición promueve el flujo de iones (fosfato, por ejemplo), causando anormalidad en el tamaño celular, alteraciones en el contenido citoplasmático, membrana celular y en las capas externas. En combinación provocan la muerte celular y eventualmente una citólisis. (Miranda et al., 2011; Chaloupka, 2010; Aguilar et al., 2006; Davies y Etris, 1997). En particular en los HH, los iones de plata



forman complejos insolubles con el ADN y el ARN, ligándose a sitios, tales como la metionina que indica el inicio de la transcripción. Dicho enlace inhabilita al material genético para replicarse (Aguilar et al., 2006).

3.2.3.2 *Inactivación por cobre*

Los Cu^0 , Cu^{+1} y Cu^{+2} acuosos poseen propiedades bariostáticas (inhibidores) y oligodinámicas. Los iones tienden a formar compuestos coloidales que atraen y fomentan la fijación de partículas en suspensión de distinta polaridad. Con ello se modifica la permeabilidad de la pared celular y los intercambios iónico-osmóticos y de nutrientes (Silbergeld, 2012). La muerte celular se ocasiona por la disminución del nivel de oxígeno en la célula al atrapar los grupos amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$) y sulfhidrilo ($-\text{SH}$) de las enzimas respiratorias de la membrana celular. Por otro lado, los cationes de cobre que atraviesan la pared celular interfieren con los cationes presentes en el protoplasma. Su mayor afinidad, en comparación con algunos otros que se desempeñan de manera natural dentro de los procesos metabólicos, resultan sustituidos (tal es el caso del zinc), con ello, alterando mecanismos metabólicos al interior del organismo. Los lisosomas almacenan las metalotioneinas cargadas del metal libre ionizado, con el objeto de evitar su toxicidad. No obstante, en ocasiones el cobre suele ser reincorporado al plasma, ya que es importante dentro del engranaje metabólico. Adicionalmente, el cobre facilita la hidrólisis y las reacciones de desplazamiento nucleofílicas en cadenas de péptidos y de ácidos nucleicos, siendo capaz de formar quelatos con los grupos fosfato, resultando en la apertura del DNA (Aguilar et al., 2006).

El transporte del cobre en todos estos procesos se realiza gracias a las chaperonas cúpricas (proteínas especializadas) y por varias ATP-etasas cuprodependientes, mientras que el cobre en exceso es eliminado por diversas vías. En Carrasco, (2000) se señala, que existe una relación directa entre la cantidad de cobre absorbido y la metalotioneína dentro del organismo. En resumen, el cobre desnaturaliza proteínas, altera grupos que forman parte de los centros activos de enzimas y proteínas, el de los grupos funcionales de los ácidos nucleicos, el de los componentes de la pared y de la membrana celular. (Aguilar et al., 2006)



3.2.3.3 *Inactivación por hierro*

Constituye parte esencial del metabolismo, ya que participa en todos los procesos de óxido-reducción. Se puede encontrar como parte esencial de las enzimas en el ciclo de Krebs, en la respiración celular, como transportador de electrones en los citocromos e interviene en el mantenimiento de la integridad celular (en catalasas, peroxidasas y oxigenasas). Su regulación se debe al elevado potencial redox junto con su facilidad para promover compuestos tóxicos altamente reactivos (Alberts, 2002). No obstante, un exceso de éste resulta tóxico para el organismo.

De hecho, el hierro inorgánico (Fe^{+2}) es la forma soluble capaz de atravesar la membrana sin complicación alguna, ya que algunos aminoácidos y azúcares pueden formar quelatos, aumentando con ello su absorción. El mecanismo es explicado en Morales (2010), donde, se menciona que la celuloplasmina (endoxidasa) oxida el hierro en el interior del organismo para que sea captado por la transferrina como (Fe^{+++}) (dicha forma posee un mayor poder germicida). Por ello un mecanismo de regulación consiste en su liberación, en caso de presentar un excedente dentro del organismo. Sin embargo, dicho proceso también resulta peligroso para el organismo a causa del microambiente que genera a su alrededor (oxidante y tóxico). En el exterior, la combinación con el oxígeno y los radicales hidroxilos pueden causar la oxidación de los lípidos de la membrana y otros constituyentes celulares (CSA, 2012).

3.2.4 *Desinfección no convencional*

La exploración en materia de desinfección se desarrolla actualmente buscando combinar la efectividad, ser funcional para un amplio espectro de acción, bajo costo brindado por los agentes propuestos y considerar los posteriores usos que deba tener el agua tratada, por mencionar algunos. Dichas premisas han llevado a evaluar agentes como: fenoles y derivados (triclosan, hexaclorofeno, clorocresol, parabenos), alcoholes, aldehídos (formaldehído y glutaraldehído), ácidos, halógenos y metales, entre otros, tal como lo menciona el Ente Nacional de Obras Hídricas de Saneamiento (ENOHS), (2010).

La exploración de procesos de oxidación avanzada (POA) que han resultado útiles inactivar HH son: el TiO_2 que reporta un hasta un 72% para *Ascaris* sp., *Himenolepis* sp., *Toxocara* sp., y *Trichuris* sp., procesos tipo “Fenton” con un 66% (Morales, 2010; Aranda, 2001),



inactivación con plata, logrando la inhibición total del desarrollo de los estados larvarios (Rodríguez, 2009; García et al., 2008) y el uso de ácido peracético con un 95% de eficiencia (Rojas *et al.*, 2008; Jiménez, 2007).

3.2.5 Inactivación sinérgica

El término “sinergia” implica una interacción y actividad combinada de dos o más agentes. El resultante es cualitativa y cuantitativamente distinto a la sumatoria de las capacidades individuales de cada agente. En caso contrario sería una nueva sustancia con mayor poder desinfectante con propiedades de “sinergia de desinfección”. Algunos ejemplos lo constituyen: plata/peróxido de hidrógeno, plata/cobre, plata/cobre/cloro, yodo/cloro, ozono/peróxido de hidrógeno y ozono/UV (Pancobro, 2012).

3.2.6 Factores fisicoquímicos que deben considerarse en la desinfección

En Metcalf, (1996) se señalan algunos factores a considerar dentro del proceso de desinfección, dentro de los cuales destacan: la materia orgánica presente en el caudal, las partículas suspendidas, los constituyentes inorgánicos, el pH y la temperatura modifican la capacidad de un agente desinfectante. En la Tabla 3-4 se mencionan algunos de ellos, así como su implicación. No obstante, a la fecha no existe ningún desinfectante que cumpla con todos los requerimientos.



Tabla 3-4 Factores a considerar dentro de la desinfección

Factor	Implicación
Turbidez	Las partículas en suspensión interfieren con el agente desinfectante.
Materia orgánica disuelta	Compuestos como aminoácidos y proteínas tienden a formar compuestos complejos. Lo anterior resulta en la formación de subproductos conocidos como proteinatos (sin capacidad desinfectante) (CIDTA, 2010).
Compuestos inorgánicos e iónicos	Algunos iones Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y Cl^- suelen ser reactivos y en presencia de otros compuestos su disponibilidad disminuye (Wang et al., 2003).
Concentración y distribución de los organismos	Los organismos se pueden encontrar en diferente lugar de la columna de agua, con lo cual una aplicación adecuada debe asegurar su llegada al objetivo con la concentración suficiente para obtener el efecto desinfectante esperado (Bloomfield, 1991).
Tipo de organismos	La resistencia dada por la fisiología de cada organismo es diferente, por lo cual la permisibilidad del intercambio con el medio son factores importantes a considerar dentro del proceso de inactivación.
pH	Incide en el estado de oxidación del agente (UDLAP, 2010).
Tiempo de exposición	Debido a que la reacción es a nivel proteínico se necesitan tiempos específicos para que ello ocurra.
Temperatura	Influye en la ionización del desinfectante empleado al modificar la relación de intercambio líquido-desinfectante (Gaudy y Gaudy, 1981 y UDLAP, 2010).

A partir de UDLAP, (2010)

3.2.7 Desinfectante ideal

Su búsqueda se basa en algunas de las características mencionadas en Metcalf, (1996), dentro de las cuales se mencionan: la eliminación de organismos para el cual se empleó (objetivo o blanco), efectividad (número de organismos eliminados por dosis), una alta practicidad y no ser perjudicial para los usos posteriores del caudal tratado, entre otros (Tabla 3-5). Por otro lado, los mecanismos de acción, modos y lugar de aplicación deben ser específicos. Adicionalmente un factor importante a considerar son las características biológicas, químicas y las estructuras a las que se desee impactar.

Tabla 3-5 Características que deseablemente debe poseer un desinfectante para su uso

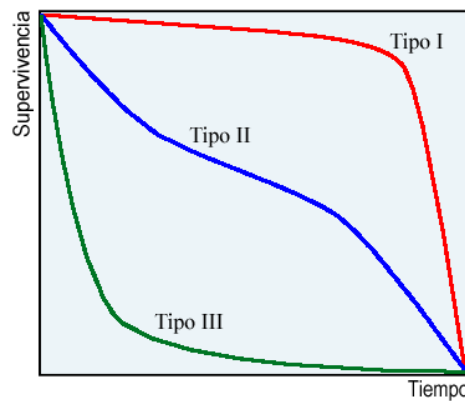
Característica	Propiedad
Toxicidad	Debe ser tóxico o letal a las concentraciones definidas previamente.
Toxicidad a temperatura ambiente	Debe ser efectivo en el intervalo de temperatura ambiente.
Toxicidad para otros organismos	No debe ser tóxico o letal para otros organismos en las mismas dosis.
Solubilidad	Debe tener una solubilidad adecuada de acuerdo a los mecanismos de acción ya sea en el agua o directamente en el tejido celular.
Estabilidad	Debe mantener su poder germicida por un periodo de tiempo Debe persistir en una concentración razonable en el agua desinfectada para proveer una protección residual contra posible contaminación antes de su reuso. No debe modificar el pH considerablemente, de acuerdo al uso posterior del líquido.
Homogeneidad	La disolución debe ser uniforme en su composición y soportar posibles fluctuaciones de composición y concentración.
Interacción con materia ajena	No debe ser absorbido por otra materia diferente a las células objetivo.
No corrosivo y no colorante	No debe atacar los metales y no debe teñir el agua.
Capacidad desodorante	Debe desodorizar y a su vez desinfectar
Disponibilidad	Debe estar disponible en grandes cantidades y a un costo razonable.
Manejo y transportación	Debe ser seguro y fácil de guardar, transportar, manejar y aplicar.
Determinación de concentración	Debe ser determinada fácil y rápidamente.

A partir de Metcalf, (1996)

3.2.8 Cinética de la desinfección química

Describe la forma mediante la cual ocurre la acción del agente. De manera general, la destrucción de los organismos sucede gradualmente como en la mayoría de los procesos fisicoquímicos (Bitton, 1994). La inactivación se desarrolla mediante diferentes etapas, las cuales son características de la interacción del agente con el organismo. Ellas pueden tener implicaciones sobre su morfología, los componentes estructurales, o bien intervención en las vías metabólicas. Sin embargo, es probable que más de una de ellas determine el modo en el cual se comporte la desinfección (ENOHS, 2010). Las velocidades globales empleadas en las reacciones de desinfección se han modelado a partir del uso de curvas de tiempo-sobrevivencia, ajustadas a expresiones de cinéticas químicas simples (Guadagnini et al., 2013).

La curva típicamente se compone de tres fases: a) una inicial “lag”, que expresa la velocidad de penetración del agente suministrado (brindado por la primera manifestación del efecto germicida). Se relaciona directamente con el concepto de resistencia poblacional. Sin embargo, al no ser constante para todos los organismos puede ser expresado por la distribución del valor promedio (Begon et al., 1990). Es influenciado por factores como temperatura, mezclado (difusivo o mecánico) y miscibilidad del desinfectante con el disolvente, b) una fase donde la velocidad de inactivación consistente con una reacción de primer orden, según lo descrito por Chick y Watson y c) un efecto de decrecimiento que representa la muerte de los organismos residuales (con resistencia mayor a la promedio o para aquellos en los cuales el acceso del desinfectante fue lento). Sin embargo, puede o no contener las fases descritas anteriormente, lo que da origen a una generalidad que puede describirse en tres cinéticas de inactivación (Figura 3-7).



Tomado de Miranda (2007)

Figura 3-7 Curvas de desinfección-sobrevivencia para microorganismos

Las curvas “Tipo I” (convexas) caracterizan a las especies con baja tasa de mortalidad. Las de “Tipo II” muestran una curva descendente, normalmente con forma parábola cúbica (sigmoidea). Las de “Tipo III” representa especies r-estrategas sufren una elevada mortalidad en las primeras etapas de vida, larvaria o juvenil, teniendo luego una mayor probabilidad de supervivencia. La curva muestra un pronunciado descenso inicial seguido de una fase más estable.

Dentro de las consideraciones en un sistema de desinfección se incluye: la velocidad a la cual se inactivan los organismos de interés o indicadores (velocidad de inactivación), el máximo poder desinfectante, el efecto gradual sobre el organismo y las concentraciones

correspondientes a las cuales ocurren. Todos ellos derivan en dosis a aplicar, volumen del contenedor, tiempo de contacto necesario, eficiencia, capacidad de diseño, filtración y pérdida de viabilidad, por mencionar algunos.

Sin embargo, por simplicidad, practicidad y conveniencia no se consideran las peculiaridades ocurridas en cada proceso (de tipo físico-químico) y que modifican la curva derivada de eventos estocásticos y probabilísticos relacionados con la acción germicida (Bloomfield, 1991).

3.2.9 Modelos de desinfección química

La cinética de destrucción de los microorganismos se expresada comúnmente por una ecuación de primer orden conocida como “la Ley de Chick”. El modelo describe la relación existente la inactivación microbiológica ocurrida al aplicar un desinfectante y el tiempo que toma en que ocurra. El modelo plantea la cuantificación de microorganismos sobrevivientes “N”, a un tiempo “t” en presencia de una concentración “C” de un desinfectante como:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kCn t$$

Dónde:

N_t= Microorganismos sobrevivientes al tiempo de contacto “t”; N₀= Microorganismos al tiempo t=0 (en el inicio de la prueba); k= Coeficiente específico de letalidad (caracteriza la sensibilidad de un microorganismo en presencia del desinfectante de estudio); C= concentración remanente de desinfectante; n= coeficiente de dilución, que es función de la calidad del agua representa el número promedio de desinfectante que se combina con el microorganismo y es necesario para inactivarlo; t= tiempo de contacto.

El parámetro “n” para valores menores a la unidad, indican que el tiempo de contacto es más relevante que la dosis de desinfectante. Si “n” es igual a la unidad; el tiempo de contacto y la concentración tienen la misma importancia y por último “n” es mayor a la unidad; la concentración de desinfectante es más importante que el tiempo de contacto (Gyürék y Finch, 1998).

No obstante, se han generado diversos modelos para describir la inactivación de los organismos, debido a que no todos los desinfectantes, ni todos los mecanismos funcionan de la misma manera. Inclusive algunos han introducido elementos estadísticos como se señala en la Tabla 3-6.

Tabla 3-6 Algunos modelos cinéticos empleados en desinfección

Modelo	Relación de sobrevivientes	Observaciones
Chick-Watson	$-kC^n t$	Cinética de primer orden cuando $n=1$, propuesta por Chick y Watson (1908).
Hom	$-kC^n t^m$	Generalización de la ley de Chick- Watson toma en cuenta las diferentes fases de las curvas de sobrevivencia (1972). Función no lineal de C y t puede ajustarse a las curvas que comúnmente ocurren en desinfección. Si $m>1$, la curva presenta una fase lag inicial, aumentando k con el tiempo. Si $m<1$, la curva presenta un efecto de decrecimiento, disminuyendo k con el tiempo.
Racional	$-\frac{\log[1 + N_0^{x-1}(x-1)kC^n t]}{(x-1)}$	Puede describir el fenómeno de la fase lag para $x<1$ y de decrecimiento para $x>1$.
Ley de poder de Hom	$-\frac{\log[1 + N_0^{x-1}(x-1)kC^n t^m]}{(x-1)}$	Provee un mejor ajuste que los modelos anteriores, para organismos con curvas de sobrevivencia del tipo C (Metcalf, 1996).
Selleck	$-n \log \left[1 + \frac{Ct}{k} \right]$	Modelo empírico generado a partir de la desinfección por aplicación de cloro en agua tratada, que describe las curvas de sobrevivencia logradas en dicho proceso (Metcalf, 1996). Los valores de k y n se relacionan con la razón de las dosis de cloro empleado en la prueba propuesta por Selleck (1978).
Múltiples objetivos	$\log \left[1 - (1 - e^{-kCt})^{n_c} \right]$	Modelo estadístico, no adecuado para describir la cinética de inactivación microbiana. Propone que cada microorganismo tiene un total de n_c objetivos críticos (todos idénticos), los cuales deben ser tocados una sola vez para ser inactivados. (1953)
Series de eventos	$\frac{-kCt + \ln \left[\sum_{K=0}^{l-1} \frac{(kCt)^K}{K!} \right]}{\ln(10)}$	Modelo donde se idealiza el daño que ocasiona el desinfectante a los microorganismos, suponiendo una serie de reacciones sucesivas que logran inactivarlos. "l" es el número de reacciones o eventos letales y K es la velocidad de destrucción de algún sitio en el mismo. (1975)
Múltiples series de eventos	$\log \left[1 - \left(1 - e^{-kCt} \sum_{K=0}^{l-1} \frac{(kCt)^K}{K!} \right) \right]$	Basado en el modelo de serie de eventos, donde supone una serie de reacciones de primer orden con respecto a la concentración. Por ello se requieren "l" eventos letales para inactivar a un organismo (1984)

Tomado de Miranda, (2005)

Dónde: "n" "m" "x" son parámetros del modelo; C= concentración remanente del desinfectante; N_0 =Organismos al tiempo "0"; t= tiempo de contacto; k= Coeficiente específico de letalidad.

3.3 Filtración

El mecanismo obedece históricamente a la imitación de un proceso natural de depuración de agua en manantiales. En McCabe et al., (1985) se señalan, los fundamentos sobre los

cuales descansa la operación y consiste en que alguno de los componentes de la mezcla no es soluble en otro, en la diferencia de diámetros entre el medio y los elementos a filtrar y en un espacio poroso e intersticial que promueva la separación por medios físicos.

Bajo ese concepto, inicialmente se construyeron algunos sistemas de carácter doméstico, empacados con rocas porosas de diferente origen. Durante el siglo XVIII y XIX, Francia exploró diversos tipos de empaques, como: esponjas, paños, rocas, lana y materiales fibrosos, entre otros que ofrecieran las características deseadas en el efluente.

A inicios del siglo XIX, en Inglaterra se profundizó el estudio de la operación unitaria. En particular los medios de soporte, siguiendo la corriente desarrollada en Francia. Su mayor avance consistió en encontrar remociones de: sólidos en suspensión, organismos, ciertos productos químicos y con ello: sabores, colores e inclusive olores.

Lo anterior condujo a asentar que: la filtración, no solo lleva a cabo una operación de cribado, sino que también ocurrían reacciones químicas entre el contenido caudal y el medio filtrante. Por ello, se ha optado por extender el concepto a la separación de partículas de naturaleza física, con interacciones químicas e inclusive biológicas. Con ello, a modificarlo a ser estudiado como un proceso, y no como operación unitaria (Sparks y Chase, 2012).

3.3.1 Mecanismos que intervienen dentro de la filtración

En Metcalf, (1996) se señala, que el espacio de poro determina y limita el libre paso de partículas con mayor diámetro. Sin embargo, de manera práctica, el proceso de filtración ocurre en dos etapas (transporte y adherencia), que ocurren casi simultáneamente y que se mencionan a continuación:

1. Transporte de partículas dentro de los poros

Los mecanismos a considerar para la realización del transporte son: a) cernido, b) sedimentación, c) intercepción, d) difusión y e) impacto inercial

2. Adherencia a los granos dentro del medio

Los mecanismos que promueven la adherencia son: a) fuerzas de Van der Waals, b) fuerzas electrostáticas, c) puente químico, así como otros asociados al material mismo, tales como la fricción y la rugosidad.



Sin embargo en *Army Corps of Engineers* (ACE), (2010) se puntualiza sobre la dificultad que implica determinar cuál de ellos controla el proceso de filtración, ya que es indudable que más de uno actúa de manera simultánea, alternada o intermitente.

3.3.2 Tipos de filtros

A partir de 1856 en Francia aparecieron dos tipos de filtros de agua: a) Fonvielle y b) Souchon (Reynolds y Richards, 1996).

a) Constituidos por un cono truncado de hierro fundido con tapa semiesférica en el cual había un lecho filtrante compuesto de esponjas marinas, roca caliza y arena de río.

b) Constituidos por tres lechos de paño de un máximo de dos metros de profundidad. Dicho modelo y dimensionamiento se emplean actualmente (Metcalf, 1996).

A partir de ello, en ambos casos formaron dos escuelas de filtración: a) descendente y b) ascendente.

a) Planteaba que el proceso (de arriba hacia abajo) obtenía una mayor resistencia en operación. Dentro de las ventajas se citaban: la eliminación de energía eléctrica en el proceso y la facilidad de limpieza por desempaque del sistema. Sin embargo, presentaba la aparición de zonas muertas y saturadas, requiriendo con ello de filtros de gran longitud, lo cual representa un problema en lugares con espacio reducido.

b) Sostenía que el peso producido por el asentamiento de la mayoría de las partículas en el fondo del filtro facilitarían su lavado con un simple cambio direccional de flujo. Sin embargo, en los sistemas biológicos, o con varios lechos y granulometrías se vería desfavorecida por la formación de la biopelícula. Algunas otras desventajas son: el requerimiento de energía eléctrica para su funcionamiento, la generación de altas presiones hidráulicas, dependencia de calidades adecuadas en los procesos previos, saturaciones a corto plazo, mayor mantenimiento y la necesidad de personal especializado. (Metcalf, 1996).

Con el tiempo se impuso la primera escuela (filtración descendente) y el uso de los filtros lentos de arena se popularizó en Europa y en América. El auge de la Microbiología nacida a mediados del siglo XIX promovió el estudio del factor microbiológico. A finales del siglo, la construcción masiva de las PTAR consideró la pertinencia de incluir sistemas de filtración y desinfección para efectuar la remoción de diferentes compuestos.

Con un mayor conocimiento del proceso se diseñaron filtros más rápidos, bajo patente a los que llamaron filtros mecánicos o americanos. Los anteriores de mayor eficiencia, pero con una clara dependencia de los procesos previos, La carga superficial fue uno de los criterios para separarlos, ya sea con baja carga (filtros lentos) o con alta (filtros rápidos), en medios porosos (pastas arcillosas, papel de filtro), granulares (arena, antracita, granate o combinados), con flujo ascendente de abajo hacia arriba o descendente y mixto (parte ascendente y parte descendente) (Metcalf, 1996) (Tabla 3-7).

Tabla 3-7 Clasificación de filtros según algunas características operativas

Según la velocidad de filtración	Según el medio filtrante usado	Según el sentido del flujo	Según la carga sobre el lecho
Rápidos (120-360) m ³ /m ² /día	1.-Arena (h=0.65-0.75m)	Ascendentes	Por gravedad
	2.-Antracita (h=0.50-0.60m)	Descendentes	Por presión
	3.-Mixtos: Antracita (h=50-60cm) y Arena (h=0.15-0.20m)	Flujo mixto	
	4.- Mixtos: arena, antracita y granate		
Lentos (7-14) m ³ /m ² /día	1.-Arena (h=0.60-1m)	Descendente y ascendente	Por gravedad

A partir de Auvinet, (1982) y ACE (2010) y Metcalf, (1996)

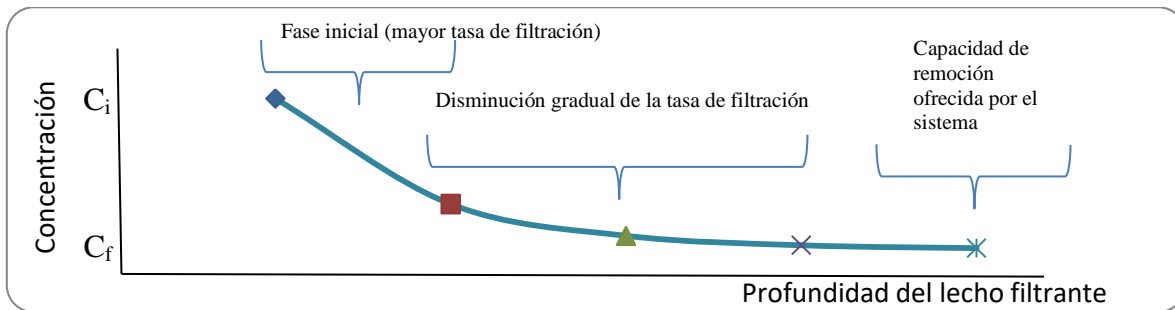
3.3.3 Tipos de empaques

Su selección se relaciona directamente con el tipo de filtrado, tamaño de partícula, tipo de filtración e interacción (ciclo operacional). Algunos de los medios filtrantes comúnmente empleados son:

- Telas metálicas de varios tipos de tejido en acero, aluminio, bronce, cobre, latón, níquel y otras aleaciones.
- Medios fibrosos no tejidos en fieltros prensados, naturales y sintéticos
Lechos granulares: arcilla, arena, calcita, carbón, granate, silicio, tierra de diatomeas y algunos sintéticos como: corosex, AGL, resinas de intercambio iónico (aniónicas, catiónicas y mixtas) como: *Green sand*, Pyrolox; MTM, TGP, KDF.
- Lechos no granulares (membranas), en los cuales se desarrolla microfiltración: de 0.04 a 2 μm, ultrafiltración: de 0.05 a 0.1 μm, nanofiltración: de 10 a 100 Å, osmosis inversa: (hiperfiltración): de 1 a 10 Å.

3.3.4 Cinética de filtración

Consiste en describir la remoción de uno o varios iones, elementos o compuestos, ya sea de manera independiente o en conjunto. Un balance de masa resume en gran parte su comportamiento, permitiendo determinar la eficiencia de un filtro. Entre la concentración de entrada (C_i) y de salida (C_t) (Figura 3-8). Para ello, se emplea el coeficiente β , que refleja el porcentaje de organismos retenidos en el medio y de manera indirecta infiere la distribución de los depósitos retenidos. Ello, en función de la posición, tiempo u operación. La determinación de la saturación se efectúa primordialmente mediante la colmatación progresiva de los poros o bien, mediante el desgaste físico o químico del medio filtrante. Auvinet, (1982) y ACE, (2010) señalan, que un filtro teórico retiene partículas con comportamiento de tipo exponencial decreciente, el cual se atenuará en función de la profundidad del medio filtrante, que en experimentos reales se alejará de un comportamiento gráfico de tipo lineal, con coeficiente de correlación (R^2) igual a 1; a medida que otras fuerzas físicas o químicas intervengan.



C_i =Concentración inicial; C_f =Concentración final

Imagen de elaboración propia

Figura 3-8 Comportamiento de filtración en un lecho empacado ideal

De igual manera mencionan, que algunos comportamientos que ocasionan un desvío de la curva durante el transcurso de la operación a lo largo del tiempo son: a) retención y arrastre de partículas, y b) coeficiente de filtración modificado (Maldonado, 2010).

a) Las partículas retenidas en los poros causan el estrechamiento de los canales, provocando el incremento de la velocidad del flujo en el interior. Dicho aumento ocasiona que parte de las partículas retenidas sean arrastradas a las capas inferiores.

b) Parte del mismo supuesto (inciso anterior), solo que manifiesta la importancia de las variaciones de la geometría de los poros en relación con la retención de las partículas. De

ese modo, la superficie específica es un factor importante que debe ser considerado, pues la velocidad intersticial aumenta debido al estrechamiento de los canales por los que escurre la suspensión. Lo anterior considera tres casos individuales, donde su posterior combinación y modificación genera el resultado global del proceso.

- 1.-Considera al medio filtrante como un conjunto de esferas individuales.
- 2.-Supone que el medio filtrante está representado por un conjunto de capilares cilíndricos individuales.
- 3.- Considera que la velocidad intersticial es modificada por la cantidad promedio de depósito en cualquier elemento de volumen del medio filtrante.

3.3.5 Modelos de filtración

A pesar de que se tiene conocimiento de los mecanismos que intervienen en la filtración, no se ha encontrado un modelo matemático que describa con precisión y exactitud el comportamiento de sus diferentes parámetros de operación. Hasta ahora, ninguna ecuación o conjunto de ellas pueden calcular los diferentes parámetros que inciden en su funcionamiento (Maldonado, 2010). Lo anterior, ya que el proceso es usualmente consecuencia de una combinación de eventos que pueden actuar en un momento en particular (ya sea por zonas, en solitario, o en sinergia) (Metcalf, 1996).

Con ello se concluye, que el alcance dado como una descripción fina del proceso puede ser efectuado con base en el comportamiento general del filtro. Sin embargo, la operación arroja algunos parámetros particulares de la relación del filtro con el caudal a tratar que deban ser considerados. Sin embargo, los modelos resultan útiles para la mejor comprensión del proceso de genérico. Algunas de ellas, se refieren de Metcalf, (1996), donde se relacionan elementos importantes al interior del sistema y que se muestran en la Tabla 3-8.

Tabla 3-8 Ecuaciones comúnmente empleadas para describir la filtración

Modelo (cronológico)	Ecuación planteada	Observaciones
Iwasaki (1937)	$\frac{dl}{dl} = \lambda L$	I= concentración de sólido por área λ=Módulo de impedimento o eficiencia de la capa dL del filtro C= concentración volumétrica de partículas
Ives (1962)	$\frac{dc}{dL} = -\lambda C$ $-\lambda = \lambda_1 * K \sigma - \frac{(\theta * \sigma)^2}{p - \sigma}$	L= Profundidad e la capa o lecho l=Módulo de impedimento o eficiencia de la capa dL del filtro C= concentración volumétrica de partículas K=coeficiente empírico σ= depósito específico p0= porosidad inicial del lecho filtrante
Ives (1969)	$\lambda = \lambda \left(1 + \frac{\beta \sigma}{p_0} \right) y * \left(1 + \frac{\sigma}{p} \right) z * \left(1 + \frac{\sigma}{s} \right) x$	λ=Módulo de impedimento o eficiencia de la capa dL del filtro p0= porosidad inicial del lecho filtrante p= porosidad del lecho filtrante a un tiempo determinado σ= depósito específico β= constante
Deb (1970)	$C = \frac{v}{p_0 - \sigma} * \left(\frac{dC}{dL} \right) + \left(\frac{dC}{dt} \right)$	C= concentración volumétrica de partículas p0= porosidad inicial del lecho filtrante σ= depósito específico L= Profundidad e la capa o lecho t=tiempo de operación v=volumen introducido
Adín y Rebhun (1970)	$\frac{dt}{dl} = K_1 C (F - t) - K_2 t J$	F = capacidad del filtro J = gradiente hidráulico K ₁ , K ₂ = coeficiente de adherencia y desprendimiento t= temperatura
Ginn (1992)	$\frac{dc}{dl} = 1.5 * \left(1 - \frac{p_0}{dc} \right) * a n_0 C$	d = diámetro del grano n ₀ = eficiencia de remoción del colector α = factor de eficiencia de las colisiones

Tomado de Metcalf, (1996) y Miranda, (2007)

3.3.6 Propuesta para contribución al conocimiento

Lo anterior apunta a la necesidad de alternativas en desinfección útiles para organismos de alta resistencia que contribuyan a resolver la problemática de salud pública que ocasionan, y que el presente trabajo pretende resolver mediante la propuesta de una tecnología aplicable en las condiciones prevalentes en el país. En ese sentido, se plantea la implementación de filtros descendentes que funcionen por gravedad, abatiendo con ello la necesidad requerimientos energéticos o accesorios adicionales. La exploración de dicha tecnología es adecuada para la infraestructura que usualmente presentan las áreas rurales de México, así como las comúnmente encontradas en países emergentes y en situación de pobreza. De manera adicional se busca los sistemas propuestos también desinfecten, lo cual

constituye un nuevo concepto, el de “filtro-desinfectante”, que nunca se había concebido como tal, ya que históricamente los filtros solo retienen o retiran elementos en su interior, sin que con ello se implique un efecto específico sobre la viabilidad del organismo. En relación al medio de empaque se propone el uso de agregados minerales provenientes de minas de explotación metálica. No obstante la metodología empleada para su selección, caracterización y uso son de carácter innovador, al brindar de manera adicional un valor agregado a éste, ya que a la fecha no tenía ninguno asociado como consecuencia de su baja rentabilidad.

Por otro lado, la exploración de metales dicho contexto no ha sido abordada, como tampoco uno que involucre la afectación de la viabilidad por efectos mecánicos-químicos, tal como se plantea con el uso de los agregados, No obstante en ninguno de los casos se han abordado los posibles mecanismos involucrados en el proceso de inactivación. Finalmente se exploran y analizan de manera contrastiva las técnicas comúnmente empleadas a nivel mundial para estimar la pérdida de viabilidad.

4 METODOLOGÍA

El trabajo se conformó por tres etapas:

Primera etapa: Tuvo como fin seleccionar el lugar de la obtención del material a emplearse durante el experimento, recolectarlo, acondicionarlo y caracterizarlo. Asimismo, planteó la conceptualización y diseño del sistema filtrante.

Segunda etapa: Buscó evaluar el efecto de los agentes con contenido metálico (plata, cobre y hierro, así como el de los AM sobre los HH, tanto en ensayos en matraz, como el sistema filtrante.

Tercera etapa: Pretendió caracterizar la pérdida de viabilidad en HH derivada por las pruebas de contacto (con agentes metálicos y AM) y dentro de un proceso de filtración. Finalmente, pretendió evaluarlos como una tecnología direccionada a la desinfección de organismos. Lo anterior se esquematiza en la Figura 4-1.

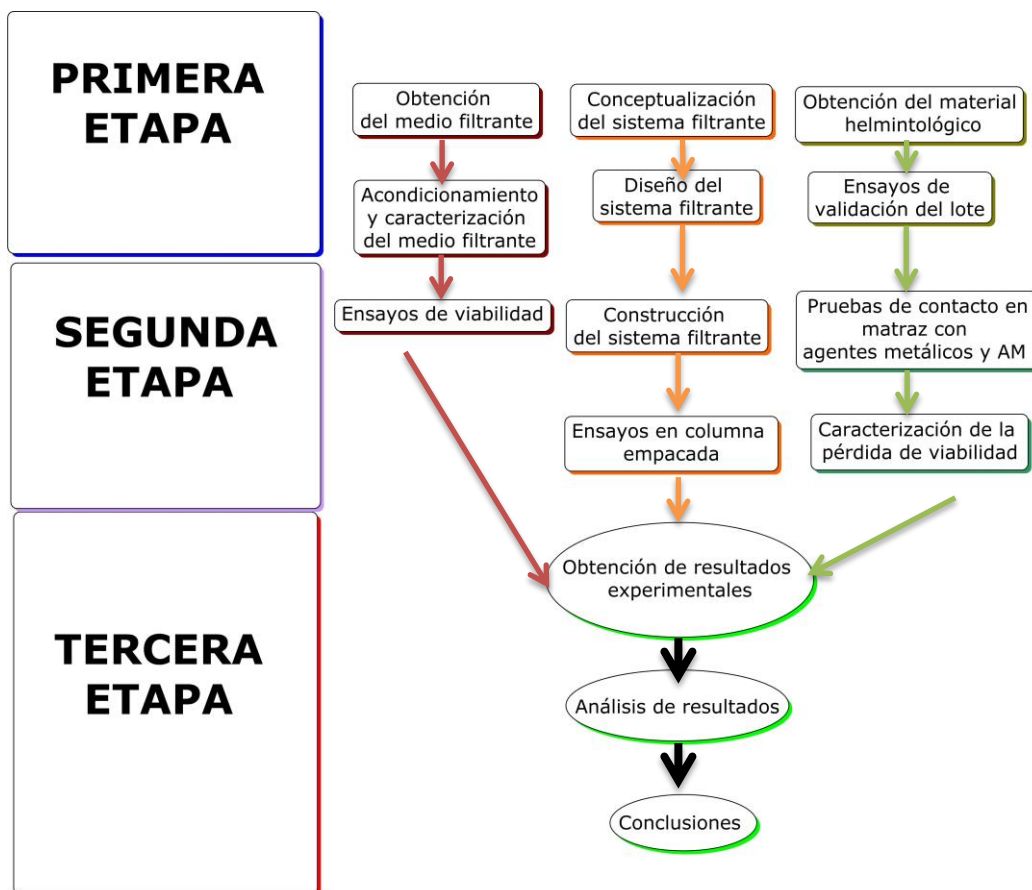


Figura 4-1 Esquema general de trabajo

4.1 Primera etapa

Se compone por tres partes:

1. **Obtención, recolección, acondicionamiento y caracterización del material filtrante.**- Comprendió la obtención, acondicionamiento y caracterización del medio de soporte a utilizar.
2. **Obtención del material helmintológico.**- Se conformó por la recolección y validación de los *T. canis* y *A. lumbricoides* adultos, por la recuperación de los HTC y HAL, así como por el acondicionamiento del lote de HH para las pruebas de contacto y filtrado.
3. **Conceptualización y diseño del sistema filtrante.**- Se conformó por la concepción, establecimiento de los criterios de diseño y empleados para favorecer la pérdida de viabilidad.

4.1.1 Obtención del medio filtrante

Un medio pétreo que brinde las características diferenciales entre el influente y efluente se seleccionó. Se buscaron características promotoras de la PV basados en conocimientos de Helmintología (estructura del HH y ciclo de vida de los organismos), Química (composición del AM y de los organismos), Bioquímica (probables rutas de acceso e implicaciones metabólicas al contacto), con los correspondientes a Ingeniería (operaciones unitarias y procesos de separación) e Ingeniería ambiental (tratamiento de agua, problemática y fundamentos de desinfección (interacción con los organismos), tal que interviniera en la retención e inactivación de los huevos de helminto.

4.1.1.1 Acondicionamiento del material

El material recuperado de las minas se despedazó en una trituradora de mandíbula marca Zenith Shanghai JC250×1200 para generar los diámetros de partícula propuestos 2 y 0.6 mm. Posteriormente, se tamizaron con ayuda de mallas Tyler No. 18 (2.00-2.10 mm) hasta obtener en ambos casos un promedio efectivo correspondiente al 90% del material dentro de dicho intervalo, el cual se empleó como medio de empaque en el sistema de filtración. (Metcalf, 1996). Una vez recuperadas las secciones, se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de polvos y se secaron en una estufa a 150 °C. Dichas granulometrías se

eligieron debido a las características hidráulicas, de filtración y de interacción con el organismo; sin sacrificar cuestiones operativas dentro del sistema.

Para filtros lentos, en Neftafim, (2008) se recomienda como empaque grava de un diámetro de partícula de 1.5-2.0 mm, el cual obedece al caudal máximo a tratar, mientras que para el caso de la antracita para agua pre-tratada (con muy bajo contenido de partículas suspendidas) se recomienda entre 0.6 y 1.2 mm. De manera adicional, las arenas (0.45 y 0.6 mm) son efectivas para filtrar contaminantes orgánicos e inorgánicos, eligiendo la cota superior y la inferior. El motivo obedece a evitar el azolve, así como brindar una función de pulimento (al aumentar el área de contacto con los huevos) y favorecer el factor mecánico (ACE, 2010). No obstante, en este caso particular se empleó solo la cota superior de mayor granulometría, con miras a la inclusión de la tecnología en otros campos de ingeniería ambiental.

4.1.1.2 Caracterización del AM, SiO₂ y PP

Todos los medios empleados como lecho filtrante (AM₁, AM₂, SiO₂ y PP) fueron caracterizados de manera física y fisicoquímica (Figura 4-2). Dichas propiedades brindaron información sobre los posibles comportamientos ofrecidos por el diseño, de tipo hidráulico, mecánico, químico, entre otros. Por otro lado, las PP se emplearon a manera de testigo.

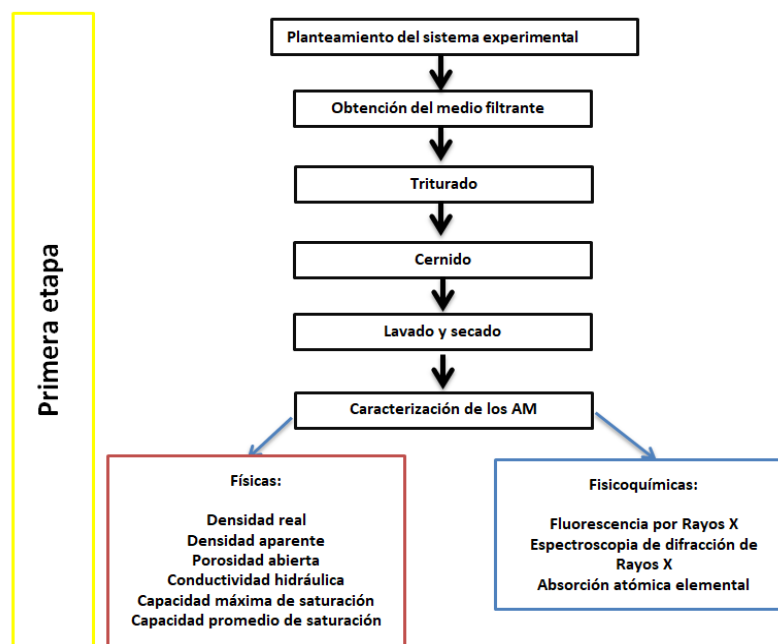


Figura 4-2. Acondicionamiento y caracterización de los AM y PP.

Caracterización física

Las propiedades a estimar para cada medio se conformaron por: densidad real (ρ), densidad aparente (ρ_{ap}), porosidad abierta (ϵ), capacidad máxima de saturación de agua (A_{max}), absorción promedio de agua (A_{prom}) y conductividad hidráulica (μ). Las técnicas empleadas se detallan en el ANEXO II y el ANEXO IV.

Caracterización fisicoquímica

Consistió en un análisis cualitativo y cuantitativo de los medios, que se obtuvo mediante: a) fluorescencia por Rayos X, b) espectroscopia de difracción de Rayos X en polvos y c) absorción atómica elemental

Las técnicas empleadas se detallan en el ANEXO II.

Análisis multielemental

La geomorfología del lugar de recolección de los AM prevé una composición multielemental (Mengelle-López, 2012). Por ello, se determinó el contenido cuantitativo (%) de los elementos químicos (mayores y menores) que componen al AM, partiendo de análisis de difracción de Rayos X, absorción atómica y fluorescencia de Rayos X (FRX).

De manera adicional, se aplicó una prueba no paramétrica de asociación de Olmstead–Tukey (Steel y Torri, 1981), la cual contribuyó a la caracterización de los elementos contenidos en el AM, clasificándolos como: dominantes, comunes, raros e indicadores. Se eligió éste tipo de prueba, ya que estima la importancia relativa de cada una de los componentes de la matriz mineral. La anterior toma el logaritmo de la abundancia más uno ($\log n+1$), contra los valores de la frecuencia de aparición o prevalencia de cada elemento y considera la media aritmética para trazar los ejes, que permiten obtener los cuadrantes:

- I Elementos abundantes y frecuentes (dominantes)
- II Elementos poco abundantes y frecuentes (comunes)
- III Elementos poco abundantes y poco frecuentes (raros)
- IV Elementos abundantes y poco frecuentes (indicadores)

Cuantificación y caracterización de sulfuros

Es común encontrar sulfuros en las minas de extracción metálica. La toxicidad asociada a ellos se incrementa al entrar en contacto con agua. Por ello, es importante determinar su contenido dentro del agregado. El anterior, se efectuó por medio de la técnica de flotación por aireación, la cual se detalla en el ANEXO II.

4.1.2 Obtención del material helmintológico

Los HH de ambas especies (*Ascaris lumbricoides* y *Toxocara canis*) se recuperaron e identificaron a partir de la respectiva hembra grávida adulta (Figura 4-3), empleando técnicas helmintológicas y claves taxonómicas para su determinación (ANEXO III). La obtención de los huevecillos se efectuó mediante la extracción del útero por disección (Figura 10-1). Lo anterior, ya que su obtención del ambiente no asegura la igualdad de condiciones en los organismos en cuestión de un estado físico, un valor confiable de viabilidad y homogéneo para todos los organismos evaluados, que en conjunto limitarían lo repetible del experimento.

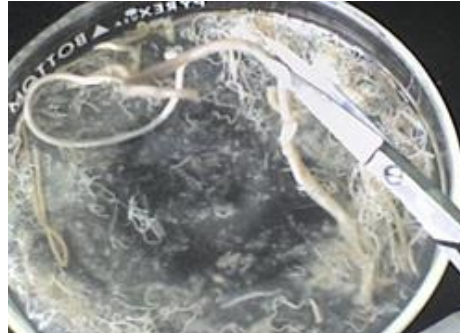


Imagen de elaboración propia

Figura 4-3 Recuperación de los huevecillos a partir de un espécimen de *T. canis*

4.1.2.1 Ensayos de viabilidad de los lotes (HTC y HAL)

Una vez recuperados los organismos, se sometieron a un ensayo de viabilidad *in vitro* para determinar la viabilidad potencial del lote recuperado, empleando la técnica sugerida por Oaks y Kayes, (1979), donde sugiere el empleo de un medio ácido H_2SO_4 con concentración 0.01 N, durante un periodo de 28 días. La prueba se efectuó por triplicado mediante la incubación de 15 organismos por ensayo y obteniendo el porcentaje de

huevecillos larvados en cada caso, o bien el porcentaje de los no teñidos, según lo señalado en De Victorica y Galván, (2003).

Dicho parámetro se estimó mediante tinción diferencial por exclusión, efectuándose como sigue:

$$\% \text{ de viabilidad} = \left[\frac{(N - n_{\text{larvados}})}{N} \right] \times 100$$

Dónde:

N = Número de huevos totales

n_{larvados} = Número de huevos larvados

$$\% \text{ de viabilidad} = 100 - (\% \text{ de huevos larvados})$$

4.1.2.2 Conservación

Una vez recuperados los huevecillos, se colocaron en la solución de hibernación sugerida en Johnson et al., (2002) conformada por Formol 5%, en agitación suave durante diez minutos (con el objeto de permearlos y mantener su viabilidad inherente). Finalmente, se introdujeron en un nuevo vial color ámbar y se conservaron en refrigeración a 2-4 °C hasta su utilización, tal como se señala en Figura 4-4.

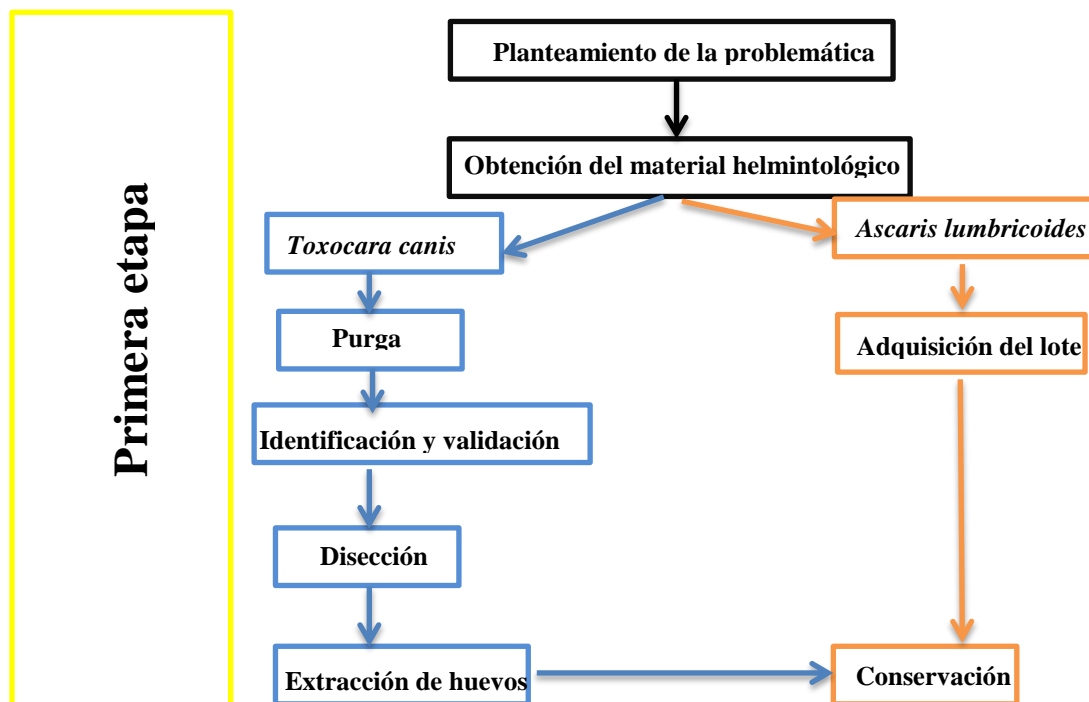


Figura 4-4 Metodología de obtención del material helmintológico

4.1.2.3 Ensayos de selección de condiciones de incubación

El ensayo de incubación fue el sugerido por Oaks y Kayes, (1979), denominado “*in vitro*”, donde sugiere el empleo de un medio ácido H_2SO_4 con concentración 0.01 N, en condiciones de aireación y ausencia de luz durante un periodo de 28 días a 26-28 °C. Asimismo, se efectuó el mismo ensayo cambiando las condiciones de incubación, tal como lo emplean otros autores, donde mencionan el uso de: a) solución salina fisiológica, b) agua corriente, c) formol 2% y d) H_2SO_4 0.1 N en diferentes proporciones y condiciones (sin y con agitación, así como en presencia y ausencia de luz sugerida en Thompson y Crandall, (1979) y Rojas et al., (2008), entre otros. Lo anterior, con el fin de encontrar el mejor medio de incubación. Las combinaciones resultantes evaluadas fueron:

- a) Agua corriente: se empleó agua proveniente del LMBE, UNAM.
- b) Agua destilada: se empleó agua destilada comercial.
- c) Solución salina: se empleó solución fisiológica (agua destilada + NaCl 8.5%).
- d) H_2SO_4 : se empleó una solución 0.1 N.
- e) Formol: se empleó una solución de formol al 2%.
- f) Solución salina (10%) + Agua destilada (90%) (vol/vol)
- g) Solución salina (10%) + Agua corriente (90%) (vol/vol)
- h) Formol (10%) + Solución salina (90%) (vol/vol)
- i) Formol (10%) + Agua destilada (90%) (vol/vol)
- j) Formol (10%) + Agua corriente (90%) (vol/vol)
- k) H_2SO_4 (10%) + Agua destilada (90%) (vol/vol)
- l) H_2SO_4 (10%) + Agua corriente (90%) (vol/vol)
- m) H_2SO_4 (10%) + Solución salina (90%) (vol/vol)

Todos los referidos anteriormente se evaluaron independientemente en:

- Incubadora / cerrado
- Incubadora / abierto
- Cuarto caliente / cerrado / sin agitación
- Cuarto caliente / abierto / sin agitación
- Cuarto caliente / cerrado / sin agitación
- Cuarto caliente / abierto / sin agitación

Algunos de los equipos y condiciones empleadas relevantes para evaluar la técnica fueron:

Incubadora: Marca AXON modelo 19-80, a una temperatura constante de 28 °C.

Cuarto caliente: Se empleó el cuarto caliente ubicado en el Laboratorio de Microbiología Experimental bajo condiciones de 26-28 °C.

Apertura: Consistió en la apertura total de las cajas de Petri durante todo el ensayo.

Cerrado: Consistió en mantener las cajas de Petri cerradas durante todo el ensayo.

Sin agitación: Las cajas de Petri fueron depositadas en un sitio donde presentarían la menor perturbación.

Con agitación: La agitación se efectuó mediante un dispositivo de agitación orbital, bajo condiciones 40-50 rpm durante todo el ensayo.

De manera adicional, dicho parámetro se estimó mediante tinción diferencial por exclusión, según la técnica sugerida por De Victorica et al., (2003), con el objeto de contrastar los resultados obtenidos por cada técnica. Las anteriores se fundamentan en:

- Larvado *in vitro*: Considera la capacidad potencial de infección mediante el paso de un HH un estadio larvario-infectivo. La anterior se evaluó mediante la contabilización de los organismos en estadio larvario.
- Tinción diferencial (por exclusión): Se fundamenta en la selectividad que posee la estructura externa del HH con respecto a la capacidad homeostática. Lo anterior se efectuó con azul tripán (colorante). Donde, una capa intacta no incorpora el colorante, mientras que un organismo muerto, pierde la capacidad de regulación, evidenciando así los organismos inactivados (Rojas et al., 1998).

En el presente trabajo se estableció 15 HH por ensayo, ya que corresponde al promedio de huevos de helminto tomado en el influente de una PTAR en la ciudad de México de acuerdo con Jiménez, (2007) y Morales, (2010).

Una vez concluido el ensayo de estimación de viabilidad, se procedió a extraer y colocar los HH en una cámara DONCASTER, donde se llevó a cabo la separación, identificación y conteo necesario para determinar la viabilidad de los HH en cada caso, empleando la ecuación señalada en el punto 4.1.2.1.

Lo anterior sugiere el planteamiento de:

H_0 = Las condiciones evaluadas no afectan la obtención de la larva móvil.

H_1 = Las condiciones evaluadas no afectan la obtención de la larva móvil.

El criterio de aceptación del lote en ambas especies fue de 80% de viabilidad (organismos larvados). Se empleó la definición señalada en la NOM-004-SEMARNAT-2002, la cual menciona que, “*lo son aquellos HH susceptibles a desarrollarse e infectar, que pueden ser identificados mediante la presencia de estadios larvarios (larva móvil)*”. El valor antes mencionado se consideró para evitar falsos positivos (error α) en pruebas de contacto (considerado dentro de las pruebas estadísticas).

4.1.2.4 Ensayos en matraz a testigos (PP y SiO_2) y AM

Para determinar el efecto ejercido por los AM sobre los HH (HTC y HAL) se efectuaron ensayos de contacto progresivo (30-600 min). Para ello, se adicionaron de manera independiente 50, 100 y 150 g de AM (1 y 2) en un matraz de 0.5 L y colocados sin agitación (SA), así como en agitación (CA). Asimismo se emplearon bajo las mismas condiciones, dos medios de soporte a manera de testigos para estimar el efecto mecánico y químico ejercido por los AM, constituidos por perlas plásticas (PP) y Cuarzo (SiO_2), respectivamente. Lo anterior, ya que se planteó la hipótesis de una inactivación derivada por efectos mecánicos y químicos.

Para ello se efectuaron ensayos con:

- AM_1 / Con agitación
- AM_2 / Con agitación
- AM_1 / Sin agitación
- AM_2 / Sin agitación
- PP / Sin agitación
- PP / Con agitación
- SiO_2 / Sin agitación
- SiO_2 / Con agitación
- Control / Sin agitación
- Control / Con agitación

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente a cada ensayo, se recuperaron los HH y se colocaron en las condiciones de estimación de viabilidad correspondientes, ya fuera mediante incubación para obtener su larvado *in vitro*, o bien, por tinción diferencial por exclusión, empleando en ambos casos para calcular la pérdida de viabilidad la ecuación señalada en el punto 4.1.2.1. Sin embargo, en el presente trabajo solo se incluyen los resultados obtenidos a partir de 30 min, hasta 180 min. Lo anterior, al no obtener registros significativos para los registros posteriores, de acuerdo a la prueba de ANOVA efectuada para cada caso (con $\alpha=0.05$).

De manera adicional se hizo un duplicado del ensayo, con el fin de obtener organismos para ser observados y fotografiados en cada caso por Microscopía óptica y electrónica de barrido. La recuperación se efectuó para cada periodo de evaluación, que correspondió a 30 minutos, en todos los casos.

4.1.3 Sistema filtrante experimental

Se pretendió realizar un filtro que constituyera una alternativa para inactivar HH. Adicionalmente, que fuera de bajo costo y también de mantenimiento, de fácil construcción, reproducible, que no requiera del uso de equipos complementarios, que no generara compuestos tóxicos secundarios y por último que su manejo y transportación fueran seguros.

4.1.3.1 Conceptualización del sistema filtrante

El sistema busca obtener resultados de la filtración (retención) de HH y como promotor de la PV. La conceptualización, diseño, dimensionamiento y construcción del sistema filtrante, se efectuó en función de los resultados obtenidos de los ensayos experimentales en matraz. El sistema propuesto se seccionó en tres partes (suministro, distribución y filtro).

a) Suministro: Se conformó por un tanque de abastecimiento con Agua destilada, desionizada y esterilizada (ADDE) para abastecer al sistema. Asimismo se incluyó una bomba sumergible, regulada y calibrada mediante válvulas para asegurar las condiciones cualitativas y cuantitativas de alimentación durante el ensayo.

b) Distribución: Se conformó por una tubería de alimentación de PVC ¼ in de diámetro conectado a cada filtro por la barra de soporte, la cual se ubicó en la parte superior del

sistema experimental para efectuar la distribución correspondiente. Con el objeto de regular el influente, se incluyeron válvulas dosificadoras en cada caso.

c) Filtro: Se planteó un sistema de 20 cartuchos para dar seguimiento en todo el ensayo, contemplando así la evaluación a cada profundidad, con diferencia de 10 cm entre cada sistema, evaluando desde el primer segmento, hasta el último, correspondiente a una profundidad del lecho de 200 cm.

d) Tortuosidad: Tortuosidad: Consistió en el recorrido parcial o total que sigue una partícula en el lecho. Se define, como el cociente entre la longitud de los canales en el medio poroso (L') y la longitud del lecho (L) (Metcalf, 1996). Se partió de la suposición teórica, en la cual dicho cociente es igual a la unidad. Sin embargo, se desconoce la interacción existente entre el HH y el AM, pudiendo tener implicaciones en desfaseamiento entre el tiempo de contacto del organismo y el de residencia hidráulica, lo que implicaría ajustes operativos en cuanto al gasto que pueda manejar el sistema filtrante.

e) Material de empaque/arreglo: Se empleó de manera independiente cada AM con granulometría de 2 mm en ambos casos dispuestos en un solo lecho.

f) Alimentación y funcionamiento: Se llevó a cabo de manera continua con ADDE, en forma descendente (para evitar el uso de energía eléctrica).

g) Tipo de filtro: Es de naturaleza lenta, al manejar un caudal menor de $14 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

En OMS, (2009) se menciona que, dichos sistemas son efectivos, simples y económicos. Sus características de aplicabilidad, costo y bajo mantenimiento, los direcciona como factibles en áreas rurales y carentes de servicios eléctricos.

Sin embargo, la diferencia existente en comparación con los filtros comunes, radica en la formación de la biopelícula en el lecho, la cual se encontraría limitada para el sistema filtrante propuesto, como consecuencia del contenido biocida del AM.

h) Longitud de los filtros: Auvinet, (1982) y ACE, (2010), señalan, que por cuestiones de mantenimiento y factibilidad no deben poseer una profundidad mayor a 2 m.

i) Muestreo: Con el objeto de dar seguimiento al efecto de filtración y PV inducido por los sistemas empacados con los agregados se ubicaron puntos de muestreo cada 10 cm, tal como se señala en Felder y Rosseau (1986) y Auvinet, (1982)

- j) Estimación de tiempo de contacto: Se determinó a partir de las pruebas de contacto directo de los AM con los HH.
- k) Compuestos nocivos/concentración en el AM: La selección de los AM se relacionó con algunos compuestos que han presentado actividad biocida, en conjunto con lo buscado dentro del presente trabajo. Por ello algunos de ellos fueron, Ag, Cu, Fe, Ti y Zn, por mencionar algunos. Sin embargo, se desconoce el efecto del resto de los elementos contenidos en el agregado sobre los HH. De hecho, se empleó material recuperado de sitios lejanos a la zona de extracción, que no forman parte de la mina explotada, debido a su bajo contenido y valor comercial, al no ser redituable su recuperación.
- l) Recolección del filtrado. El efluente se recuperó con ayuda de un sistema de filtración marca *Millipore* acoplado a un filtro de policelulosa de 0.15 μm para retener la parte sólida del proceso, la cual podría estar constituida por restos de los HH y de AM.

4.1.3.2 *Diseño del sistema filtrante*

Los elementos antes mencionados se consideraron para efectuar los cálculos relativos al diseño del sistema experimental (Figura 4-5 y Figura 4-6). La memoria de cálculo que derivó en el sistema filtrante que se presenta en ANEXO VIII.

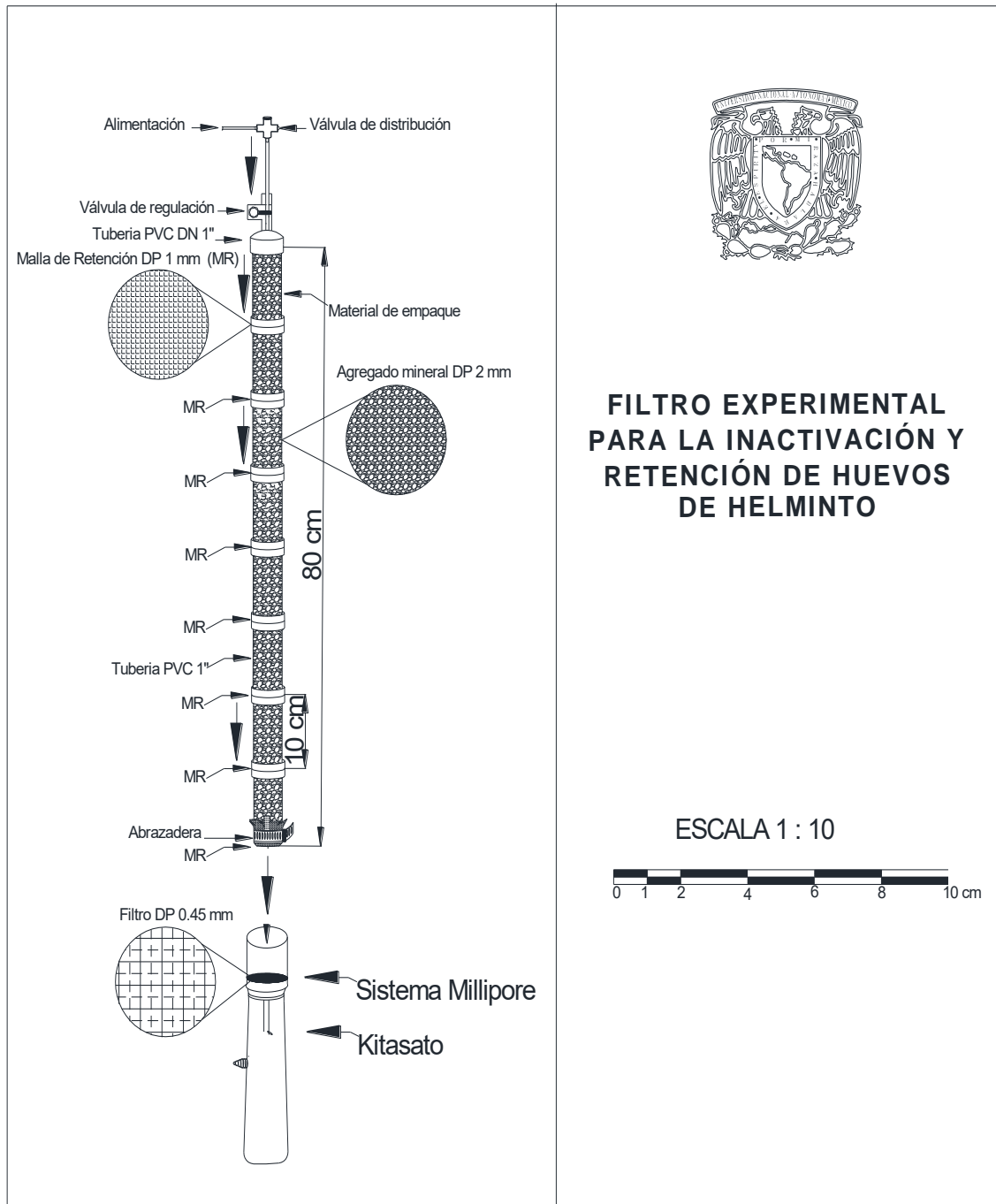


Figura 4-5 Plano de un filtro desinfectante de huevos de helminto

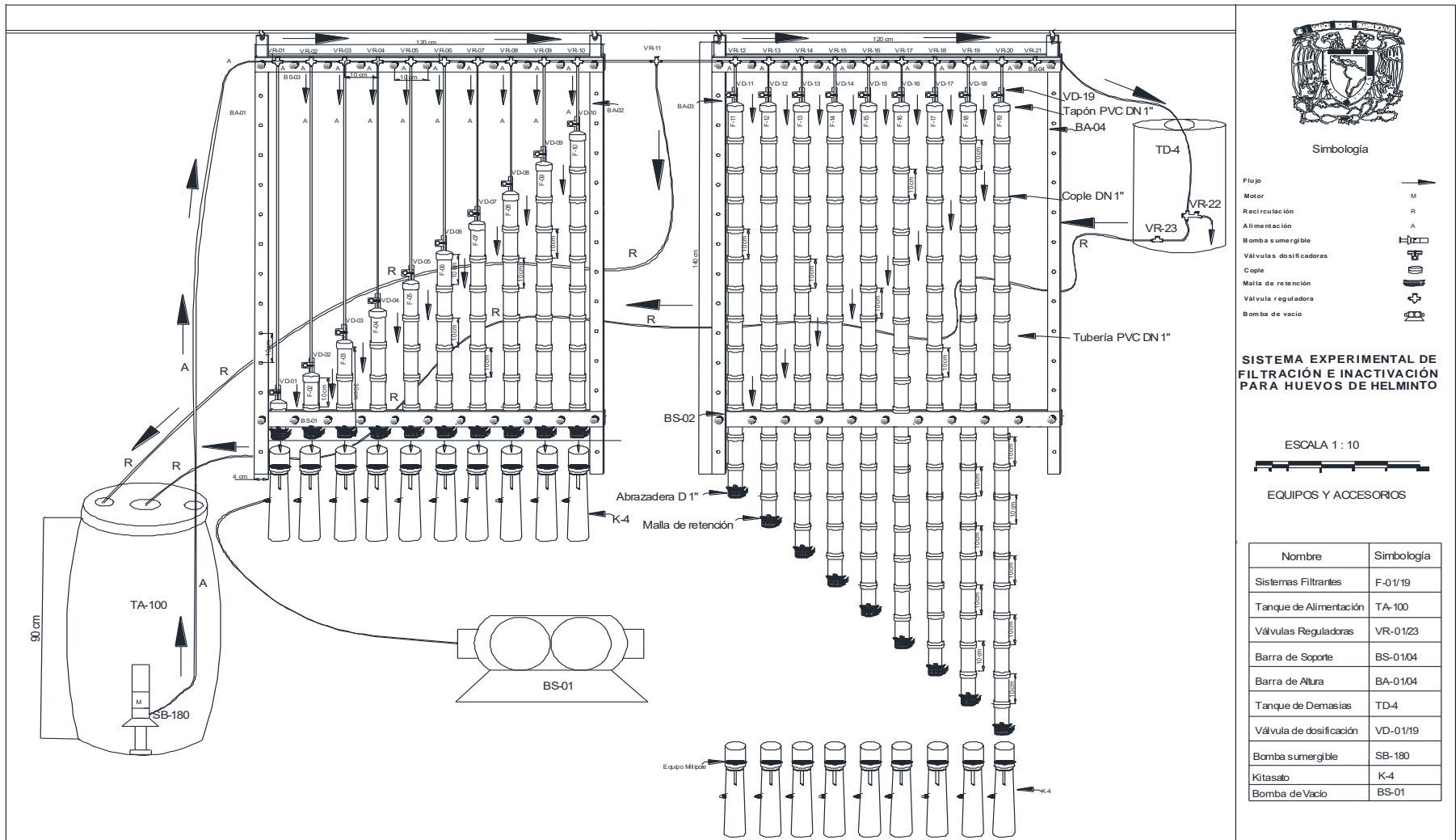


Figura 4-6 Plano del sistema experimental de filtración



4.2 Segunda etapa

Se compuso por dos partes:

- 1.- **Ensayos de contacto directo con los agentes metálicos y con los AM.**- Comprendió las pruebas independientes de contacto directo de los HH (HAL y HTC) con los compuestos de hierro, plata, cobre y los AM a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. De manera adicional, se efectuaron ensayos empleando PP y SiO₂ a manera de testigos para estimar el efecto mecánico y químico, respectivamente.
- 2.- **Pruebas de viabilidad para AM para ser considerados como alternativa desinfectante.**- Comprendió la evaluación de las características que deseablemente debe mostrar un agente para ser empleado como desinfectante, y que se señalan en Metcalf, (1996).
- 3.- **Construcción de los sistemas experimentales de filtración.**- Se generó el sistema a partir de las consideraciones señaladas el punto 4.1.3.

4.2.1 Ensayos de contacto en matraz con plata, cobre, hierro, AM, SiO₂ y PP

En primera instancia, se efectuó un barrido de concentraciones para todos los metales propuestos, dado que no existen referencias al tema en cuestión de inactivación promovida por metales sobre HH. Por otra parte, las metodologías existentes de evaluación no se adecuan a los objetivos del presente trabajo.

Las pruebas se efectuaron sobre HTC y HAL en cajas de Petri, mediante exposición directa a los agentes mencionados en a, b, c y d, los cuales se detallan a continuación:

- a) Granalla de plata (Ag⁰), Plata coloidal (Ag⁰ y Ag⁺), Nitrato de plata AgNO₃ (Ag⁺) y Óxido de plata Ag₂O (Ag⁺).
- b) Granalla de cobre (Cu⁰), Óxido cuproso (Cu₂O) (Cu⁺), Óxido cúprico (CuO) (Cu⁺⁺) y Sulfato cúprico (CuSO₄) (Cu⁺⁺).
- c) Limadura de hierro (Fe⁰), Sulfuro de hierro (FeS₂) (Fe⁺⁺), sulfato ferroso FeSO₄ (Fe⁺⁺) y Óxido férrico (Fe₂O₃) (Fe⁺⁺⁺).
- d) Dos tipos de AM recuperados de dos minas ubicadas en Zacatecas, México.
- e) PP y SiO₂ se emplearon a manera de testigos del efecto mecánico y químico, ya que ambos AM contienen mayoritariamente SiO₂.



El presente trabajo evaluó para cada agente concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹, de manera progresiva cada 30 minutos, hasta llegar a 180 min, para identificar el efecto sobre la viabilidad de los HH. Los organismos se recuperaron una vez cumplido el tiempo de exposición y su viabilidad se estimó mediante:

a) Larvado *in vitro*: Se efectuó empleando la técnica de incubación sugerida por Oaks y Kayes (1979), con duración de 28 días, usando como medio de incubación H₂SO₄, a una concentración 0.01 N, temperatura constante 28 °C, bajo condiciones de obscuridad, sin agitación y con aireación (eventual). Las anteriores en conjunto correspondieron a la combinación de condiciones que ofrecieron los mejores resultados de larvado en ambas especies. Una vez transcurrido el tiempo experimental, se recuperaron los organismos en una cámara DONCASTER y se procedió a verificar la presencia de la larva móvil, calculando la viabilidad según la ecuación señalada en 4.1.2.1.

b) Tinción diferencial: Se efectuó mediante la técnica señalada en De Victorica y Galván, (2003), que consiste en la aplicación directa de un colorante vital. En el presente trabajo, se empleó “azul tripán”, ya que ofrecía las mejores condiciones de identificación por contraste, con respecto a los agentes evaluados (Naranja de Metilo, Rojo Congo, Lugol, Azul de Metileno, Hematoxilina y Safranina).

Posterior al tiempo de exposición, se recuperaron y colocaron los HH en portaobjetos en condiciones acuosas, adicionando una gota de agua destilada, para evitar su adhesión. Inmediatamente se añadieron un par de gotas del colorante, manteniendo la muestra en dichas condiciones durante 10 minutos, esperando detectar su aceptación. Dicho signo es referido por la técnica como estimador de la pérdida de viabilidad, donde, la adquisición de un color azulado por parte del huevecillo refleja la incapacidad de osmorregulación típica de un organismo muerto. Los cálculos correspondientes se efectuaron de acuerdo a la ecuación señalada en el punto 4.1.2.1.

4.2.1.1 Capacidad de Inactivación ofrecida por los compuestos metálicos (Ag, Cu y Fe)

Se obtuvieron para cada agente: el promedio de pérdida de viabilidad, su máximo y mínimo particular, así como el general. Para éste último, se estableció una escala de referencia progresiva Tabla 4-1, que evidencia la inactivación brindada por el agente, la



cual se incrementa a una razón de 20% por cada grado y en 10% para los últimos dos. Lo anterior, para ofrecer de una manera diferenciada la PV evidenciada por cada estimación.

Tabla 4-1. Escala referencia propuesta, que señala el grado de inactivación de huevos de helminto:

Escala	% de inactivación
+	0-20
++	20-40
+++	40-60
++++	60-80
+++++	80-90
++++++	90-100

4.2.1.2 Caracterización de la inactivación ofrecida por los compuestos metálicos

Consistió en la descripción e interpretación de los efectos de inactivación derivados del contacto directo de los agentes con los HH, con respecto a la progresión del ensayo y las concentraciones aplicadas. A partir de los resultados obtenidos se generaron en cada caso: la curva de pérdida de viabilidad correspondiente para cada tiempo, concentración y técnica de estimación. Dichos parámetros fueron analizados de manera contrastiva para una mejor comprensión del fenómeno de inactivación ocurrido en cada caso.

4.2.1.3 Tratamientos estadísticos aplicados a los ensayos de contacto directo para los diferentes tratamientos con agentes metálicos

Para todos los casos, se efectuó un tratamiento estadístico de análisis de varianza (ANOVA) de Fisher para determinar la existencia del efecto promotor de la pérdida de viabilidad de los HH. Para los casos inicial y final, así como tiempo anterior y posterior. Dicho resultado fue útil para establecer el tiempo de contacto necesario para promover la inactivación del HH. Es importante señalar que en algunos casos se extendió el tiempo de exposición hasta no encontrar una diferencia significativa en comparación con el resultado previo, aunque ellos no se reportaron en el presente trabajo. Dicho criterio fue establecido para dar por finalizada la prueba.

4.2.1.4 Mecanismos involucrados en de inactivación con Ag, Cu y Fe

Los trabajos referentes a desinfección no muestran imágenes de los efectos producidos por agente en cuestión. Por ello, el presente trabajo emplearlas para mostrar lo ocurrido a los organismos, y así comprender su acción. Los mecanismos involucrados en la PV se infirieron a partir de los cambios morfológicos experimentados por el organismo. Para ello, durante cada ensayo de contacto se efectuó un registro fotográfico por medio de MO y MEB de manera progresiva para toda la prueba. Lo anterior, ya que el primero brinda una visualización hacia el interior del huevo, pudiendo observar algún cambio sufrido en las partes sólidas y líquidas que componen al organismo, mientras que el segundo proporciona una visión estructural de su parte externa.

De manera adicional se emplearon los resultados obtenidos por azul tripán (colorante vital) para identificar algunos cambios de permeabilidad, los cuales fueron caracterizados empleando MO, la cual permite identificar cambios fisiológicos relacionados con la permeabilidad de las cubiertas.

4.2.1.5 Caracterización de los parámetros cinéticos

Consistió en la representación de los valores que describen la pérdida de viabilidad en el ámbito de la desinfección y son característicos de la ecuación empleada. En el presente trabajo, se emplearon los señalados en la ley de Chick, que se muestra en el punto 3.2.9 . Ella considera: la interacción del compuesto con el organismo, su sensibilidad ante él, la importancia del tiempo de contacto, de la dosis, velocidad a la cual se inactivan los organismos de interés o indicadores, máximo poder desinfectante, el efecto gradual sobre el organismo y las concentraciones correspondientes a las cuales ocurren. Su combinación deriva en: la dosis a aplicar y tiempo de contacto necesario, por mencionar algunos.

4.2.2 Construcción del sistema filtrante

El sistema buscó obtener resultados de retención (filtración) e inactivación de HH. La conceptualización, diseño, dimensionamiento y construcción del sistema filtrante, se efectuó en función a los resultados obtenidos de las pruebas experimentales y con base en los criterios planteados en el punto 4.1.3.2. El sistema propuesto puede conformarse por tres partes (suministro, distribución y filtro).

a) Suministro: Se conformó por un tanque de abastecimiento con capacidad de 100 L y que abasteció agua destilada, desionizada y esterilizada, la cual se impulsó hacia el sistema con ayuda de una bomba sumergible con capacidad de desplazamiento de hasta 200 L h⁻¹, asegurando así las condiciones cualitativas de alimentación durante el experimento. De manera adicional se incluyeron válvulas reguladoras de flujo en cada sección para asegurar las características cuantitativas a evaluar, tal como se observa en la Figura 4-7).

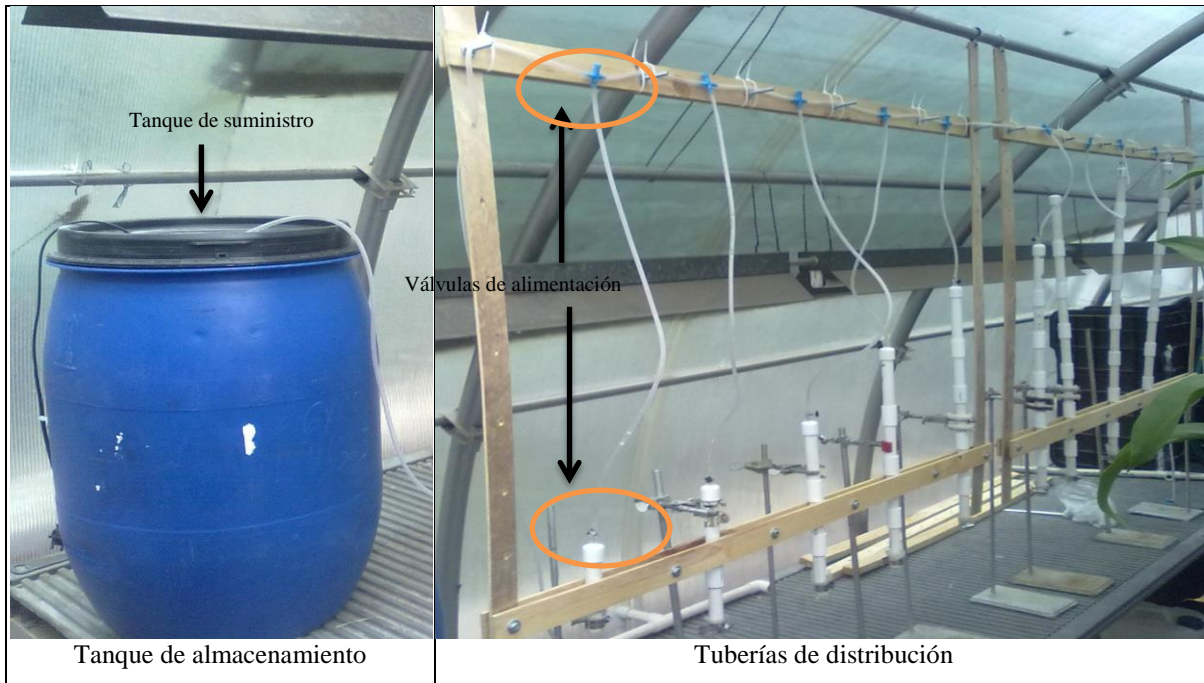


Imagen de elaboración propia
 Figura 4-7. Sistema de suministro

b) Distribución: Se efectuó mediante una tubería de alimentación de ¼ in Ø conectado a cada filtro por medio de la barra de soporte ubicada en la parte superior del sistema experimental. Al final de cada elemento filtrante se implementó una válvula dosificadora de flujo embebida en un tapón de PVC de ½ in Ø. En ella, se realizó una perforación al centro para suministrar el gasto equitativo, así como para disminuir el flujo del líquido por las paredes del filtro. Lo anterior se muestra en la Figura 4-8.

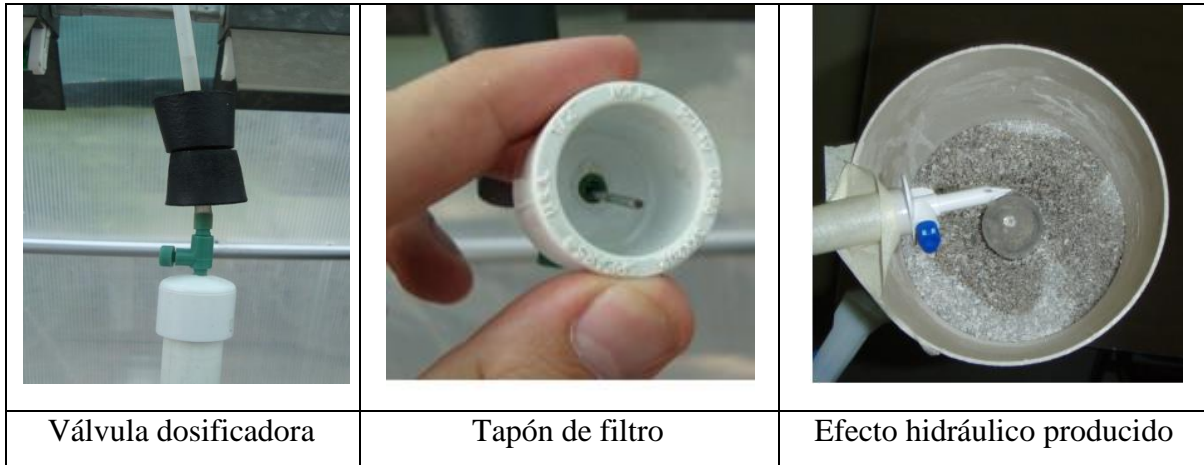


Imagen de elaboración propia
Figura 4-8. Sistema de distribución

c) Filtro: El sistema se conformó por 20 cartuchos de PVC de $\frac{1}{2}$ in \varnothing con diferencia progresiva de 10 cm entre cada uno de ellos, midiendo el primero 10 cm y el último 200 cm. El ensayo se efectuó de manera independiente para cada agregado evaluado (AM_1 y AM_2) (Figura 4-9). La granulometría empleada como medio de empaque en todos los casos fue de 2 mm, tanto AM (1 y 2), como PP y SiO_2 , los cuales sirvieron como testigos.

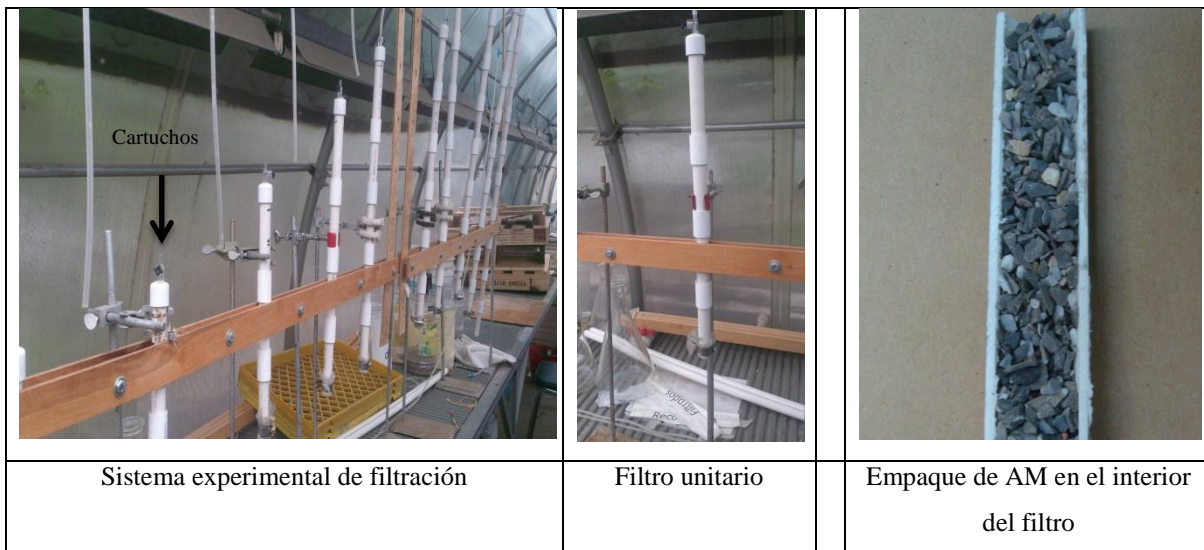


Imagen de elaboración propia
Figura 4-9. Sistema de distribución

4.2.3 Ensayos en columnas empacadas (sistema experimental de filtración)

Se efectuaron dichas pruebas de manera independiente para HAL y HTC para evaluar el efecto filtrante y de PV promovido por cada AM.

4.2.3.1 Operación del sistema filtrante

El filtro se diseñó con el criterio de un tiempo de residencia hidráulico idéntico al Tiempo de contacto (TRH=TC), que simula el peor escenario ocurrido. Dicha condición presenta la menor interacción con el AM. Asimismo, se evaluaron dos condiciones de operación, para determinar la versatilidad y bondad que ofrece la propuesta de filtro, resultando:

a) Operación de diseño (OD): Consistió en el manejo de un gasto de 1.33 L d^{-1} y un TRH de 120 minutos. La alimentación al sistema se efectuó de manera continua durante un lapso de 15 días, correspondiente a la duración total del ensayo, Asimismo, se efectuaron mediciones de flujo volumétrico con una probeta, realizando calibraciones cuando fuera necesario.

b) Operación máxima (OM): Se generó a partir de la apertura completa de las válvulas reguladoras, logrando un gasto de 60.5 L d^{-1} y un TRH de 1.5 min para el AM₁ y 1.9 min para el AM₂. Dicho ensayo tuvo una duración de tres días en alimentación continua.

4.2.3.2 Ensayos de filtración en columnas empacadas

A partir de las dos formas de operación mencionadas en el punto 4.2.3.2, para cada AM, así como para cada organismo, se estimó la retención de los HH en relación a su longitud, así como al tiempo de operación. Con el fin de dar seguimiento puntual se dividió el efluente en “tandas”, correspondientes a los TRH calculados. La longitud de cada cartucho obedeció a la ubicación de cada punto de muestreo, correspondientes a 10 cm, tal como lo señala Auvinet, (1982) y Felder y Rosseau, (1986). El ensayo se efectuó por triplicado para cada longitud (10-200 cm) y en cada caso se calculó como:

$$\% \text{ de Filtración} = ((\text{HH}_{\text{finales}}) \times 100) / \text{HH}_{\text{iniciales}}$$

Dónde:

HH_{finales} = número de huevos de helminto a la salida del caudal

HH_{iniciales} = número de helmintos a la entrada del caudal

A partir de la recuperación de los huevecillos se generó:

- a) Porcentaje de filtración Determinó el porcentaje de retención de HH por longitud de cartucho. Asimismo se generó la ecuación de ajuste que mejor describió el proceso en ambas operaciones.
- b) Perfil de filtrado: Dicha figura consistió en la representación gráfica del seguimiento de cada HH introducido ofrecido por cada longitud del filtro.
- c) Eficiencia de los sistemas filtrantes: Su estimación se efectuó empleando la “Relación β ” (*Multi-pass testing*). La anterior refleja el paso de un sólido a través del filtro, empleando los HH como el sólido en específico. El cálculo se efectuó de la siguiente manera:

$$b = \frac{N_a}{N_b}$$

Dónde:

b: Es la relación beta (β)

N_u = Es el número de partículas mayores de Xmm por unidad de volumen hacia arriba del punto de medición.

N_d =Es el número de partículas mayores de Xmm por unidad de volumen hacia abajo del punto de medición.

Por lo tanto, los filtros con una mayor relación beta retienen mayores partículas y tienen una mayor eficiencia. Dicha medición se representa mediante la relación existente del diámetro de partícula y la relación β para cada sección filtrante. EL cálculo se efectuó con el uso de la siguiente ecuación:

$$Ex = \frac{b_x - 1}{b_x} * 100$$

Dónde:

b= es la relación beta

E_x = Eficiencia de un filtro

4.2.3.3 *Tiempo de contacto y avance promedio*

Constituye uno de los factores que permiten caracterizar a las rocas porosas útiles como lechos filtrantes. Dicho parámetro se encuentra constituido por la interacción entre el material a filtrar, el fluido inmerso en el proceso y el medio filtrante. El desfase ocurrido, se relaciona con las condiciones de operación (Auvinet, 1982) y con el proceso general. No

obstante, en todos los casos se obtiene después del ensayo. Su obtención se efectuó a partir de la profundidad de recuperación de los organismos con respecto al gasto suministrado.

4.2.3.4 Ensayos de inactivación en columnas empacadas

El filtro buscó promover la inactivación de los HH. No obstante dicho fenómeno no se evidencia de manera clara, ya que en ocasiones resulta imposible su determinación de manera directa; a menos que ocurra la destrucción total del organismo. Por ello en cada sección filtrante, se determinó la potencial pérdida de viabilidad del HH a través de las técnicas de LIV y TCE

Su cálculo para LIV se efectuó como se menciona a continuación:

$$\% PV = \frac{N_E - H_{Nlarv}}{N_E} \times 100$$

Dónde:

PV= Pérdida de Viabilidad

N_E = Número total de helmintos por muestra

H_{Nlarv} = Huevos de helminto no larvados

Su cálculo para TCE se efectuó como se menciona a continuación:

$$\% PV = \frac{N_E - H_t}{N_E} \times 100$$

Dónde:

PV= Pérdida de Viabilidad

N_E = Número total de helmintos por muestra

H_t = Huevos teñidos

En ambas pruebas se recuperaron los huevecillos del efluente del sistema, así como del empaque mismo al término el ensayo.

4.2.3.5 Caracterización de la inactivación

A partir de la pérdida de viabilidad y el porcentaje de inactivación ofrecido por cada segmento se determinaron las causas de la pérdida de viabilidad (efectos mecánicos y/o químicos), así como la ecuación de ajuste que mejor describe el proceso en OD y OM.



4.2.3.6 Efecto sinérgico

El presente trabajo pretende demostrar la existencia de inactivación por efectos mecánicos y la influencia del factor químico de los AM. No obstante se desconoce la participación de cada uno de ellos. Por ello, para determinar la influencia de cada fenómeno y/o la existencia de sinergia, se emplearon los resultados obtenidos en los ensayos SA y CA de contacto en matraz entre los AM y los HH, que se detallan en el punto 4.1.2.4.

4.2.3.7 Tiempo de saturación y agotamiento del sistema experimental

Se determinó mediante la cantidad de sólidos retenidos en el sistema filtrante durante el tiempo de operación en cada caso. Posteriormente, con dichos datos se proyectó el tiempo de saturación del sistema empacado para cada agregado.

Por otro lado, el agotamiento de los AM consistió la estimación del tiempo de liberación total de los agentes con capacidad biocida que persigue el presente trabajo. No obstante, existen otros más dentro de la matriz mineral que pudieran incidir en la inactivación del huevecillo. El anterior se determinó mediante un ensayo de disolución del agregado (1 ó 2) en: a) medio ácido: con pH 2.1, generado mediante una solución de H_2SO_4 , b) medio básico: con pH de 11.9, a partir de una solución de KOH y c) neutro: que empleó agua destilada y desionizada (pH cercano a 7). El ensayo consistió en la colocación independiente de 50 y 100 g de cada agregado en matraces por un periodo de tres meses con el medio correspondiente. Los recipientes se colocaron en agitación constante a 60 ± 10 rpm durante tres meses, empleando un agitador orbital de construcción propia. Finalmente se efectuaron extracciones del sólido y del líquido a las 1, 3 y 24 horas, así como, un mes y tres meses para estimar la presencia de los elementos presentes en cada uno de ellos, mediante EFRX, DFRX e ICP-Ms y absorción atómica. A partir de los resultados se calcularon las isothermas y las ecuaciones de estimación para su agotamiento.

d) Curva de operación: Consiste en la representación gráfica de los comportamientos de los filtros de diferente longitud (ΔL) propuestos para cada operación (OD y OM). Ella relaciona, la longitud del lecho contra la inactivación de los HH.

4.2.3.8 *Daño morfológico en ensayos de columnas empacadas para AM₁ y AM₂*

A partir de los ensayos efectuados en columnas empacadas se recuperaron algunos organismos de HTC y HAL con el objeto de identificar y caracterizar los principales cambios ocurridos en los HH. Para ello se emplearon MO y MEB.

4.2.4 *Ensayos de viabilidad de los AM para ser considerado como agente desinfectante*

Para ello, se tomaron en cuenta las características mencionadas en Metcalf, (1996), donde se incluyen algunas relacionadas con factores físicos, químicos, biológicos y de operación. Con el objeto de caracterizar cada una de ellas se implementaron ensayos que pretenden caracterizarlas, las cuales se mencionan a continuación.

Solubilidad

Constituye parte del éxito de un desinfectante y se encuentra relacionada con la capacidad de acción sobre el organismo objetivo (Metcalf, 1996). En particular, una solubilidad adecuada se relaciona con su efectividad y el tiempo de vida del AM. Para ello, se tomaron en cuenta los resultados obtenidos en el punto 4.2.3.7.

Capacidad de disolución del AM

Se efectuó una prueba de disolución en matraz con el objeto de conocer los posibles elementos liberados del AM al líquido. Para ello, se tomaron en cuenta los análisis efectuados en el punto 4.2.3.7, efectuando un análisis comparativo entre el contenido inicial del agregado y el existente al final del ensayo.

Estabilidad

Se relaciona directamente con la acción del poder germicida que posee el agente en el tiempo. Es deseable la persistencia de una concentración razonable (que no presente un peligro para otros organismos) y eventualmente que promueva protección residual. Para ello, fueron determinadas la velocidad de liberación de los agentes (Ag, Cu y Fe)

Modificación de pH

Un mecanismo de inactivación de organismos se basa en el cambio de las condiciones de acidez o alcalinidad en el medio (Jiménez, 2007). La prueba pretendió evaluar la influencia



del agregado sobre las condiciones del medio, así como las características del vertido en el ambiente. Para ello, se efectuaron ensayos independientes en matraces, donde se colocó en cada matraz 100 g de AM₁ o del AM₂. Se planteó evaluar tres diferentes escenarios: a) ADDE b) solución ácida conformada por H₂SO₄ pH=2.1 y c) solución básica conformada por NaOH pH=11.9. En todos los casos, bajo agitación constante (60 rpm), llevando a cabo el registro de pH con un potenciómetro marca Oakton SR368 durante todo el ensayo. El experimento se dio por terminado hasta llegar a la estabilización por repetición de resultados en un periodo de tiempo. Se obtuvo en cada caso el comportamiento gráfico, así como los valores de tendencia central y dispersión que lo describen.

No colorante

Las propiedades organolépticas constituyen un factor distintivo de calidad. En particular, la percepción de color en el agua disminuye su valor económico (urbanístico, turístico y de explotación). No obstante es común encontrar en fuentes naturales, la presencia de ligeros tonos rojizos, pardos, amarillos o verdes, debido principalmente a los compuestos húmicos, férricos o los pigmentos orgánicos brindados por los microorganismos presentes. Para ello, se efectuaron las estimaciones por medio de un nefelómetro Sartorius DFI2014 a se determinó dicha característica.

Seguro al manejo y transporte

Ambos rubros son relevantes, e influyen en el costo y aplicabilidad de una tecnología. Se determinó con base en los resultados obtenidos de los ensayos mencionados en el punto 4.2.4.

Económicamente viable

Actualmente una limitante que presenta una tecnología se constituye por el factor económico. Por ello, se estimó el costo que implica la aplicación del sistema con algunos costos asociados.

Efectivo contra los organismos objetivo

Al seleccionar un desinfectante es importante considerar su forma de acción sobre el organismo objetivo, tal como se señala en Metcalf, (1996). El presente trabajo solo consideró la efectividad obtenida contra HH en los ensayos de exposición directa y los

efectuados en el sistema de filtración, los cuales se refuerzan mediante una memoria fotográfica obtenida con ayuda de microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica, así como pruebas de incubación *in vitro* y tinción por exclusión.

Toxicidad ambiental

La legislación ambiental ha establecido ciertos parámetros a cumplir con el objeto de brindar protección ambiental. Uno de ellos consiste en la implementaron bioensayos, para evaluar la sensibilidad de algunos organismos (no objetivo) ante un agente químico, Se implementó la Prueba 208: Plantas terrestres. Lineamientos para probar compuestos químicos, de la OCDE, la cual considera el efecto de un agente sobre la germinación y crecimiento en especies sensibles. En ella se propone evaluar una especie ante el agente en cuestión, refiriendo el uso de jitomate o lechuga o trébol, En el presente trabajo se efectuó el procedimiento de manera independiente para cada especie, empleando: *Solanum lycopersicum*, *Latuca sativa* y *Trifolium gen. sp.*, respectivamente. Para determinar la interacción de cada AM con el componente vegetal se implementaron dos diferentes ensayos:

a) Germinación

Se empleó para determinar el impacto de los agregados sobre la potencial viabilidad de las especies antes mencionadas. Para ello, se prepararon soluciones con diferente contenido de AM (1 ó 2) al 50%, saturación y sobresaturación, así como un testigo, empleando ADDE para obtener cada condición. Se colocaron 15 semillas de la especie a evaluar sobre charolas circulares de 30 cm de diámetro cubiertas de papel filtro en su interior. Los recipientes se colocaron en incubación, a temperatura constante de 25 °C y con iluminación artificial provista por una lámpara de luz UV a una longitud de onda 450 nm para promover su germinación (Hernández, 2010). Se adicionó cada dos días 60 mL de la solución correspondiente. Finalmente se registró el porcentaje de germinación (definido como la apertura de la semilla) de manera individual, efectuando una prueba estadística de ANOVA en cada caso.

b) De crecimiento

Buscó establecer la influencia de los AM (1 o 2) en el desarrollo diferenciado de las plantas mencionadas anteriormente, mediante la medición de la talla total. Para ello se colocaron las cinco semillas en pozos de siembra, con medio sólido: Tierra Negra (TN) (*sphagnum*



peat moss) y AM₁ o AM₂, según las siguientes proporciones en cada caso: (0% AM y 100% TN; 20% AM y 80% TN; 40% AM y 60% TN; 60% AM y 40% TN; 20% AM y 80% TN; 0% AM y 100% TN). Adicionalmente, se efectuó el mismo procedimiento y proporciones, sustituyendo la presencia del AM por Perlas Plásticas (PP) o cuarzo (SiO₂), para contrastar el contenido adicional que presentan los AM sobre el cuarzo, así como un medio inerte, respectivamente. Todos los casos se mantuvieron a temperatura constante de 25 °C en ausencia de luz natural, empleando iluminación artificial suministrada por una lámpara de luz UV a 450 nm. La alimentación se efectuó con la aspersión de 5 mL de ADDE de forma manual a cada pozo de ensayo. Finalmente se evaluaron los porcentajes de germinación y la talla obtenida por cada espécimen, estableciendo el siguiente modelo estadístico interactivo.

$$Y_{ijk} = \mu + AM_i + P_j + (AMP)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

$$i=1, 2, 3, \dots, 6$$

$$j= 1, 2, 3$$

$$k= 1, 2, 3$$

Dónde:

i= (% de AM); j= Planta; k= Repeticiones; μ = media general.

Finalmente se calcularon las T de Student, prueba de Tukey y una de ANOVA.

Estableciendo para AM₁; AM₂; SiO₂; PP hipótesis particulares.

$$H_0: (AMP)_{ij} = 0$$

$$H_1: (AMP)_{ij} \neq 0$$

Influencia sobre la temperatura

La ley de Aguas Nacionales considera como contaminación a la introducción de condiciones al agua de modo directo o indirecto, dentro de las cuales se incluye la modificación de la temperatura. Por ello se realizaron mediciones de cada AM, al contacto en cada caso con agua ácida, con pH=7 o básica (preparadas como se menciona en el punto 4.2.3.7, registrando los resultados obtenidos en cada caso.

Normatividad oficial vigente

Se efectuó un análisis elemental que pudiera aplicar para la instalación y operación del filtro en materia de su descarga, ya que el AM se encuentra conformado por diferentes elementos, donde algunos de ellos se encuentran normados. Para ello, se generó una tabla con que contiene el concepto por elemento considerando: las NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1997, NOM-127-SSA-1994 y NOM-052-SEMARNAT-2005. La anterior, señala “Cumple”, “No cumple” o “No normado” para cada caso. Los valores incluidos son los del AM acondicionado, así como los generados en las pruebas en disolución en las condiciones ácidas, neutras y básicas señaladas en el punto 4.7.5.2 en ambos casos (sólido y el líquido).

Inflamable

Para ello se tomó lo señalado por la NOM-052-SEMARNAT-2005 para el caso del agua proveniente del filtrado, se menciona: “Es un líquido o una mezcla de líquidos que contienen sólidos en solución o suspensión que tiene un punto de inflamación inferior a 60.5 °C, medido en copa cerrada”, mientras que, en el caso del AM contenido en el filtro se menciona que; “se considera como inflamable cuando es capaz de provocar fuego por fricción, a 25 °C”, aplicando en cada caso el experimento correspondiente y registrando el resultado como “positivo” o “negativo”.

5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Obtención y caracterización de los AM

Para la extracción de los AM (1 y 2) se seleccionaron dos minas de explotación metálica con coordenadas aproximadas $19^{\circ} 18' 15.69''$ N y $99^{\circ} 9' 29.59''$. Las anteriores se ubicaron en la localidad de Vetagrande, Zacatecas (Figura 5-1). Su actividad principal se centra en plata, aunque también se comercializan el cobre, hierro y silicio. En conjunto dichos elementos constituyen parte fundamental del presente trabajo.

El sitio específico de recolección se ubicó en una zona lejana a la veta principal, donde el contenido no resulta redituable para su recuperación. El material no se comercializa, explota o colecta por no poseer uso conocido.



AM= Agregado mineral
Imagen de elaboración propia, a partir de Google Maps
Figura 5-1. Zona de extracción de los AM

La caracterización física se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMBE) de la Facultad de Química de la UNAM, mientras que la fisicoquímica se efectuó con el

apoyo de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la misma institución. Los resultados obtenidos se señalan a continuación.

5.1.1 Caracterización física

La caracterización de los AM (Tabla 5-1) obtenida a través de la metodología señalada en el ANEXO II evidencia diferencias menores al 10% para todos los casos. Sin embargo, un análisis estadístico de ANOVA señaló que éstas son significativamente diferentes (empleando un $\alpha=0.05$) en cada caso. Según Auvinet, (1982), las diferencias se relacionan directamente con la composición y geomorfología del material. Estas tienen implicaciones en comportamientos hidráulicos, peso del sistema empacado, mojado, longitud de recorrido, tiempo de residencia hidráulica e interacción con sitios activos, por mencionar algunos.

Tabla 5-1. Propiedades físicas de los medios sólidos empleados.

	ρ [g cm ⁻³]		ρ_{ap} [g cm ⁻³]		ε (%)		A_{max} (%)		A_{prom} (%)		κ [m ³ m ⁻² d ⁻¹]	
	\bar{X}	$\pm\sigma$	\bar{X}	$\pm\sigma$	\bar{X}	$\pm\sigma$	\bar{X}	$\pm\sigma$	\bar{X}	$\pm\sigma$	\bar{X}	$\pm\sigma$
AM ₁	1.67	0.13	1.12	0.09	32.86	*	14.07	2.46	13.85	0.41	15.3	0.2
AM ₂	1.78	0.05	1.17	0.07	34.05	*	11.32	3.91	11.07	0.28	15.8	0.1
AM ₃	2.18	0.17	1.28	0.01	40.88	*	26.49	3.67	15.33	3.67	15.4	0.4
PP	1.14	0.02	1.03	0.02	9.38	*	0.02	9.38	5.63	0.02	14.6	0.5
SiO ₂	2.60	0.10	1.40	0.17	46.37	*	13.26	3.75	12.23	0.86	15.1	0.2

* =No calculado; para fines prácticos se supone que es la media de los valores.

PP= Perlas plásticas; AM_(1,2 y 3)= Agregados minerales SiO₂= Cuarzo

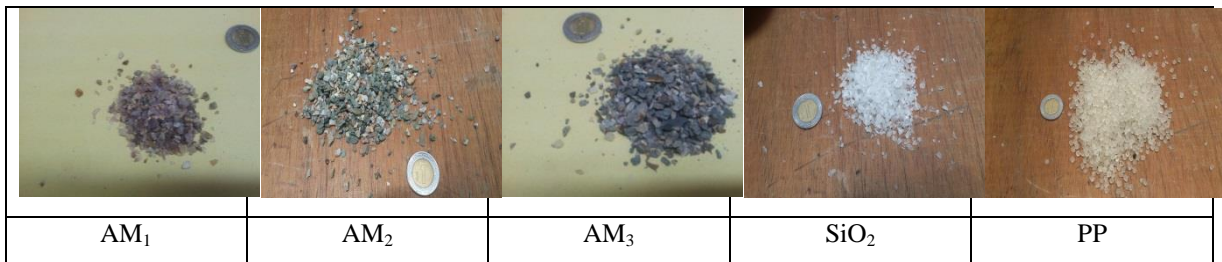
Caracterización del AM₃ tomada de Magaña-López, (2010)

Los AM (1 y 2) muestran una densidad real (ρ) de 1.67 y 1.78 g cm⁻³, respectivamente. En comparación a los reportados en Magaña-López (2010), que señalan 2.18 y 2.43 g cm⁻³ para empaques similares. No obstante, algunos medios empleados en filtración lenta, como: arena (≈ 1.65 g cm⁻³), antracita (≈ 1.80 g cm⁻³), caliza (≈ 2.68 g cm⁻³), grava (≈ 3.11 g cm⁻³) reportan valores en el mismo intervalo (Turbidex, 2010). Dicha propiedad indica que los filtros empacados con los agregados (1 y 2) tendrían un peso similar a los antes mencionados.

Los valores de porosidad (ε) obtenidos para los AM₁ y AM₂ resultaron de 32 y 34%, mientras que los de PP y SiO₂, fueron de 9.38 y 46.37%. Crites y Tchobanoglous, (2000),

señalan que porcentajes entre 30-50% favorecen el contacto con los fluidos, lo cual contribuye con el fundamento promotor de inactivación propuesto en el presente trabajo. Por ello, los valores resultantes para PP y SiO₂ los perfilan como candidatos para ser considerados como testigos para evidenciar el efecto mecánico y químico, respectivamente. La permeabilidad registrada en los agregados se ubicó entre 11-15%, resultando ser similar a la observada en algunos limos y arenas, tal como se señala en CEPIS, (2008) y Turbidex, (2010). Lo anterior es consecuencia del alto contenido cristalino, poca porosidad y aceptación de agua en el proceso geomorfológico (Meléndez y Fuster, 2003).

El análisis de esfericidad efectuado a los AM₁, AM₂, SiO₂ y PP resultó en todos los casos de 0.86. No obstante, una observación más detallada muestra diferencia entre ellos (Figura 5-2). En ACE (2010) menciona, que para cálculos en filtración es conveniente emplear “factores de esfericidad”. Sin embargo, para el caso particular de los agregados no reflejan específicamente de las características independientes y particulares del material a emplear.



PP= Perlas Plásticas; AM_(1,2)= Agregados minerales SiO₂= Cuarzo

Imagen de elaboración propia
 Figura 5-2. Medios de empaque

La conductividad hidráulica evaluada para ambos agregados fue de 15.3 ± 0.2 y $15.8 \pm 0.1 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. La Tabla 5-2 muestra que los valores registrados son correspondientes a una arena y grava mezclada ($\approx 16 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), que implica un grado de permeabilidad elevada, un flujo activo y menor azolvamiento del sistema de filtración.

Tabla 5-2. Valores de k para diferentes texturas de suelos empleados como medios de empaque en filtración lenta.

Tipo de empaque	(κ) m ³ m ⁻² d ⁻¹	Grado de conductividad
Grava limpia	18	Elevada
Arena y grava mezclada	16	Elevada
Arena media lavada	13	Elevada
Arena fina	3	Media
Arena limosa	0.6	Media
Franco arcillo arenosa	0.5	Baja
Franco arcillo limosa	0.15	Baja
Franco arcillosa	0.21	Baja
Arcillo-arenoso	0.19	Muy baja
Arcillo-limoso	0.09	Muy baja
Limo	0.06	Muy baja
Arcilla	0.01	Impermeable

A partir de Clapp y Homberger, (1978) y Gabriels et al., (2014)

5.1.2 Caracterización fisicoquímica

Los resultados obtenidos para ambos agregados se señalan a continuación.

5.1.2.1 Análisis cualitativo

Las EDRX determinaron cualitativamente las especies que componen a los AM (1 y 2). Una curva acumulativa se efectuó para establecer número total de análisis a realizar. EL AM₁ se completó con cuatro análisis, mientras que el AM₂ se cumplió con cinco difracciones efectuadas a una muestra representativa bajo el fundamento de método de cuarteo en cada caso. Los minerales identificados que componen a cada agregado fueron de ocho y cinco, respectivamente (Tabla 5-3). En particular, solo dos de éstos (Kaolinita y cuarzo) se encuentran en ambos, así como en el AM₃, caracterizado en Magaña-López, (2010). Asimismo, se evidenció una composición mayoritaria de silicatos, seguida de minerales carbonatados, nitrados y metálicos, tal como se señala en el ANEXO IV la Figura 13-1 y Figura 13-2.

Tabla 5-3. Tipos de roca que componen a los AM a partir de Difracción de Fluorescencia por Rayos X

Tipo de mineral	Formula química	AM ₁	AM ₂	AM ₃
Hematita	Fe ₂ O ₃			X
Sanidinita	K(Si ₃ Al) ₆ (K ₂ Na)			X
Cuarzo	SiO ₂	X	X	X
Montmorillonita	Mg ₅ Si ₈ O ₂₀ (OH) ₂ (OH ₂) ₄ ·4H ₂ O ó (Ca, Na, H) (Al, Mg, Fe, Zn) 2(Si, Al) 4O ₁₀ (OH) ₂ - 4H ₂ O			X
Calcita	CaCO ₃			X
Nimita	(NiMgAl)2(SiAl) ₄ O ₁₀ (OH) ₈ (NiMgFe ²⁺) ₅ Al(AlSi ₃) ₀ ₁₀ (OH) ₈			X
Ortoclasa	KAlSi ₃ O ₈	X		
Kaolinita	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	X	X	X
Pirita	FeS ₂		X	
Clinoclorita-Serpentina	Mg ₅ Al.(Si o Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₈		X	
Dolomita	CaMg(CO ₃) ₂		X	
Albita	(Na _{0,98} Ca _{0,02})(Al _{1,02} Si _{2,98} O ₈)	X		

AM_(1,2 y 3)= Agregados minerales

Tabla de elaboración propia

Las especies mineralógicas señaladas anteriormente evidencian un origen geomorfológico volcánico, intrusivo con rápido enfriamiento e influenciado por intemperismo (Meléndez y Fuster, 2003). Mengelle-López et al., (2011) mencionan, que la zona minera de Zacatecas muestra evidencias de mineralización de metales preciosos (Au y Ag), así como la presencia de depósitos de (Al, Pb, Fe, Zn y Cu) con intensa silificación. Lo anterior es concordante con el análisis de DFRX. Dichos procesos contribuyen a la diferenciación del yacimiento, derivando en la presencia de minerales, tales como: Montmorillonita, Hematita Pyroclorita, Sanidinita, Barita (BaSO₄), Caolinita (Al₂Si₂O₅(OH)₄), Pyrofilita (Al₂Si₄O₁₀(OH)₂), Sericita (KAl₂(Si₃Al)O₁₀(OH,F)₂) y talco (3MgO₄SiO₂H₂O). Su presencia apunta a que la selección de puntos de extracción se efectuó en sitios ya diferenciados dentro de la mina. No obstante, los últimos cuatro minerales no han sido identificados dentro de la muestra, lo cual no descarta su posible aparición dentro de la mina.

5.1.2.2 Análisis cuantitativo

La caracterización cuantitativa efectuada a los AM₁ y AM₂ por EDRX y DFRX contribuyeron a determinar sus elementos mayores y menores (Tabla 5-4). El análisis reflejó mayoritariamente la presencia de sílice (en forma de SiO₂), con un promedio de 944±472 y 649±477 g kg⁻¹, respectivamente (ANEXO IV). De manera complementaria se

registraron óxidos de: Ti, Al, Fe, Cu, Mn, Mg, Ca, Na, donde los primeros cuatro han demostrado poseer propiedades biocidas (Leal et al., 2006 y Rodríguez. 2009). En ambos lotes se registraron TiO_2 con 106 ± 58 y 290 ± 48 , Fe_2O_3 con 1706 ± 102 y 10860 ± 75 y Cu 737 ± 606 y 8246 ± 747 mg kg^{-1} (Figura 13-3 y Figura 13-4). Los resultados estadísticos evidencian en ambos casos un agregado heterogéneo, con zonas ricas en metales, en comparación con el resto de los componentes.

Tabla 5-4. Tipos de roca que componen a los AM a partir de EDRX

Compuestos	AM ₁		AM ₂	
	x	+S	x	+S
SiO ₂	94.48	47.28	64.98	47.70
TiO ₂	1.06	5.8	2.90	4.8
Al ₂ O ₃	1.94	1.23	9.21	8.34
Fe ₂ O ₃	1.70	1.02	10.86	7.52
MnO	0.26	0.21	2.05	1.11
MgO	0.46	0.28	5.71	2.12
CaO	0.44	0.42	5.70	1.82
Na ₂ O	0.70	0.21	1.12	1.15
K ₂ O	0.65	0.46	1.62	2.73
P ₂ O ₅	0.10	0.5	7.10	5.01

Tabla de elaboración propia

X= media; S= desviación estándar; AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

La EFRX elemental para ambos agregados registró: Ag, Ti, Cu, Pb, Th, Co, Cr, V, Mb, Zr, Y Sr, Ba y Rb. La caracterización final cualitativa generada se conformó por 32 y 25 elementos, para el AM₁ y AM₂, respectivamente. La curva acumulativa de especies para ambos AM no registró cambios durante los últimos dos análisis, dando con ello, por terminada la prueba. Sin embargo, la confluencia geomorfológica brinda la posibilidad de encontrar wollastonita (CaSiO_3), ónix (SiO_2) y compuestos con bismuto, mercurio, antimonio, cobre y cadmio, reportados para el yacimiento en Mengelle-López et al., (2011). Cuantitativamente (mg de compuesto kg^{-1} de AM), mediante la difracción de trazas se caracterizaron: Cu (737 ± 606 y 8246 ± 747), Zn (255 ± 265 y 995 ± 128), Pb (245 ± 236 y 947 ± 100) y Ag (815 ± 10 y 7 ± 10 mg kg^{-1}). Particularmente, el valor registrado para la plata no es concordante con el caracterizado en la zona (128 mg kg^{-1}). Lo anterior se relaciona con la disposición usual del metal en sitios puntuales. No obstante, la nimita (Ni, Mg, y Fe)

y montomorillonita (Al, Mg, Fe y Zn) registran valores similares detectados en la caracterización elemental mayor (Tabla 5-5).

Tabla 5-5 Elementos que componen a los AM a partir de Difracción de Rayos X

Adicionales (mg kg ⁻¹)	AM ₁	AM ₁	AM ₂	AM ₂
	x	±s	x	±s
Rb	87.67	63.87	97.00	57.28
Sr	2.00	1.73	5.67	0.82
Ba	9.67	7.63	52.67	3.99
Y	0.00	0.82	9.67	0.50
Zr	41.00	23.11	79.50	18.38
Nb	3.67	52.93	74.67	22.90
V	15.67	10.28	7.00	10.47
Cr	11.67	6.08	32.33	6.17
Ag	26.67	13.39	36.67	13.62
Co	26.67	17.59	65.33	16.88
Ni	560.33	372.27	255	236.93
Cu	32.67	79.71	113.50	26.09
Zn	245.67	236.82	947	1009
Th	87.67	63.87	97.00	57.28
Pb	2.00	1.73	5.67	0.82

Tabla de elaboración propia

X= media S= desviación estándar; AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

5.1.2.3 Prueba de asociación de Olmstead-Tukey

A través de ella se determinó la importancia relativa con respecto a la abundancia y prevalencia de cada elemento. El AM₁ reportó para el cuadrante I (alta prevalencia y abundancia), Si, Al, Fe, S y Cu. El sector determina la apariencia parda-rojiza-púrpura general del agregado. En el II se ubican las de menor cantidad, pero con alta representatividad, tal es el caso de Ni, Ag, V, Co, Au y Zn que le brindan al metal tintes metálicos y que son explotables por la mina. En el siguiente (III) se ubican los considerados como trazas, encontrando Zr, Pb, Y, Rb, Nb, Cr, Ba y Mg, mientras que en el IV con alta prevalencia y poca abundancia se ubican Ti, Mg, K, P, donde el primero posee actividad biocida contra HH (Leal et al., 2006). Lo anterior puede se observa en la Figura 5-3 y en el ANEXO VI.



En comparación ambos AM (1 y 2) muestran una similitud de 89% en cuanto a los elementos que los componen (36 y 32), En comparación con el reportado en Magaña-López (2010), donde existe un 44 y 47%, respectivamente, así como el contenido de SiO_2 . Sin embargo, en cuestión a la ubicación por cuadrante de cada uno de ellos existe una concordancia del 75% (AM 1 y 2). Lo anterior apunta a la correspondencia de los puntos de extracción en el yacimiento (en ambos casos). No obstante, las diferencias derivan en cambios de apariencia, así como de contenido cuantitativo, determinado principalmente por los elementos ubicados en el cuadrante I y II (Si, Al, Mg, K, Fe y Cu). Los elementos perseguidos por el presente trabajo (Ag, Fe y Cu) muestran para las dos primeras condiciones similares de prevalencia y abundancia en ambos AM, mientras que el Cu si presenta un cambio de ubicación, del cuadrante I al II, respectivamente (Tabla 5-6). Su combinación es factor importante al tener influencia dentro de la experimentación.

Tabla 5-6. Cuadro comparativo de cuadrantes de AM₁ y AM₂

Elemento	AM ₁	AM ₂
Ag	II	II
Al	I	I
As	III	III
Au	II	II
Ba	III	III
Br *	ND	II
C	II	II
Ca	II	II
Co	II	II
Cr	III	III
Cu*	I	III
Fe	I	I
Ge*	ND	II
K *	IV	I
Li*	ND	II
Mg*	IV	I
Mn	II	II
N	II	II
Nb	III	III
Ni	II	II
O	I	I
P	IV	IV
Pb	III	III
Pd *	ND	II
b	III	III
S	I	I
Si	I	I
Sr	III	III
Th	II	II
Ti	IV	IV
V *	II	IV
Y	III	III
Zn	II	II
Zr	III	III

ND= No determinado; *= Diferente; AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

Tabla de elaboración propia

5.1.2.4 Cuantificación y caracterización de sulfuros

La prueba de flotación efectuada a los AM (1 y 2) recobró un total de 9.7 y 105.7 g de material, lo cual corresponde a un 0.5 y 5% del material, respectivamente. El análisis de difracción de polvos para los agregados caracterizó dicha recuperación como Sulfuro de hierro en ambos casos. El contenido de elementos sulfurados resulta tóxico al entrar en

contacto con el agua, no obstante su contenido es menor al 5%. En CSA (2011) se menciona, cierta toxicidad en el humano a partir de dosis de 500 ppm, lo cual implica el efecto biocida. Por otro lado, es importante determinar la relevancia de la regulación de dicho contenido en filtros empacados con AM. Lo anterior, ya que su presencia en concentraciones que no representen problema podría orientar el impacto hacia los organismos objetivo.

El alto contenido de sulfuros obtenido mediante el ensayo de flotación indica al AM₁ como una mejor opción en comparación con el AM₂. Sin embargo, el principal inconveniente de la prueba es el tamaño de muestra, el cual no resultaría representativo para la construcción de filtros a mayor escala. No obstante, una alternativa para controlar dicho problema se constituiría por un proceso previo de desulfuración.

5.1.3 Ensayos de viabilidad de los lotes (HTC y HAL)

Los ensayos efectuados sobre huevos de *T. canis* y *A. lumbricoides* como modelo experimental, obtuvo los resultados que se mencionan a continuación.

5.1.3.1 Pruebas de viabilidad en lote

Se realizaron pruebas de viabilidad a 11 lotes diferentes de huevos de *A. lumbricoides* (HAL) y *T. canis* (HTC), descartando diez de ellos por presentar un larvado menor al 80%, según las pruebas *in vitro* (Oaks y Kayes, 1979), así como por medio de tinción por exclusión (De Victorica y Galván, 2003). La baja viabilidad sugiere ser consecuencia de las condiciones de obtención, manejo, estado conservación, así como por factores inherentes a la naturaleza del organismo, los cuales impactan directamente en la viabilidad de los HH (Tabla 5-7) y sugiere, que ambientalmente la viabilidad de un huevo es limitada.

Tabla 5-7. Foto-micrográficas contrastivas de las técnicas de estimación de viabilidad empleadas


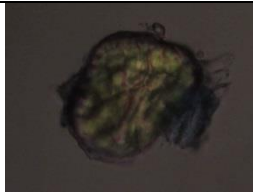
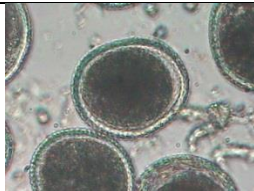
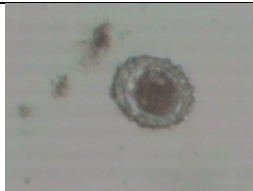


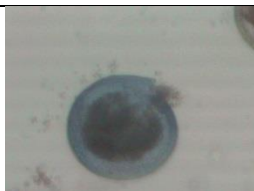
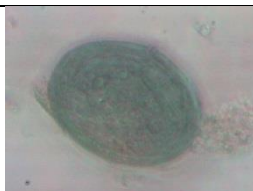
	Viabilidad potencial	<i>T. canis</i>	<i>A. lumbricoides</i>
Incubación <i>in vitro</i>	si		
	no		
Tinción diferencial	si		
	no		

Tabla de elaboración propia

El lote restante de cada especie logró cumplir los estándares preestablecidos de viabilidad superior al 75% para las pruebas efectuadas. En *T. canis* se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 81 ± 7 y $70 \pm 12\%$, mientras que para *A. lumbricoides* fue de 66 ± 8 y $78 \pm 9\%$, mediante los ensayos de incubación y tinción, respectivamente. Dichos valores referencian una clara diferencia de resultados entre ellas. No obstante, De Victorica y Galván (2003) señalan, que ambos procedimientos son igualmente válidos.

Los valores obtenidos para los testigos evidencian una viabilidad instantánea, que no considera el tipo de estrategia de reproducción (de tipo "R"), que siguen los organismos de prueba caracterizados por tener alta progenie y baja viabilidad (Begon et al., 1990). De manera adicional, los helmintos buscan una segregación espacio-temporal que contribuye a una maduración diferenciada. Por otro lado, tampoco considera la estructura de los HH, los

cuales presentan de manera natural fisuras que cumplen la función de osmoregulación, donde la penetración de colorantes (fijadores) automáticamente inactiva al organismo.

5.1.3.2 Ensayos de selección de condiciones de incubación

Los medios de incubación para la obtención del estado larvario referidos en la literatura por Oaks y Kayes (1979), NOM-004-SEMARNAT-2002, De Victorica y Galván (2003), Rojas et al., (2004) y Maya et al., (2012), por mencionar algunos refieren diversas condiciones. Los resultados de larvado *in vitro* para *T. canis* y *A. lumbricoides* resultaron positivos en todos los medios propuestos. El H₂SO₄, de forma independiente, así como en combinación con formol y solución salina, resultaron ser los más eficientes, al registrar la mayor porcentaje de organismos larvados. Sin embargo, a través de una prueba estadística de ANOVA con $\alpha=0.05$ se encontró que existe una diferencia significativa entre ellos.

Ambas especies presentaron estadios larvarios en todos los medios y condiciones evaluadas. El intervalo de valores obtenidos para *T. canis* fue desde 6±11%, hasta 54±11%, mientras que *A. lumbricoides* registró 3±5%, hasta un 49±0.4% como máximo. El medio de incubación que presentó los mejores resultados fue H₂SO₄ y N=0.1 con porcentajes superiores al 35% en todos los casos, tal como se señala en Oaks y Kayes (1979) y que se retoma en la NOM-004-SEMARNAT-2002. Por otro lado, el menor valor de incubación ocurrió en agua y solución salina con resultados cercanos al 20%. Sin embargo, *A. lumbricoides* obtuvo los mejores resultados de viabilidad con 49%, empleando como medio de incubación formol al 2%, seguido de H₂SO₄ y N=0.1 con 44%. Lo anterior apunta al rechazo de H₀ para los medios de incubación, sugiriendo la influencia de éstos en la obtención de la larva móvil.

Los resultados con respecto al medio, sugieren para ambas especies que el mayor desarrollo obtenido en los ensayos en H₂SO₄ obedece a la simulación de las condiciones de acidez de los nichos acuosos donde se desarrollan HAL y HTC. Por otro lado, el solución salina (0.85%) simula el medio fisiológico presente en los hospederos, que igualmente favorece la presencia de estadios larvarios. No obstante, los otros medios empleados (formol, agua corriente y destilada) también evidenciaron ser medios promotores de la viabilidad, aunque en menor grado (Figura 5-5)

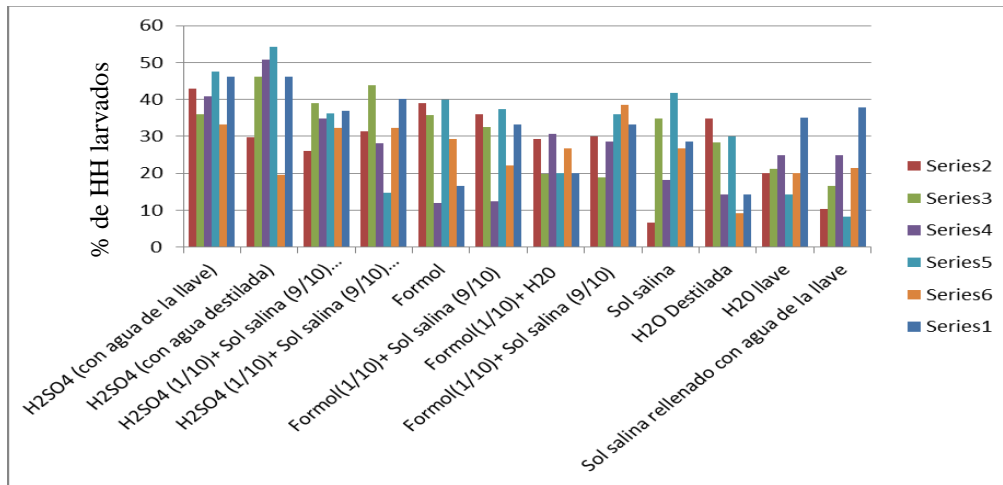
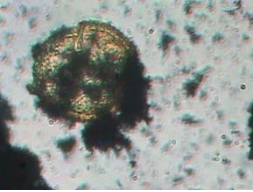
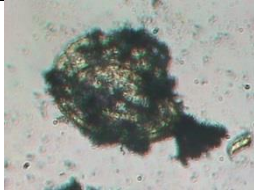

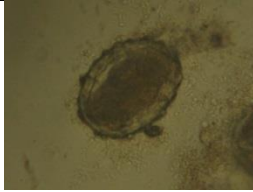


Figura de elaboración propia
Figura 5-5. Ensayos de larvado de HH en diferentes medios de incubación

Es importante puntualizar, que los ensayos con agua destilada, corriente o solución salina fisiológica evidenciaron una diferencia de hasta 45 y 46%, para HTC y HAL en comparación con los medios ácidos comúnmente empleados (H_2SO_4 y Formol). Lo anterior, ya que dichas condiciones no simulan en conjunto el medio natural de desarrollo de los HH (Figura 5-6). Por otro lado, la exposición total con el ambiente favorece la proliferación de organismos ajenos al experimento. La combinación de éstos sugiere una influencia en la viabilidad de los organismos.

			
Solución salina fisiológica	Agua corriente	Solución salina fisiológica	Agua corriente
HTC	HTC	HAL	HAL

HTC= Huevos de *T. canis*, HAL= Huevos de *A. lumbricoides*

Figura de elaboración propia
Figura 5-6. HH incubados en condiciones de aireación.

De igual manera, las condiciones de incubación (aireación, agitación y luz) reportaron una diferencia significativa (mediante un análisis de ANOVA con un $\alpha= 0.05$). Los ensayos

sometidos a aireación eventual se favorecieron entre un 4% y un 12% para un ambiente controlado (26 ± 0.5 °C). Sin embargo el cuarto caliente empleado para incubar, que oscilo 26 ± 2 °C, presentó variación ente los porcentajes de viabilidad registrados (de entre 18 ± 4 hasta $46\pm 2\%$). No obstante, que Oaks y Kayes (1979), NOM-004-SEMARNAT-2002 las señalan como las condiciones óptimas de incubación. Lo anterior sugiere relación de especificidad entre el hospedero y el helminto. Ambas especies expuestas SA registraron entre 12 y 56% y CA 4-48% para HTC, Por otro lado los HAL resultaron entre 3-49% y 3-44%, respectivamente. Los resultados concuerdan con las condiciones prevalentes en los nichos ocupados por los HH, que son a ambientes ácidos, de oscuridad, con oxigenación limitada y agitación (Figura 5-7 y Figura 5-8)

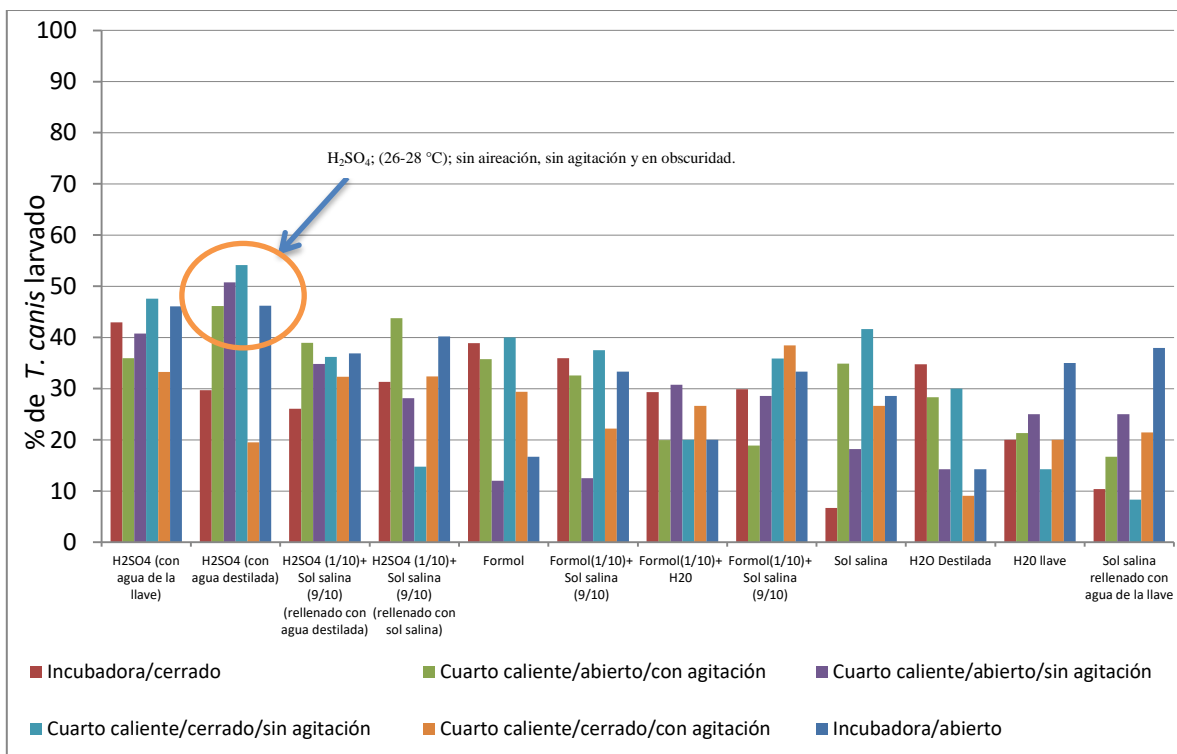


Figura de elaboración propia
Figura 5-7. Efecto de diferentes condiciones sobre la obtención de la larva móvil en *T. canis*

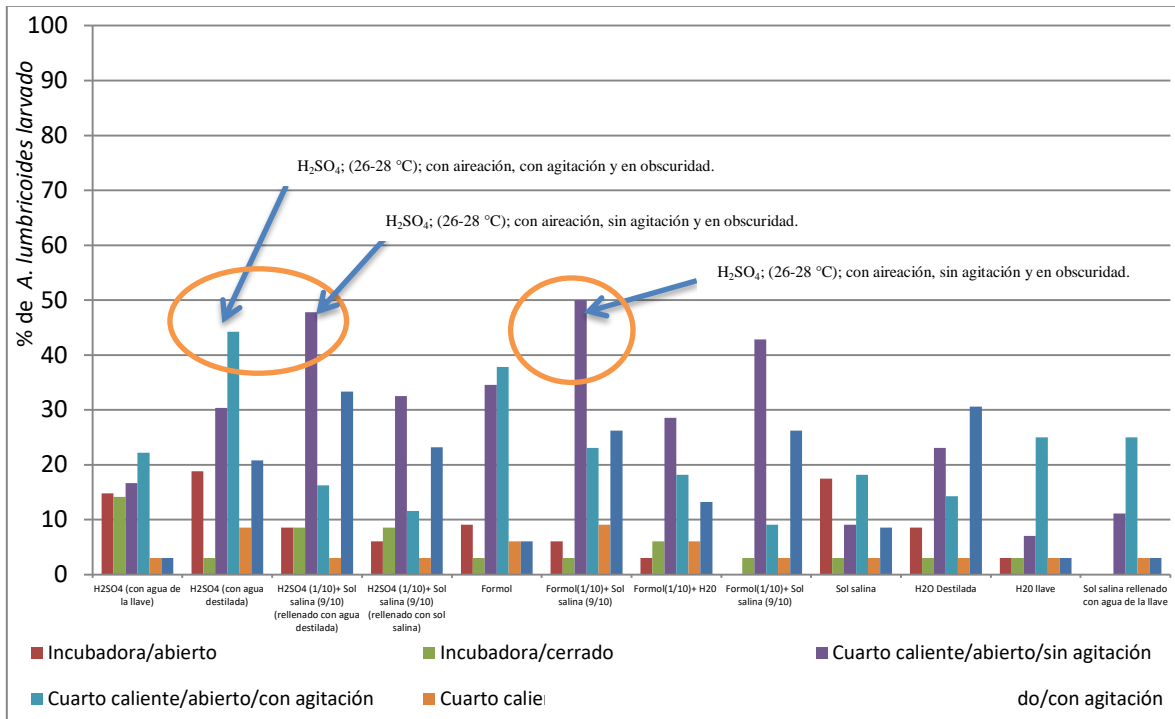


Figura de elaboración propia

Figura 5-8. Efecto de diferentes condiciones sobre la obtención de la larva móvil en *A. lumbricoides*

Lo anterior indica mediante el rechazo de H_0 , que la modificación del escenario (medio de incubación, agitación, temperatura y luz) influye en la obtención de la larva móvil por la técnica de *larvado in vitro* para HTC y HAL. Asimismo, que los resultados obtenidos entre ambas técnicas generan resultados diferentes estadísticamente. No obstante, la única forma de obtener la viabilidad real de un organismo es completando el ciclo de vida en un hospedero. Sin embargo, para las especies empleadas las condiciones que mejor resultado obtuvieron para *T. canis* fueron con medio de incubación de H_2SO_4 preparado con ADDE, en cuarto caliente (26-28 °C), cerrado, solo permitiendo la entrada de aire en el momento de reponer el líquido evaporado, sin agitación y en condiciones de oscuridad, mientras que en *A. lumbricoides* H_2SO_4 e inclusive formol (2%) preparado con ADDE, en cuarto caliente (26-28 °C), abierto, sin agitación y en condiciones de oscuridad.

5.1.3.3 Ensayos en matraz a testigos (PP y SiO_2) y AM

El ensayo en matraz efectuado empleando la metodología señalada en 4.1.2.3, se dio por finalizado hasta llegar a seis horas. Sin embargo, en el presente trabajo solo se incluyen los resultados hasta tres horas (como tiempo de contacto máximo). La razón obedece a no

obtener en las determinaciones posteriores registros significativos, con respecto al tiempo anterior. Ello sugiere el tiempo de acción del AM sobre los HH evaluados.

Los testigos de ambas especies (*A. lumbricoides* y *T. canis*) colocados solo en medio de incubación (H_2SO_4 ; $N=0.1$) registraron a todos los tiempos de exposición una viabilidad de entre $88\pm 6\%$ y $73\pm 10\%$, respectivamente. La exposición de los HH a PP con agitación y sin agitación no presentaron diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en comparación con sus respectivos testigos para ninguna estimación. Los porcentajes de PV registrados para HTC resultaron de 39-46% y 35-45%, mientras que para HAL fueron de 37-45% y 39-46%, bajo las condiciones antes mencionadas. Lo anterior descarta a dicho medio de soporte como promotor de la PV por estrés químico o mecánico.

La prueba en matraz para SiO_2 sin agitación mostró valores similares en cuestión de pérdida de viabilidad con respecto al testigo, al obtener desde 21%, hasta 30% en HTC y 43-48% para HAL durante toda la prueba. No obstante dichos porcentajes no ocurrieron de manera progresiva (en ambas especies). Las pruebas CA resultaron positivas como promotoras de PV, al registrar entre 43-64% en HTC y 48-67% en HAL, que representan una disminución de hasta 36% y 49% de inactivación, en comparación con los organismos control, tal como lo señala la ANOVA aplicada entre ellos. No obstante en este caso el comportamiento ocurre de manera progresiva alcanzando el 93% del efecto total durante los primeros 90 minutos. Lo anterior se evidencia en la Figura 5-9 y Figura 5-10.

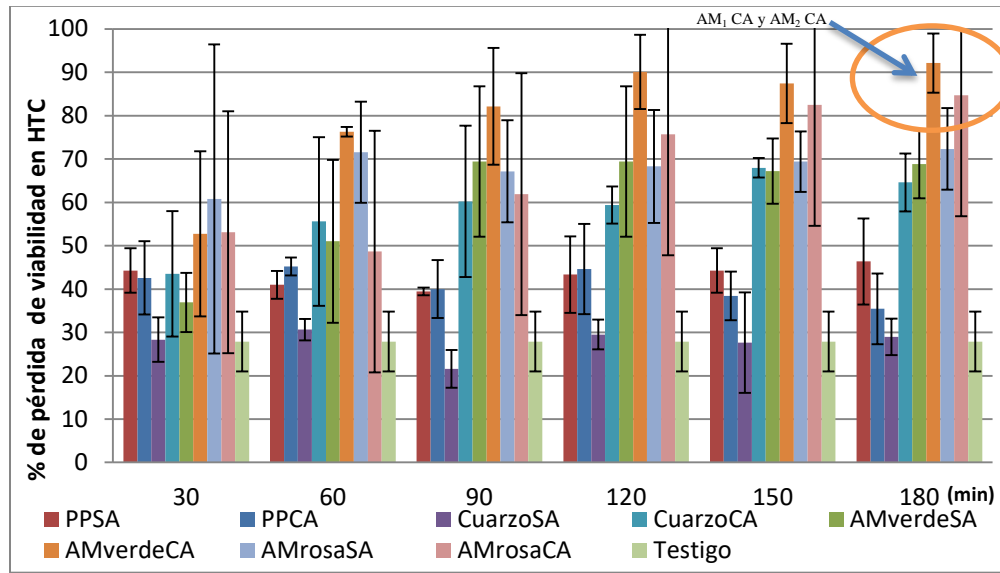


Figura de elaboración propia

PPSA=Perlas Plásticas Sin Agitación; PPCA=Perlas Plásticas Con Agitación; CuarzoSA=Cuarzo Sin Agitación; CuarzoCA=Cuarzo Con Agitación; AMverdeSA= Agregado Mineral verde Sin Agitación; AMverdeCA= Agregado Mineral verde Con Agitación; AMrosaSA= Agregado Mineral rosa Sin Agitación; AMrosaCA= Agregado Mineral rosa Con Agitación; AMrosa=AM₁; AMverde=AM₂; Cuarzo=SiO₂

Figura 5-9. Efecto de diferentes medios de soporte y condiciones sobre la PV de HTC

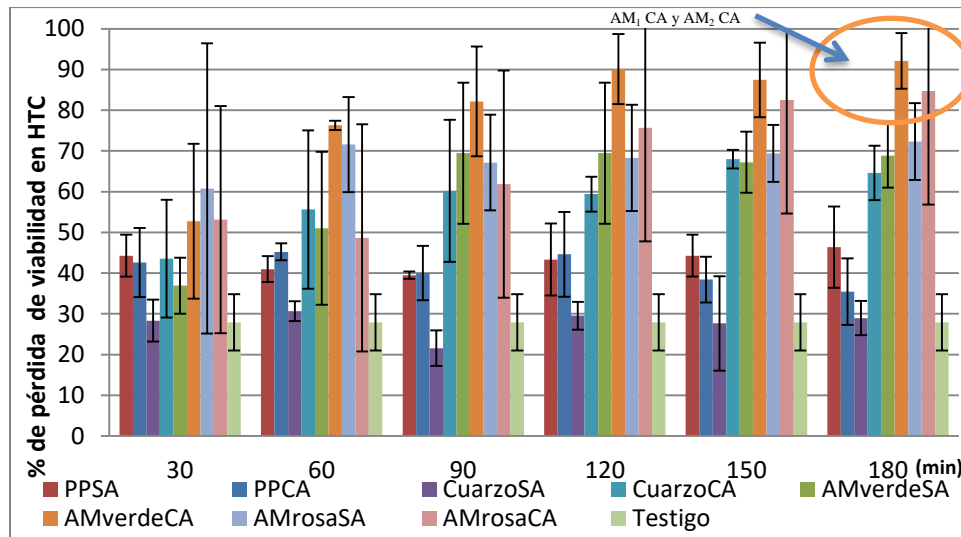


Figura de elaboración propia

PPSA=Perlas Plásticas Sin Agitación; PPCA=Perlas Plásticas Con Agitación; CuarzoSA=Cuarzo Sin Agitación; CuarzoCA=Cuarzo Con Agitación; AMverdeSA= Agregado Mineral verde Sin Agitación; AMverdeCA= Agregado Mineral verde Con Agitación; AMrosaSA= Agregado Mineral rosa Sin Agitación; AMrosaCA= Agregado Mineral rosa Con Agitación; AMrosa=AM₁; AMverde=AM₂; Cuarzo=SiO₂

Figura 5-10. Efecto de diferentes medios de soporte y condiciones sobre la PV de HAL

Asimismo, el ensayo indica que cuarzo (SiO_2) no influye como promotor de la PV por efecto químico. Sin embargo, si lo hace por causas mecánicas sobre ambas especies de HH. Lo anterior sugiere, que la inactivación se deriva de la combinación de la granulometría del soporte, la probabilidad de impactos a los cuales son sometidos los HH con respecto al tiempo y la capacidad de daño específico (parcial o letal) provocado por el material sobre las estructuras de los organismos.

Por otro lado, los AM (1 y 2) lograron inactivar a las dos especies HH en ambas condiciones evaluadas (SA y CA). Los ensayos SA alcanzaron hasta un 72% para HTC y 68% para HAL empleando el AM_1 , mientras que el AM_2 logro 63% y 72%, respectivamente. Por otro lado los ensayos CA registraron un 84% en *T. canis* y 92% para *A. lumbricoides* al ser expuestos al AM_1 , así como 91% y 93%, al serlo para el AM_2 , respectivamente.

El comportamiento de inactivación observado por el AM_1 resultó ocurrir de manera progresiva en todos los ensayos efectuados. Sin embargo, en las pruebas SA, dicho fenómeno ocurrió solo durante los primeros 90 y 120 minutos en HTC y HAL, alcanzando hasta un 67% y un 66% de PV, respectivamente. No obstante, los tiempos posteriores de exposición reportaron un incremento de 1-2%, con respecto a las estimaciones anteriores, no resultando significativos estadísticamente ($\alpha=0.05$). Por otro lado, las pruebas efectuadas CA registraron un efecto continuo, alcanzando hasta 82% y 92% en ambos casos a los 120 minutos de tiempo de exposición, donde igualmente se alcanzó hasta un 2% adicional, con el mismo resultado estadístico.


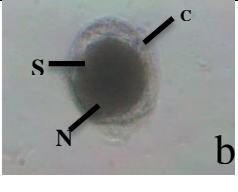
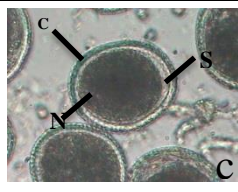
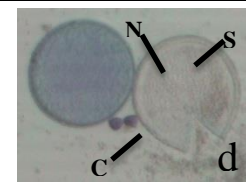
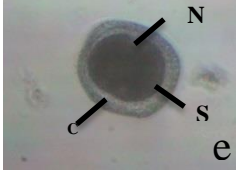

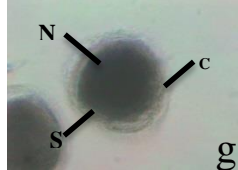
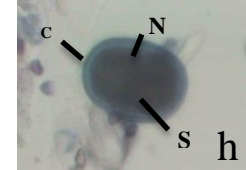
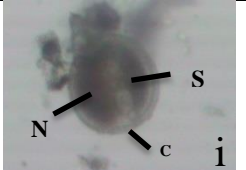
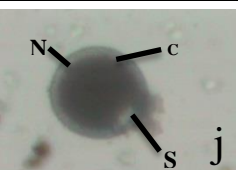

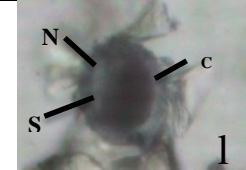
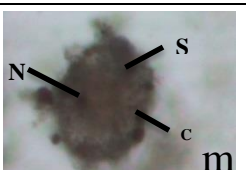
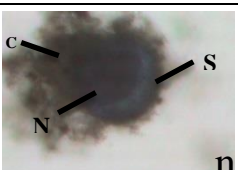
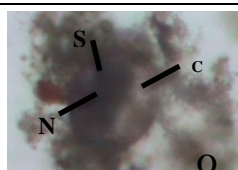
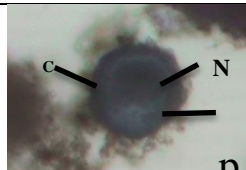
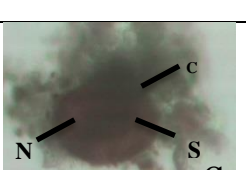

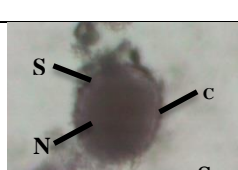

El AM_2 también resultó promover la PV de manera progresiva en todas las evaluaciones efectuadas. Los ensayos SA arrojaron resultados de éste tipo durante los primeros 120 minutos del ensayo, resultando más sensibles los HAL con 74% y HTC con 69%. Asimismo, los ensayos efectuados CA evidenciaron un efecto mayor sobre la PV hasta en un 28% para HTC y de un 16% para HAL.

Lo anterior apunta a la existencia de un estrés químico ocurrido en las pruebas SA, derivado de la exposición directa de los HTC a los AM. Por otro lado, los ensayos CA evidencian la existencia de un estrés mecánico. Sin embargo la inactivación derivada de la prueba indica, que el efecto se deriva de la combinación de uno de naturaleza química-

mecánica. Lo anterior se sugiere a partir de los resultados efectuados a SiO_2 con agitación, donde solo se expresa el componente mecánico del proceso de pérdida de viabilidad.

La recuperación de HTC y HAL de los ensayos efectuados para los medios de soporte AM_1 , AM_2 y SiO_2 evidenciaron efectos en sus estructuras, tal como lo muestra el seguimiento fotográfico contenido en la Tabla 5-8 y Tabla 5-9.

Tabla 5-8. Efecto de los AM, PP y SiO₂ sobre HTC


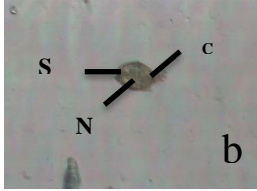
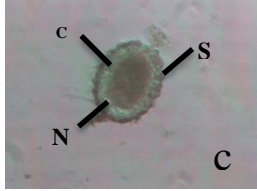
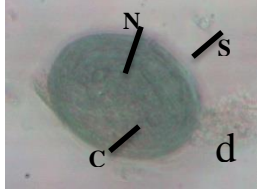
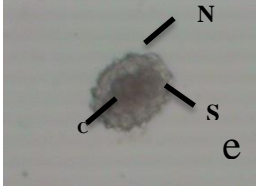
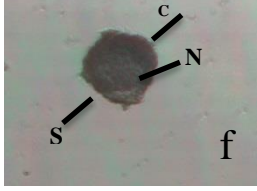
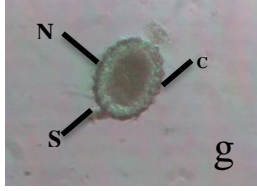
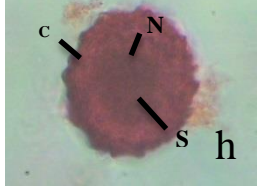
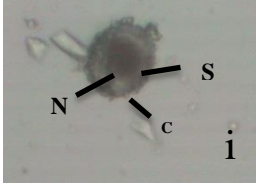
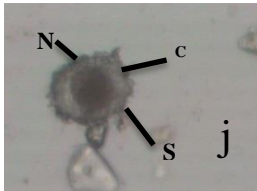
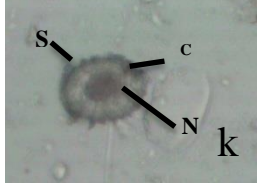
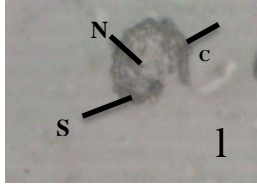
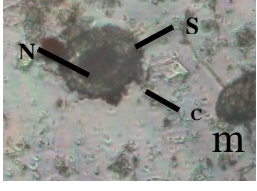
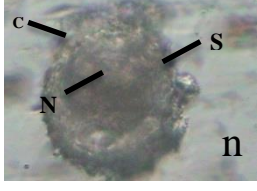

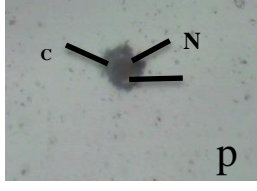
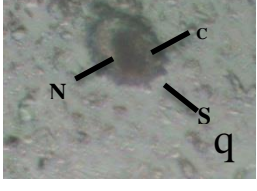
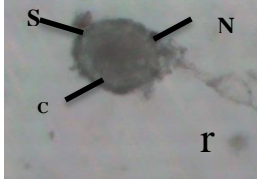
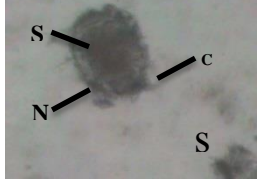
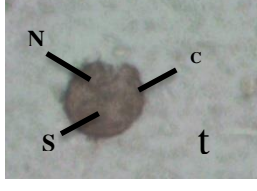
	Sin agitación		Con agitación	
	Viabilidad potencial		Viabilidad potencial	
	Si	No	Si	No
	Sin agitación		Con agitación	
Testigo				
PP				
SiO ₂				
AM ₁				
AM ₂				

PP= Perlas Plásticas; AM(1,2)= Agregados minerales SiO₂= Cuarzo

Imágenes al Microscopio óptico: 20X; Medio de Incubación; H₂SO₄ N=0.1; Agitación: 60 rpm durante 30 min; Tinción: Azul tripán

Tabla de elaboración propia

Tabla 5-9. Efecto de los AM, PP y SiO₂ sobre HAL

	Sin agitación		Con agitación	
	Si	No	Si	No
	Sin agitación		Con agitación	
Testigo				
PP				
SiO ₂				
AM ₁				
AM ₂				

PP= Perlas Plásticas; AM(1,2)= Agregados minerales SiO₂= Cuarzo
 Imágenes al Microscopio óptico: 20X y 40X; Medio de Incubación; H₂SO₄ N=0.1;
 Agitación: 60 rpm y 30 min; Tinción: Azul tripán y naranja de metilo
 Tabla de elaboración propia

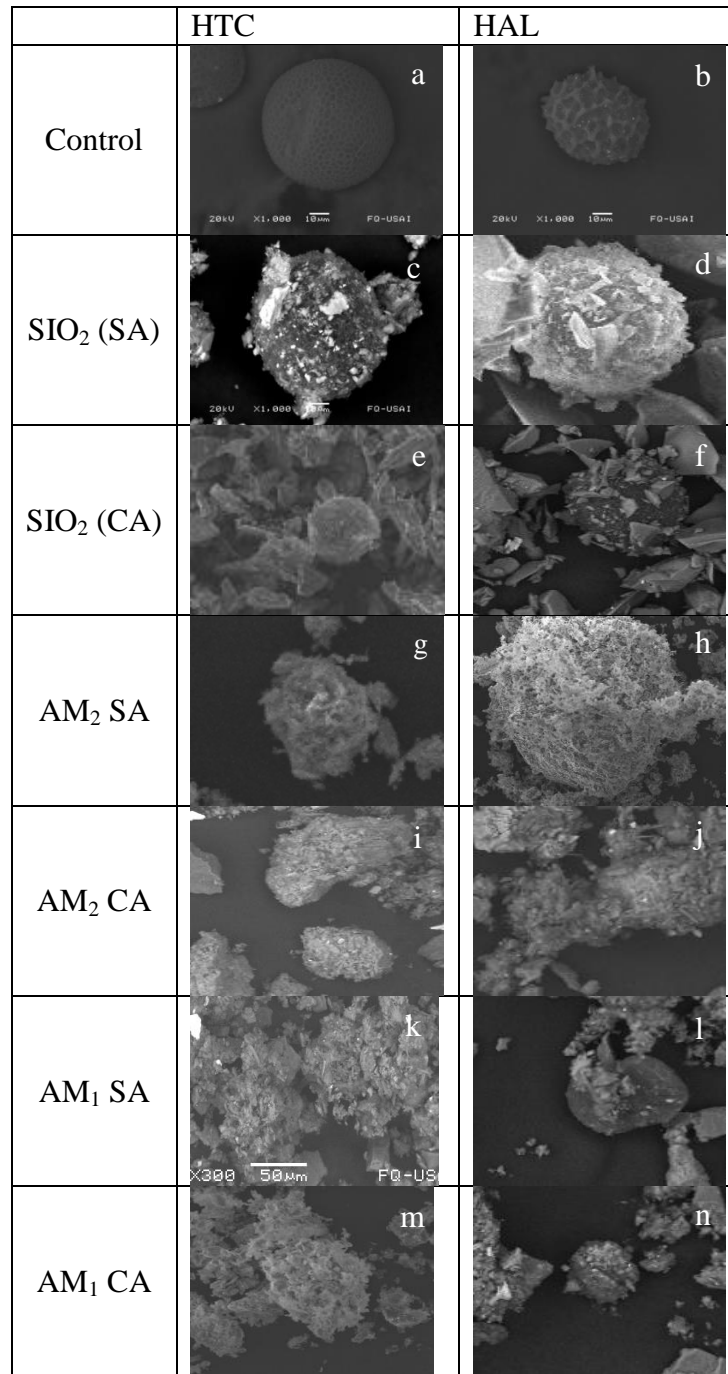
El huevo control de ambas especies colocado solo en medio de incubación mostró el núcleo, la solución hialina y las capas definidas y homogéneas (a-d). Por su parte, los HH expuestos a PP (e-h) en condiciones de agitación (CA) y en ausencia de ella (SA) no

indican alteración o daño aparente en las estructuras mencionadas previamente. Lo anterior apunta a la obtención una PV similar a la observada como testigo, o derivada del acondicionamiento de la muestra, descartando con ello al efecto mecánico o químico como responsable de la inactivación registrada por los organismos.

Los organismos expuestos a SiO_2 (i-l) muestran en todos los casos acumulación del mineral en su cubierta externa, sin que lo anterior sea motivo concluyente para evidenciar la PV para (i y j). Sin embargo, los huevecillos en agitación (k y l) evidencian daño estructural, en forma de rasgaduras y laceraciones en el exterior del organismo. Ello sugiere ser consecuencia de los impactos del material sobre los HH. Adicionalmente, algunos presentan la solución hialina heterogénea, el núcleo difuso, e inclusive segregado. Lo anterior apunta a la pérdida de homeostasis en el organismo, así como a la salida del material nuclear del huevo ocasionado por efectos mecánicos sobre las capas de protección. Los HH expuestos a los AM (1 y 2) presentan acumulación del material pétreo en todos los casos (m-t), disminución de la definición y grosor, así como la deformación de las cubiertas externa e internas del HH (m-t). Dichos fenómenos se acentúan particularmente en las pruebas con agitación (CA) (o, p, s y t). Su combinación sugiere ser causante de la inactivación por efecto químico promovido por la desintegración de los AM, así como por mecánico otorgado por las estructuras cortantes contenidas en los mismos. La anterior se evidencia al mostrar los resultados obtenidos por tinción al finalizar la prueba (Tabla 5-8 y Tabla 5-9).

Asimismo se puede dar seguimiento a dicha fenomenología en el ANEXO V, a través de las foto-micrografías efectuadas a los HH obtenidas del ensayo.

Las imágenes a los HTC y HAL empleando MEB a los diferentes ensayos de contacto para los medios filtrantes (SiO_2 , AM_1 y AM_2) evidencian las diferencias derivadas de éste ensayo (bajo las condiciones SA y CA evaluadas), tal como se muestra en la (Figura 5-11).



PP= Perlas Plásticas; AM(1,2)= Agregados minerales SiO₂= Cuarzo; CA= Con agitación; SA=Sin agitación

Tabla de elaboración propia

Figura 5-11 MEB a HH sometidos a condiciones SA y CA

Por su parte en la Figura 5-11, las correspondientes a los controles “a” y “b” muestran un ejemplar de cada HH libre de contacto. En ellas se expresan las características típicas de

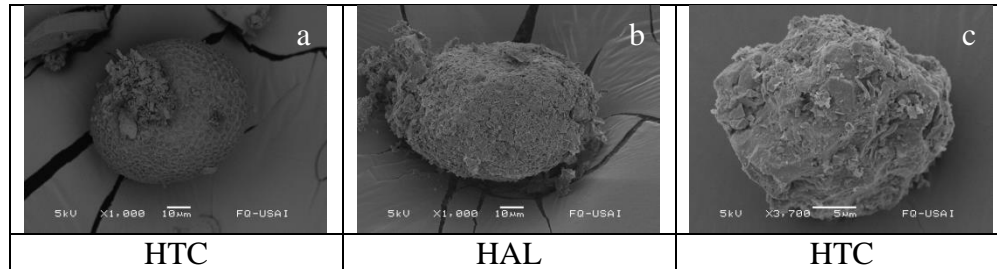


cada huevecillo (ovoide y liso), así como sus estructuras distintivas (externas): “mamelones”, para HAL y “fosetas” en HTC. En ninguno de los HH se evidencian fracturas, rasgaduras o algún daño similar que pueda ser presumiblemente atribuido a efectos mecánicos o químicos. En contraste, las pruebas de contacto para ambos especímenes con SiO₂, AM₁ y AM₂, constituidas por las figuras “c”, “d”, “e”, “f”, “g”, “h”, “i”, “j”, “k”, “l”, “m” y “n”, confirman la existencia de un estrés mecánico y químico producido por los ensayos con agitación, así como químico por la exposición ante los AM (1 y 2). Asimismo la naturaleza de dichos efectos, en comparación con los testigos (“a” y “b”), muestran los daños estructurales derivados de la exposición, así como de las condiciones de agitación aplicadas en cada ensayo.

Por otro lado, los ejemplares de HTC y HAL procedentes de los experimentos realizados sin agitación (“c”, “d”, “g”, “h”, “k” y “l”), evidencian en todos los casos acumulación de material pétreo. Las anteriores se observan como estructuras blancas en el exterior del huevo, ya sea SiO₂, para las figuras “c” y “d”, así como en las “g” y “h” para el AM₁ y “k” y “l” para el AM₂. En particular en los correspondientes a los AM es posible observar el HH (HTC y HAL) completamente cubierto, no logrando distinguir las características propias de cada huevecillo (mostradas en el control de ambas especies). El fenómeno adhesivo de los materiales pétreos al organismo, sugiere ser promovido por la presencia de un compuesto mucilaginoso que de manera natural se ubica en su parte externa. Dicha sustancia cumple la función de contribuir a la adhesión con el hospedero (intermediario, paraténico o definitivo) en su ciclo de vida. No obstante, las foto-micrografías (MEB) no evidencian más daños (en su capa externa) relacionadas con la PV de los HH.

En contraste, las foto-micrografías “e”, “f”, “i”, “j”, “m” y “n” correspondientes a los ensayos con agitación (CA), evidencian en todos los casos efectos caracterizados por: perforaciones, incrustaciones del material pétreo en el huevo, laceraciones e inclusive rupturas del mismo, donde se observó una mayor severidad en el efecto mecánico en comparación con las pruebas efectuadas SA. Ello apunta a la influencia de la viabilidad inherente del HH y sugieren ser consecuencia del estrés mecánico. De manera adicional, se manifestó la acumulación (adhesión) del SiO₂ y de los agregados (AM₁ y AM₂) al exterior del organismo, tal como ocurrió en los ensayos efectuados en ausencia de agitación.

La MEB efectuada a los organismos evidenció algunos fenómenos adicionales ocurridos en ambos huevecillos y que se presentan en la Figura 5-12. La anterior en “a” muestra la introducción del agregado en una cavidad del HH, así como en “b” y “c”, donde se observa la adhesión del AM, daño la cubierta externa, rupturas producidas por efecto mecánico, e inclusive pérdida de la forma característica del huevecillo.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Tabla de elaboración propia

Figura 5-12 Fenomenologías adicionales en HH ocurridas en los ensayos de contacto

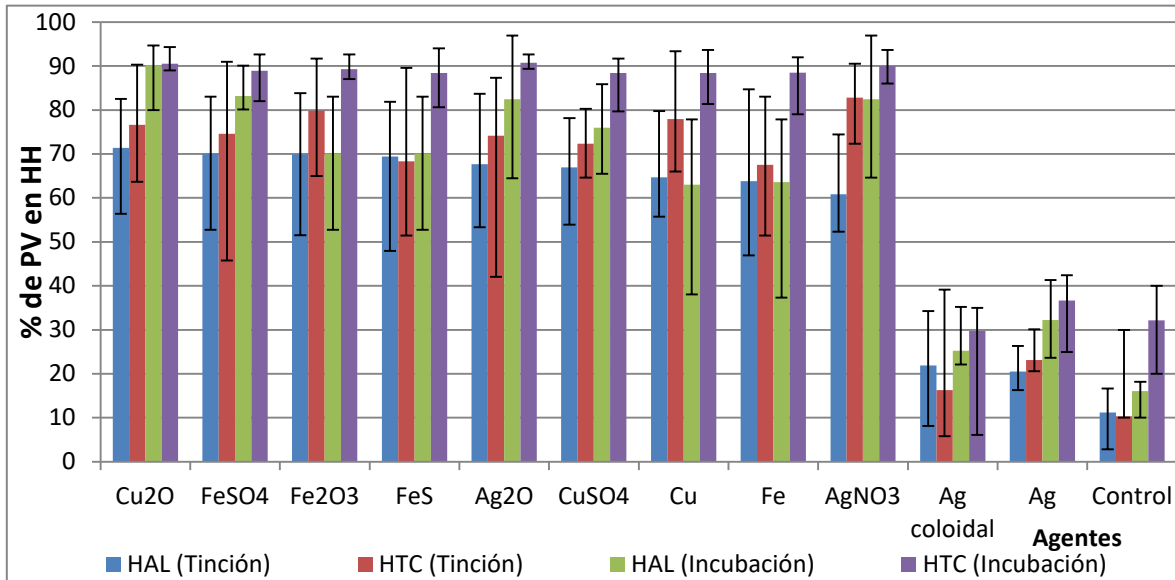
5.1.3.4 Ensayos en matraz con plata, cobre y hierro sobre HTC y HAL

El uso de ambas técnicas de estimación de viabilidad de manera contrastiva pretendió precisar cuál de éstas reflejaba de manera efectiva la PV en los organismos de prueba, en particular, bajo las condiciones del uso de metales con fines de inactivación de HH.

Los agentes metálicos explorados en el presente trabajo fueron seleccionados con base en su existencia dentro de los agregados empleados en el presente trabajo, así como algunos otros caracterizados en Mengele-López et al., (2011) y el estado de oxidación del metal.

Los resultados de evaluación de viabilidad para los testigos mediante las técnicas de tinción diferencial y larvado *in vitro* (Figura 5-13) registraron en HTC un porcentaje de huevecillos no larvados de $10 \pm 7\%$ para TDE y $32 \pm 10\%$ LIV para la última, mientras que HAL se obtuvieron $11 \pm 6\%$ y $16 \pm 5\%$, respectivamente. La prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$), dirigida a determinar la existencia de diferencia entre ambas técnicas de determinación arrojó que existió una diferencia significativa solo en el caso de HTC. Sin embargo, cabe destacar que dichas pruebas solo han sido exploradas en estas condiciones y empleando solo como organismo de prueba a *A. lumbricoides*. Las diferencias entre ambas técnicas se ubicaron en 0.05% y 22%, para LIV y TDE en ambas especies, Las pruebas efectuadas con plata registraron un máximo de 21% para HTC y 16% HAL, en el caso del hierro se observó un

máximo de 12% y 20% y en el cobre 13% y 18%, respectivamente, siendo en todas estimaciones superiores para TDE. Lo anterior sugiere que la técnica implementada por De Victorica y Galván (2003) refleja la capacidad del organismo para no permitir el acceso del colorante, que no necesariamente es correspondiente con la potencial viabilidad del mismo.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Figura de elaboración propia

Figura 5-13. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos estimados mediante TDE y LIV

Los resultados estadísticos señalan que existe diferencia entre ambas técnicas, inclusive entre ambas especies. Sin embargo, al no constituir un objetivo de este trabajo, no se profundizará en determinar la causa precisa de ellas. No obstante, algunos factores que inciden en la viabilidad del organismo pueden originar respuestas diferentes a las previstas. Algunas de ellas se componen por la combinación de: la viabilidad inherente del lote al momento de su extracción, las condiciones de obtención, manejo y extracción, conservación, estrés químico y ambiental a los cuales se ha sometido al organismo y a los huevecillos, por solo mencionar algunos.

Si bien, ambas técnicas ofrecen una estimación de la viabilidad del organismo, ninguna de las dos brinda para ello un resultado preciso, ya que de manera real, ninguno de ellos refleja de manera íntegra las condiciones a las cuales se somete el organismo durante esas etapas. Por ello, los resultados obtenidos no son correspondientes a los resultados en vida silvestre.

Primordialmente, el avance en su ciclo de vida es respuesta a la combinación de variables favorables que lo fomentan (Begon, 1990). En el caso particular de los HH, se desconoce cuáles responden a condiciones fisiológicas, de estrés ambiental o en relación con su hospedero (Ximénez-García, 2010).

Por otro lado, las técnicas de estimación de viabilidad mencionadas anteriormente, se fundamentan en principios diferentes. Por ello, evalúan condiciones diferentes del estado del HH, tales como el aumento de la permeabilidad selectiva que posee el huevecillo en el caso de TDE. Dicha característica se modifica usualmente ante el avance del estadio, por estrés químico, mecánico, ambiental o por los mismos requerimientos fisiológicos (Ocampo, 2014), no implicando ninguno de ellos necesariamente una PV. Por otro lado, LIV simula las condiciones ambientales y químicas que corresponden al nicho donde se desarrollan. En ambos casos, algún estrés podría no constituir un daño letal, o bien, eventualmente reparable. No obstante, la incidencia del daño sobre el organismo, puede constituir un evento que derive en un daño parcial, que puede o no tener un impacto directo sobre el condicionamiento del desarrollo del organismo, limitando su paso a los siguientes estadios.

Por otro lado, la tinción por exclusión puede no ser extensiva para todo tipo de proceso de inactivación al cual se somete al organismo. La diversidad de mecanismos de acción, los cuales no necesariamente tienen una implicación directa sobre los constituyentes y procesos implicados en la permeabilidad y protección del organismo limitan su uso. No obstante, los resultados indican la PV por diferentes motivos. Por ello, es recomendable que sean observadas como complementarias para obtener una explicación sobre los mecanismos de acción involucrados en la inactivación de un organismo. Los diferentes resultados de exposición a metales en tiempos y concentraciones progresivas evaluados por ambas técnicas ANEXO VII así indican. No obstante, que la tinción diferencial ha sido extendida como prueba de inactivación todas las especies de helmintos, principalmente en el rubro de ingeniería sanitaria, aunque ésta no fuera desarrollada para medir la PV, sino la viabilidad. De hecho, De Victorica y Galván (2003) efectúan una comparación entre ambas técnicas, aunque solo con consideración de *Ascaris suum* como organismo de prueba por su similitud morfológica que presenta con *A. lumbricoides* (Aladawi et al., 2006). No obstante, que ha

sido reportado en humanos, aunque, sin alcanzar su madurez (Akao et al., 1995). Por su parte, *A. lumbricoides* constituye la especie de mayor relevancia en el ramo sanitario, al conformar un 90% de los HH contenidos en agua residual doméstica (Rojas et al., 2008; Jiménez, 2007). Sin embargo, los diferentes resultados sugieren la necesidad de validar ambas técnicas para las especies a evaluar.

5.1.3.5 *Inactivación ofrecida por los compuestos metálicos (Ag, Cu y Fe)*

Los ensayos de contacto de los HH con agentes con contenido con plata, cobre y hierro evidenciaron una PV significativa. Lo anterior se sugiere a partir de la prueba de ANOVA, para ambos casos contra testigo donde HAL fue de 10% y 32% y de 11% y 16%, mediante TDE y LIV, respectivamente. Los valores mínimos y máximos de PV encontrados en el caso de HTC fueron de 16% empleando plata coloidal, hasta 93% con Cu (evaluados mediante la técnica de tinción) y 15% (plata coloidal), hasta 94% (Cu_2O) por medio de incubación. De igual manera para HAL fueron registrados desde 18% (plata coloidal), hasta 83% (Fe_2O_3), y un mínimo de 22% (plata coloidal), hasta 96% (AgNO_3), respectivamente. Sin embargo, en ambas especies se registró el menor valor de PV a la exposición de plata coloidal (con estados de oxidación de 0 y +1). Los resultados indican adicionalmente una diferencia entre ambas estimaciones, así como entre ambas especies.

Ello apunta a la utilización de un agente comercial, del cual no se asegura su óptimo estado (calidad y condiciones), que según las pruebas efectuadas por ICP-MS el lote empleado registró $2345 \pm 20 \text{ mg Ag L}^{-1}$. No obstante, que el fabricante señala un contenido de $3500 \text{ mg Ag L}^{-1}$, lo cual manifiesta la heterogeneidad del lote derivado por diferentes causas del fabricante, manejo o aplicación. Una posible causa apunta a razones osmóticas y la regulación propia con la que cuenta el huevo. Lo anterior es sugerido con base en los resultados obtenidos al emplear Ag y AgNO_3 , que simulan lo contenido en plata coloidal y que señalan una mayor capacidad de inactivación de entre un 70% y 90% para ambas especies.

5.1.3.6 *Capacidad máxima de inactivación ofrecida por los agentes de prueba*

Ubica a los compuestos con contenido de plata entre un grado de entre 1 y 6, según la los criterios de la escala definida anteriormente. En ellos, indican que el AgNO_3 ofrece el

mayor valor, con grado 4 (tinción) y 6 (incubación) para HTC, mientras que para HAL resultó ser de 3 y 5, respectivamente. Por su parte los ensayos con cobre reportaron entre 3 a 6, con la mayor sensibilidad para el Cu₂O en HAL con 3 por TCE y 5 por LIV, mientras que en HTC fue con 4 para la primera, aunque LIV resultó superior para CuSO₄ con un grado de inactivación de 6. Por su parte el hierro obtuvo resultados favorables en todos los casos, resultando más sensible HTC con un grado entre 4 y 6, mientras que HAL resultó en menor grado al reportar 3 y 5. De manera comparativa se observó una diferencia para las estimaciones estadísticas evaluadas (Tabla 5-10) entre ambos resultados para todos los compuestos metálicos, con variaciones de hasta un 21% entre técnicas.

Tabla 5-10. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos con contenido de Ag, Cu y Fe.

Compuesto	Tinción (TDE)									Incubación (LIV)								
	<i>T. canis</i>			<i>A. lumbricoides</i>			<i>T. canis</i>			<i>A. lumbricoides</i>								
Control	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	10.33	7.52	30	10	11.19	6.43	16.66	2.85	32.12	10.65	40	20	16.06	5.32	18.18	10.00		
Fe	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	67.52	10.24	83.06	51.43	63.80	3.22	84.68	46.93	88.49	0.70	92.00	79	63.57	4.89	77.85	37.30		
FeS ₂	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	68.33	10.16	89.58	51.43	69.42	2.99	81.87	47.91	88.42	0.67	94.00	80.66	70.08	3.31	83.01	52.77		
Fe ₂ O ₃	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	79.85	6.69	91.66	64.95	69.95	3.11	83.85	51.5	89.29	1.03	92.66	87	70.08	3.31	83.01	52.77		
FeSO ₄	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	74.57	6.29	90.95	45.76	70.08	3.31	83.01	52.77	88.91	1.03	92.66	821	83.15	3.7	90.1	80.11		
Ag	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	23.16	4.7	30.11	20.6	20.5	2.61	26.3	16.3	36.66	7.19	42.4	24.97	32.24	7.86	41.3	23.6		
Ag coloidal	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	16.27	8.85	39.14	5.80	21.90	2.63	34.24	8.15	29.75	6.06	35	6.11	25.2	6.37	35.2	22.1		
Ag ₂ O	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	74.12	6.61	87.36	42.06	67.69	3.09	83.66	53.34	90.77	0.84	92.66	89.33	82.45	3.04	96.96	64.44		
AgNO ₃	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	82.81	7.56	90.55	72.36	60.86	2.68	74.47	52.30	90.03	0.85	93.66	86	82.45	5.04	96.96	64.64		
Cu	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	77.93	7.00	93.33	65.99	64.71	3.30	79.73	55.74	88.38	0.93	93.66	81.33	63.04	3.15	77.83	38.04		
Cu ₂ O	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	76.60	5.51	90.29	63.65	71.36	2.99	82.51	56.36	90.55	0.41	94.33	89	90.18	0.96	94.66	80.00		
CuSO ₄	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min	X	S	Max	Min		
	72.36	4.3	80.24	64.58	66.95	2.63	78.14	53.88	88.45	0.86	91.66	79.66	75.94	3.42	85.85	65.47		

X=media; S= desviación estándar;

Tabla de elaboración propia

Los HTC resultaron ser más sensibles a cobre, 0 (tinción) y +1 (incubación), mientras que en HAL resultaron ser los compuestos con contenido de Fe⁺² y Ag⁺¹. No obstante, en ambas especies se observó para todos los metales una mayor capacidad de inactivación en sus formas oxidadas.

Las pruebas de contacto en HH con agentes metálicos para determinar PV mediante LIV y TCE evidenciaron una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) con respecto a sus resultados. La variación entre ellos osciló desde 1%, hasta un 21% en el caso de *A. lumbricoides* y desde 7%, hasta un 21% para *T. canis*, obteniendo en todos los ensayos valores superiores de PV

mediante la técnica de larvado. Dicho comportamiento fue evidenciado en todos los agentes explorados, así como en los controles de cada especie.

Lo anterior sugiere una inconsistencia de la técnica de tinción e incubación de manera equivalente para evaluar la viabilidad de HH (HTC y HAL) de una manera eficiente en ensayos asociados a promover la PV por contacto con metales, en particular para Ag, Cu, y Fe.

De hecho ambas técnicas arrojaron un diferente resultado con respecto a la capacidad de inactivación ofrecida por cada agente evaluado. La PV para *T. canis* por TDE fue registrada de la siguiente manera: $\text{AgNO}_3 > \text{Fe}_2\text{O}_3 > \text{Cu} > \text{Cu}_2\text{O} > \text{FeSO}_4 > \text{Ag}_2\text{O} > \text{CuSO}_4 > \text{FeS}_2 > \text{Ag} > \text{Ag}_{(\text{coloidal})} > \text{Fe}$. Por otro lado la estimada por LIV fue $\text{Ag}_2\text{O} > \text{Cu}_2\text{O} > \text{AgNO}_3 > \text{Fe}_2\text{O}_3 > \text{FeSO}_4 > \text{CuSO}_4 > \text{FeS}_2 > \text{Cu} > \text{Ag} > \text{Fe} > \text{Ag}_{(\text{coloidal})}$, donde se observa en ambos casos que las especies oxidadas resultan de mayor eficiencia, así como las solubles en el medio. Sin embargo, el orden que señala la magnitud del efecto es diferente en cada una de ellos, encontrando plata y hierro como las de mayor capacidad de inactivación por la primera técnica y por la segunda es Ag y Cu. De manera comparativa, se observa una mayor eficiencia en la evaluación por LIV de hasta un 30%, lo cual apunta ser consecuencia del medio ácido de incubación sugerido en la técnica. Lo anterior incrementa la presencia de iones (cationes y aniones), favoreciendo la capacidad de inactivación, así como la disminución de la capa externa. La PV asociada a Cu metálico sugiere ser consecuencia de la duración del ensayo, el cual presenta interacción con el medio, tal como se muestra en las microfotografías correspondientes a cobre ANEXO VII. En ellas se aprecian tonalidades de naranja en el medio, así como en el HH, atribuibles a la presencia del metal en el organismo, el cual es progresivo en cuanto a su intensificación, con respecto a la concentración y tiempo de exposición. Por otro lado, en ambos casos las que ofrecieron el menor efecto se encuentran constituidas por plata coloidal, así como por las formas metálicas de plata y hierro.

Por otro lado *A. lumbricoides* registró PV en todos los casos, tanto en TDE y LIV. La capacidad de inactivación de los agentes metálicos para la primera técnica de evaluación fue:

$Cu_2O > FeSO_4 > Fe_2O_3 > FeS_2 > Ag_2O > CuSO_4 > Cu > AgNO_3 > Ag > Ag_{(coloidal)} > Fe$, mientras que la evaluada por LIV se constituyó por: $Cu_2O > FeSO_4 > Ag_2O > AgNO_3 > CuSO_4 > FeS_2 > Fe_2O_3 > Cu > Ag > Ag_{(coloidal)} > Fe$. Ambos casos evidencian un efecto de inactivación para todos los agentes evaluados, encontrando los mejores resultados también para las especies oxidadas, así como en las que presentan solubilidad en el medio. No obstante, la capacidad de inactivación es diferente (Tabla 5-11).

Tabla 5-11. Inactivación de HH ofrecida por los compuestos metálicos con contenido de Ag, Cu y Fe.

Compuesto	Tinción (TDE)		Incubación (LIV)	
	<i>T canis</i>	<i>A lumbricoides</i>	<i>T canis</i>	<i>A lumbricoides</i>
Fe	+++ (3)	+++ (3)	+++++ (4)	+++ (3)
FeS ₂	+++ (3)	+++ (3)	+++++ (5)	++++ (3)
Fe ₂ O ₃	++++ (4)	+++ (3)	+++++ (5)	++++ (4)
FeSO ₄	++++ (4)	++++ (4)	+++++ (5)	+++++ (5)
Ag	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
Ag coloidal	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
Ag ₂ O	++++ (4)	+++ (3)	+++++ (6)	+++++ (5)
AgNO ₃	+++++ (5)	+++ (3)	+++++ (6)	+++++ (5)
Cu	++++ (4)	+++ (3)	+++++ (5)	+++ (3)
Cu ₂ O	++++ (4)	++++ (4)	+++++ (6)	+++++ (6)
CuSO ₄	++++ (4)	+++ (3)	+++++ (5)	++++ (4)

Escala referencia de grado de inactivación: +=0%-20%; ++=20%-40%; +++=40%-60%; ++++=60%-80%;

+++++=80%-90%; ++++++=90%-100%

Tabla de elaboración propia

Ambas técnicas refieren a los compuestos con contenido de cobre y hierro como los que ofrecen el mayor resultado de inactivación. De manera comparativa, se observa una mayor PV en la evaluación por LIV, con hasta un 30%, donde también existe un incremento consistente en el ensayo hecho con HTC, atribuible al medio ácido de incubación, tal como fue mencionado anteriormente. De igual manera, los compuestos con menor registró de PV resultaron ser Ag coloidal, Ag y Fe, tal como en los ensayos efectuados a HTC, lo cual sugiere un menor efecto derivado de la disponibilidad iónica con el HH brindada por la solubilidad, así como por la metodología empleada durante el experimento, el cual no favorece un efecto mecánico.

Por otro lado, se encontró que los HTC son mayormente sensibles a la exposición a agentes metálicos, lo cual ocurrió en ambas metodologías de incubación, en comparación con los

HAL, que registraron una PV superior, hasta en 18%, mientras que empleando TDE resultó ser de hasta un 30% (Figura 5-14).

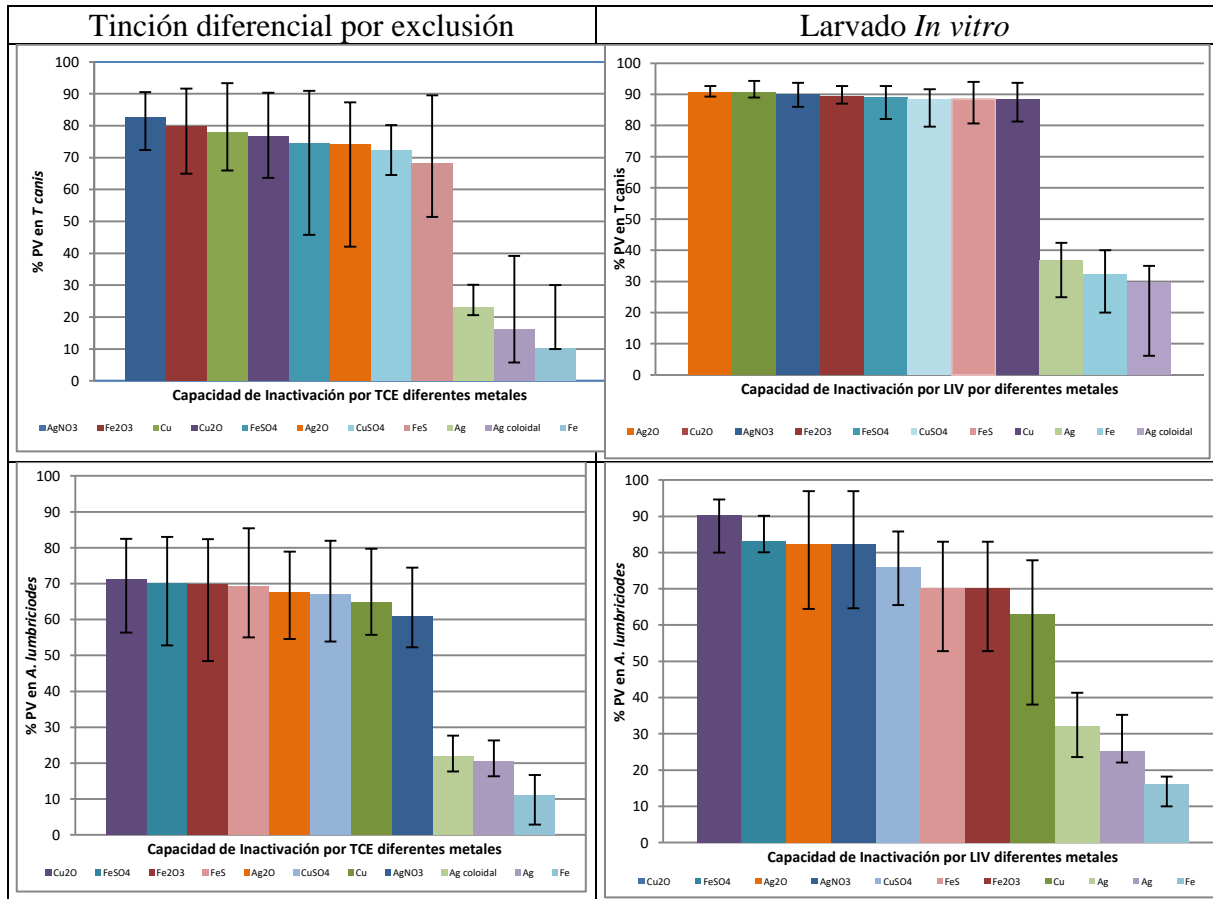


Figura de elaboración propia

Figura 5-14. Capacidad de inactivación ofrecida por los compuestos metálicos estimados mediante TDE y LIV sobre HAL y HTC

Lo anterior sugiere que la capacidad de penetración del colorante, no necesariamente implica la PV en todos los casos. En ella se debe considerar el mecanismo de acción, así como los efectos derivados por el tiempo de exposición. No obstante, la técnica de LIV (en medio ácido puede favorecer la inactivación del HH (por fenómenos oxidativos ocurridos en la cubierta). Asimismo el intercambio hacia el interior puede contribuir en la inactivación del mismo al impactar estructuras fundamentales implicadas en el desarrollo del organismo, tal como el material genético (Bandala et al., 2012), Igualmente, el medio de desarrollo del organismo (HTC y HAL), al constituir un ambiente similar a su hábitat de desarrollo al interior del hospedero. Por otro lado TDE evalúa principalmente efectos

relacionados solo con la permeabilidad de las capas que rodean al huevo y no considera lo ocurrido al interior del organismo, tal como en la solución hialina o en el núcleo. No obstante, que dichas consideraciones son importantes al emplear metales como agente promotor de la PV.

Los resultados sugieren que la evaluación de viabilidad por la TDE es más adecuada cuando el organismo presenta daño o efecto sobre alguna de sus estructuras de protección (provocadas por estrés). No obstante es importante determinar el mecanismo de acción involucrado en la PV, ya que, no en todos los casos los daños se ve reflejado de la misma manera. Es importante puntualizar sobre la necesidad de explorar su efecto en otras especies de HH, así como para otros organismos de alta resistencia, donde, en particular se ha abusado de dicha técnica para evaluar el efecto de agentes desinfectantes dentro de la ingeniería sanitaria. Por ello, se sugiere efectuar ambas técnicas para hacer una reconstrucción de los fenómenos ocurridos en los organismos al aplicar un agente con fines de inactivación.

5.1.4 Caracterización de la inactivación ofrecida por los compuestos metálicos

5.1.4.1 Ensayos de exposición a plata

Los resultados derivados de las pruebas de contacto sobre HTC y HAL empleando compuestos con contenido de plata Ag (0), plata coloidal (0 y +1) AgNO₃ (+1) y Ag₂O (+1) indican un efecto de PV significativa ($\alpha=0.05$) en comparación con el testigo para todos los casos. Se observó que los huevos de son sensibles a los agentes anteriormente referidos, siendo menor ante granalla de Ag (0) y plata coloidal (0 y +1) y mayor en las especies oxidadas (AgNO₃ (+1) y Ag₂O (+1)). Lo cual sugiere estar relacionado con la solubilidad del compuesto, así como del efecto producido por el estado de oxidación, disponibilidad y facilidad de difusión hacia el organismo.

La estimación de PV efectuada mediante TDE refleja un efecto progresivo relacionado con el incremento de las concentraciones y los tiempos de exposición que van desde 16%, hasta 90% para HTC y de 20% hasta 83% en HAL, acentuándose particularmente a partir de 0.5 g L⁻¹ y desde un Tiempo de Contacto (TC) de 90 minutos, con 70% en ambos casos (ANEXO VII). Sin embargo, su evaluación mediante LIV registró resultados superiores,

desde 29.7%, hasta 93.6% en HTC y 25.2%, hasta 96.9% en HAL, encontrando para las especies oxidadas valores superiores al 85% en ambos casos, a partir de 0.01 g L^{-1} y 30 min, correspondientes a las menores concentraciones y tiempo de exposición evaluados en el presente trabajo. Dicho comportamiento se conservó, e inclusive se incrementó durante los tiempos subsecuentes y concentraciones evaluadas, logrando hasta un 97% de inactivación. El comportamiento insinúa que el efecto producido por la plata ocurre en las cubiertas, así como en el interior del organismo.

Asimismo dicho análisis indica que el tiempo de exposición, la concentración y el estado de agregación son factores que inciden en la PV en HTC y HAL. Lo anterior se sugiere, mediante una prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$) deriva a partir del incremento de la curva de inactivación con respecto al tiempo de exposición.

Exposición a plata Ag (0)

La granalla de plata se muestra como agente promotor de la pérdida de viabilidad en HTC y HAL, al evidenciar PV en las pruebas de LIV y TDE. Dichos resultados evaluados mediante un ANOVA son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) para todos los tiempos de exposición, concentraciones y técnicas de evaluación, con respecto al testigo.

La tinción diferencial muestra una inactivación desde el primer tiempo de contacto evaluado (30 min), registrando 18% y 14%, respectivamente. La anterior se incrementa en promedio en un $3\pm 1\%$ y $2\pm 1\%$ en cada medición posterior, llegando hasta un máximo de 30% y 26%, ocurrido a un TC de 180 min (ANEXO X). Por su parte el LIV presenta una inactivación de 24% y 23% en HTC y HAL durante la primera medición, incrementándose a razón $5\pm 1\%$ y $7\pm 1\%$ en cada evaluación posterior. De igual manera, la prueba presentó resultados superiores en 42% y 41% en comparación con la tinción (Figura 12-1 y Figura 12-13). No obstante, ambos casos evidencian un efecto progresivo con respecto al tiempo de contacto y la concentración del metal.

Exposición a Ag (+1)

Su evaluación fue efectuada mediante ensayos con AgNO_3 , Ag_2O y con plata coloidal, empleados de manera independiente. No obstante, que éste último, se encuentra constituido

por plata 0 y +1 mayoritariamente compuesto por +1, aunque, también tiene un contenido de plata (0). Su proporción real obedece a la calidad comercial del lote, condiciones de manejo y permanencia en la tienda (tiempo de vida de estante), la cual puede disminuir considerablemente el efecto desinfectante señalado por el fabricante, así como la presencia de la plata cargada. Sin embargo, ambas técnicas (incubación y tinción) indican que ambos compuestos ejercen un efecto de inactivación sobre HTC y HAL.

Exposición a plata coloidal (0 y +1)

El agente ofreció para ambas especies una zona delimitada de PV de entre un 5% como mínimo, hasta un 35% como máximo, encontrando comportamientos similares en ambas metodologías de estimación de inactivación empleadas (TCE y LIV). De manera particular, por medio de TDE, se registró una inactivación de entre 5% y 39% en el caso de HTC y 8% y 34% en HAL, mientras que por LIV registraron en 6% y 29% en el caso de HTC y 3% y 36% en HAL, donde los resultados de inactivación se evidenciaron desde la primer estimación ocurrida a los 30 min (Figura 14-1).

No obstante el fenómeno de la PV ocurrió de manera creciente con respecto al aumento de concentración y tiempo de exposición de los HH al agente. La razón de incremento de PV estimada mediante TCE ocurrió en promedio con $1\pm 5\%$ para HTC y 0.1 ± 1 HAL, logrando el mayor valor para 30 y 60 min con hasta en 20% y 28%. Adicionalmente, se observa que a concentraciones mayores de 0.5 g mL^{-1} ofrece un porcentaje de inactivación mayor de entre un 4% a un 7%, así como con TC superiores. Por otro lado, el ensayo evaluado mediante LIV registró una PV mayor, de hasta 12%, en comparación con la efectuada mediante TDE. Ambas técnicas presentaron el mayor efecto de PV durante el primer TC evaluado (30 min) y un promedio de incremento de PV de $0.7\pm 1\%$ y $1\pm 1\%$ durante el resto de las estimaciones.

Lo anterior sugiere un efecto de PV ocurrido de manera progresiva con respecto a la permeabilidad sufrida por el HH brindado por la concentración y tiempo de exposición. En particular la LIV evidencia un efecto de PV no necesariamente evaluable de manera precisa mediante TDE, ya que dicha diferencia podría sugerir efectos sobre la solución hialina o bien, sobre el núcleo del organismo.

Exposición a Ag₂O

El compuesto reportó ambas especies de HH una pérdida de viabilidad aproximada a un 50% como mínimo y 90% como máximo, reportando resultados de inactivación a partir del primer tiempo de exposición (30 min) en todos los casos. Adicionalmente, se encontró un comportamiento progresivo con respecto a la concentración y tiempo de exposición en ambas metodologías de estimación de PV empleadas. De manera particular, se evidenció una PV de entre 42% y 87% en el caso de HTC y 53% y 89% en HAL (evaluados mediante TDE), mientras que por medio de LIV se registraron por TDE 89% y 92% para HTC y 64% y 96% en HAL. El fenómeno de inactivación se manifestó de manera particular, en cada tipo de técnica de evaluación, así como de especie de HH, tal como se observa en la memoria fotográfica contenida en el ANEXO V.

Asimismo, se encontró una mayor sensibilidad en el caso de los HTC, con respecto a los ensayos efectuados para TDE y HAL estimados mediante ambas técnicas de medición de viabilidad (con respecto al tiempo de exposición). Los resultados, reflejaron una inactivación de entre 80% y 90% en todas las evaluaciones mediante LIV, a partir de la primera medición (30 minutos) (Figura 14-2). Dicho comportamiento se manifestó consistente y con un incremento a razón 2% en cada medición posterior. De manera comparativa, los resultados obtenidos por los mismos organismos evaluados mediante TDE registraron entre 68% para la concentración mínima y 79% para la máxima. No obstante, los tiempos de evaluación posteriores a 120 min presentaron valores <5%. Dicho resultado fue consistente en todas las concentraciones y para los tiempos subsecuentes estimados.

Por otro lado, los ensayos efectuados a HAL, que fueron estimados mediante LIV muestran un aumento de PV en un intervalo de (1 y 10%), registrando el mayor el porcentaje de inactivación a las máximas condiciones de evaluación. Asimismo, se observa una clara diferencia entre las tres primeras concentraciones (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹) y las últimas tres (0.5, 1 y 2 g mL⁻¹), hasta con un 40% de diferencia entre estas. Por su parte, las últimas registraron 82% y 96%, para los últimos TC evaluados (Figura 14-2).

Por su parte, los ensayos efectuados a HAL y evaluadas mediante TDE mostraron un comportamiento similar de PV durante el primer tiempo de evaluación (entre 62% para la concentración mínima y 88% para la máxima). Sin embargo, evidenciaron una menor

capacidad de inactivación (entre un 10% y 15%) para todas las concentraciones y tiempos de exposición posteriores en comparación con los HAL evaluados mediante LIV. No obstante, la curva de inactivación resultante sugiere no alcanzar la capacidad máxima de inactivación ofrecida por el agente, tal como lo evidencia el comportamiento gráfico correspondiente.

En conjunto ambos análisis sugieren un efecto de PV progresivo, que se relaciona con la permeabilidad sufrida por el HH. También, que la concentración y TC genera diferentes velocidades de expresión del fenómeno de inactivación, la cual es particular HAL y HTC. Asimismo, que la capacidad máxima que ofrece el Ag_2O puede no ser la mencionada en el ensayo. Finalmente, que la PV no solamente es explicable a través de los fenómenos asociados con la permeabilidad evaluada mediante TDE.

Ensayos con AgNO_3

El agente reportó para HTC y HAL una inactivación entre 63% y 96%. Las estimaciones de inactivación obtenidas por medio de LIV alcanzaron un 96% en HTC y 82% para HAL. Por otro lado, las generadas por medio de TCE lograron 82% y 60% para cada especie de HH, respectivamente, encontrando una diferencia de hasta 22% entre ambas técnicas. No obstante, el efecto se registró a partir del primer tiempo de medición (30 min), reportando entre un 50 y 90%, para ambas especies.

De manera particular, se observó una mayor sensibilidad en los HTC, al registrar valores cercanos al 90% en todas las mediciones, con incrementos de hasta en 2% con respecto a los tiempos de contacto posteriores. Asimismo, se observa en la Figura 14-3 mediante TCE para HAL un efecto gradual entre 50 y 70% para el primer TC y un incremento de hasta un 7% para las siguientes estimaciones. En particular, las concentraciones (0.01 , 0.05 y 0.1 g mL^{-1}) evidencian un efecto progresivo de la inactivación del organismo, que finaliza en el tiempo máximo del ensayo. Sin embargo, las concentraciones (0.5 , 1 y 2 g mL^{-1}) presentaron el mayor incremento de PV durante los primeros TC. Lo anterior indica sensibilidad diferenciada ante el agente, concentración y duración de la exposición.

Por otro lado, las estimaciones de inactivación obtenidas por medio de LIV resultaron superiores hasta en un 15% en comparación con las obtenidas por medio de TCE. En ellas

se observan resultados entre 65% y 75% de PV al emplear 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 g mL⁻¹. Por otro lado, los ensayos correspondientes a 2 g mL⁻¹ evidenciaron el efecto máximo a partir del primer TC, el cual se repitió para el resto del ensayo. Por su parte, los HTC mostraron el mismo efecto para todas las concentraciones evaluadas a partir del primer tiempo de exposición, lo cual refleja una alta sensibilidad hacia el AgNO₃. Lo anterior apunta a la utilización de una menor concentración para determinar la curva de inactivación del organismo.

5.1.5 Ensayos de exposición a cobre

Los resultados derivados de las pruebas de contacto sobre HTC y HAL empleando compuestos con contenido de cobre Cu (0), Cu₂O (+1) y CuSO₄ (+2) indican en todos los casos, así como para ambas metodologías de estimación, un efecto de PV significativa ($\alpha=0.05$) en comparación con el testigo para cada caso. El mayor efecto se observó en las especies oxidadas Cu₂O (+1), CuSO₄ (+2), que de manera adicional corresponden a los agentes solubles. Lo anterior sugiere promover la PV, al favorecer la difusión del compuesto en el medio y con ello interacción con el organismo. El cobre en sus diferentes estados ofreció desde un 64%, hasta un 95% de inactivación. De manera particular los ensayos efectuados por medio de TDE a HTC registraron desde un 64%, hasta 93%, y desde 79%, hasta 94% para las efectuadas por LIV, mientras que en HAL se obtuvo desde 54%, hasta 82.5% y 38% a 95%, respectivamente (ANEXO VII). De manera contrastiva es posible observar que la técnica de LIV obtiene resultados superiores hasta en 25%.

Exposición a cobre Cu (0)

Los ensayos efectuados a los HTC y HAL evidenciaron que ambos HH son sensibles al cobre metálico. La evaluación efectuada a los HTC mediante LIV registró valores de PV promedio de 90%, mientras que HAL obtuvo un 63%. El metal reportó en todos los ensayos inactivaciones a partir del primer tiempo de exposición (30 min) en todos los casos. Dicha estimación constituye el mayor porcentaje de PV ocurrida para el ensayo, al registrar para HTC desde 65%, hasta 90%, al emplear LIV y 87% a 90% mediante TDE. Por otro lado, las estimaciones efectuadas a HAL resultaron desde 38% a 66% y 56% a 64%, respectivamente (Figura 14-8). Asimismo, los ensayos mostraron un comportamiento

progresivo con respecto a la concentración y tiempo de exposición en ambas metodologías de estimación de PV, La comparación contrastiva señala un aumento hasta de 15% para los ensayos con concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ expuestos a tiempos superiores a 120 min. No obstante, que en todos los casos se observa un color rojizo en los HH de ambas especies, que se intensifica con respecto al incremento de las concentraciones experimentadas evaluadas (ANEXO V).

Los ensayos efectuados a HTC empleando TDE muestran para el primer TE un efecto de PV de un 76-80% para la menor y mayor concentración evaluadas. Asimismo, se evidencia un efecto de inactivación consistente y mantenido durante todo el ensayo. Sin embargo, la curva de inactivación ofrecida por el cobre muestra dos diferentes comportamientos: a) una para 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹, hasta 60 minutos, sin diferencia para el resto de las estimaciones y b) una para las concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ que poseen una curva de inactivación similar a la antes mencionada hasta 60 minutos. Posteriormente ocurre una fase de inactivación sostenida (segunda etapa) y una tercera, donde existe un incremento de la curva de inactivación ocurrida a partir de los 120 min con incrementos de hasta un 20%. Lo anterior sugiere ser consecuencia de alteraciones en la homeostasis ocurrida en el organismo. No obstante, se desconoce su ocurrencia para TC posteriores a concentraciones menores a 0.1 g mL⁻¹.

Por otro lado, los ensayos efectuados a HAL (TDE) muestran en todos los casos una menor sensibilidad al cobre hasta de 22%, en comparación con los obtenidos a HAL, empleando LIV, e inclusive para los efectuados en HTC (por ambas técnicas). La curva de inactivación evidencia un comportamiento similar al señalado por LIV, donde se registraron dos tipos de comportamiento, uno para 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹ y otro para 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹. No obstante ésta técnica si evidencia un incremento de PV de hasta 10% a los 180 minutos, lo cual soporta la hipótesis de PV por alteraciones en la osmorregulación del organismo.

Las pruebas de contacto efectuadas a HAL (LIV) evidencian en todas las concentraciones evaluadas un comportamiento progresivo de PV con respecto a la concentración aplicada, así como con el TC. La curva de inactivación se conforma por dos partes. La primera que presenta la mayor inactivación y que ocurre en todas las concentraciones, que finaliza a los 60 minutos, registrando hasta 70% de PV. No obstante, todos los TC posteriores

presentaron un comportamiento sostenido hasta los 120 min. Sin embargo en tiempos posteriores se observa un incremento hasta 15% con respecto a la inactivación sufrida por los HAL.

Exposición a Cu₂O (+1)

La exposición al óxido metálico reportó una pérdida de viabilidad en las dos especies de helminto evaluadas (HTC y HAL). La inactivación ofrecida por el Cu₂O para HAL fue de un mínimo de 53% y un máximo de 96%, mientras que en HTC fue de 63% a 94%. De manera particular, los HAL (TDE) registraron desde 64%, hasta 97% y 53%, hasta 84%, mediante LIV, mientras que los HTC registraron 65-90% y desde 60-90%, respectivamente. No obstante la Figura 14-9 evidencia una mayor sensibilidad para los HTC al ser evaluados mediante incubación, y registrar desde su primera estimación valores cercanos al 90%. Sin embargo, de manera particular, la mayor capacidad de inactivación ofrecida por el compuesto se encuentra en HAL, al encontrarse en 97%, la cual fue lograda a un TE de 150 minutos y la concentración de 2 g mL⁻¹.

La curva de inactivación muestra el mayor efecto (desde 89%, hasta 94%,) durante el primer TC (30 minutos) para los ensayos efectuados en HTC (LIV), al encontrar en la anterior su mayor incremento (90%), con respecto al resto del ensayo. Los tiempos posteriores reportaron un comportamiento sostenido (menor a 5%), en comparación a la evaluación previa. No obstante, ellos no representan un valor significativo ($\alpha=0.05$), reportando valores <2%, con respecto a los tiempos anteriores. Lo anterior sugiere, que la curva de inactivación del compuesto se genera durante los primeros 30 minutos, al representar el 96% del fenómeno total de desinfección durante dicho TC.

Por su parte, los HTC evaluados mediante TDE evidenciaron un comportamiento de inactivación a partir del primer TE (desde 65.5%, hasta un 78%). Sin embargo, resultaron menores hasta en un 22%, con respecto a los ensayos efectuados con LIV. Asimismo, es visible un comportamiento progresivo de PV con respecto al aumento de concentración del compuesto (ANEXO V). No obstante, la fase de disminución en cuanto a la curva de inactivación se ubica entre 90 minutos y 120 minutos, obteniendo entre un 72% y 92% de inactivación.

De manera contrastiva, los ensayos efectuados para HAL evidencian para LIV un efecto progresivo con respecto a la concentración y tiempo de exposición. Asimismo, la mayor PV se registra durante el primer tiempo de exposición evaluado (30 minutos), la cual se ubicó entre un 64% y un 88%, menor hasta en un 26% (con respecto a HTC). Durante los tiempos posteriores, se observa un incremento en la inactivación <10% con respecto al tiempo de exposición anterior en todos los casos. Asimismo, se observa de manera general la disminución de la curva en 60 minutos para todas las concentraciones (<5%), un posterior incremento en ellas a los 90 minutos (>5%), así como otros a los o a los 150 y 180 minutos con la misma tasa de incremento. No obstante, los comportamientos ocurridos con 0.01 g mL⁻¹ y 0.05 g mL⁻¹, en comparación con lo ocurrido con el resto de éstas (0.1, 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹) resultan diferentes.

Por otro lado, los ensayos de HAL obtenidos mediante LIV evidencian un comportamiento similar al registrado para la misma especie evaluada mediante TDE. Sin embargo, la técnica de tinción registró una menor PV (hasta un 10%). No obstante, se muestra un incremento de la inactivación con respecto al tiempo de exposición y concentración aplicadas a los HH contenidos en el ensayo. La curva de inactivación muestra los mayores resultados al primer tiempo de exposición (30 minutos), registrando desde 53%, hasta 68% (hasta un 15% más de lo registrado mediante LIV). Por otro lado, durante los tiempos posteriores se observa la disminución en cuanto al incremento de la inactivación del HH, durante todas las concentraciones evaluadas. Asimismo, tal como ocurrió en la prueba de LIV, se observa una diferencia de comportamientos para las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹ y otro para 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹. Durante el primer caso se evidencian comportamientos oscilatorios <5% para los TE correspondientes a los intervalos de 90 minutos y 120 minutos (con respecto al registrado a los 30 min), mientras que para el segundo caso (correspondientes a las concentraciones superiores) se obtiene un incremento de hasta 10% de PV, ocurrido particularmente durante la revisión de 90 min y 180 min. El porcentaje de inactivación ofrecida por el agente durante el último tiempo de evaluación se ubicó desde un 60%, hasta un 77%, lo cual representa hasta un 19% menos de inactivación, en comparación con la técnica de LIV. Sin embargo, la Lo anterior sugiere, que la TDE, no es precisa para evaluar el fenómeno de la PV experimentado por contacto con Cu₂O.

Asimismo, que la respuesta de inactivación es diferente en ambas especies, siendo HTC la particularmente más sensible. No obstante que el valor máximo registrado para el ensayo fue obtenido en HAL. De manera adicional, no se descarta que el fenómeno de inactivación se encuentre finalizado, dados los picos de inactivación ubicados en los últimos TE y que se observan en la Figura 14-9. Dicho incremento, sugiere un incremento de la curva de inactivación ofrecida por el agente evaluado y con ello un aumento en la PV.

Exposición a $CuSO_4 (+2)$

Los resultados derivados de las pruebas de contacto sobre HTC y HAL empleando el agente con contenido de cobre (+2) indica en todos los casos (los tiempos de exposición y concentraciones), así como para ambas metodologías de estimación, un efecto de PV significativa ($\alpha=0.05$) en comparación con el testigo. De igual manera se observa una PV asociada a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Los HTC resultaron ser más sensibles al agente, al registrar desde 46%, hasta 91%, en comparación con las pruebas efectuadas sobre HAL, donde se obtuvo desde 54%, hasta 85%. Particularmente, los HTC obtuvieron mediante TDE un mínimo de PV de 79%, hasta un máximo de 91%, mientras que por medio de LIV registraron desde 46%, hasta 91%. Por su parte, dicho comportamiento también se vio reflejado en HAL, donde se evidenció una inactivación desde 65.5%, hasta 86% y 54%, hasta 78%, respectivamente.

Los HTC resultaron ser más sensibles en las estimaciones efectuadas mediante LIV al reportar entre 85% y 91% durante su primera medición (30 minutos). De hecho, el intervalo de inactivación registrado (cercano al 90%) fue observado y mantenido durante todos los tiempos y concentraciones posteriores (hasta llegar a 180 min). El incremento desde la segunda estimación, hasta la última fue <5%, no obstante que dicha tendencia es progresiva con respecto al TC y el aumento de la concentración aplicada. Sin embargo, la curva de inactivación ofrecida por el metal se conforma en aproximadamente 95% durante el primer TE (30 min), restando solo el 5% del efecto ejercido por el metal durante los tiempos restantes.

Por su parte, los HAL evaluados mediante LIV evidencian durante el primer TE una inactivación entre 65% y 73%, correspondiente a valores de entre el 80% y 90% de la PV

ocurrida en todo el ensayo. En dicha medición (30 min) se registraron valores superiores a las menores concentraciones evaluadas (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹). Lo anterior apunta, a los procesos de inactivación ocurridos en otros organismos bacterianos, donde la aceptación de un exceso de metal usualmente deriva en el daño irreversible por intoxicación del organismo (Carrasco, 2000). Dicho proceso resulta usual en un medio de concentración no saturado, ya que la presencia masiva de metal deriva en la eventual incapacidad de regulación por el organismo. No obstante, las concentraciones restantes 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ evidencian un porcentaje de PV menor, hasta en 10%. Sin embargo se incrementan con respecto al aumento de TC, superando en todos los casos la inactivación hasta en 20%, con respecto a las primeras concentraciones. La curva de inactivación evidencia el mayor resultado para el primer tiempo de exposición, resultando en todos los ensayos un resultado similar a la anterior estimación. No obstante todos los ensayos para TC posteriores registraron incrementos en su PV, ocurriendo particularmente para las concentraciones (0.5, 1 y 2 g mL⁻¹) a 150 y 180 min, registrando entre 62%, hasta 85%. Lo anterior sugiere que la PV ofrecida por el compuesto podría incrementarse para tiempos posteriores a 180 min. La curva de inactivación muestra los mayores resultados al primer tiempo de exposición (30 minutos), registrando aproximadamente el 70% de la PV total, acumulando el resto durante las siguientes estimaciones, a razón >5% para cada una.

Por su parte los HAL evaluados mediante TDE presentaron una menor sensibilidad en comparación con el resto de los ensayos efectuados para CuSO₄. Los resultados de inactivación fueron hasta 30% menores, con respecto a los obtenidos con HAL y HTC estimados mediante LIV, y hasta un 20% con respecto a HTC (TDE).

Las curvas de inactivación generadas para cada concentración evidencia en todos los casos el mayor incremento durante los primeros 30 minutos, al registrar entre 50% y 78% de PV. No obstante el mismo comportamiento descrito para los HTC ocurrió para las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹, durante los primeros 30-90min. De igual manera, sucedió para los efectuados empleando 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹, donde el incremento ocurre a partir de 90 min. No obstante, las estimaciones posteriores a 30 min obtienen resultados con incrementos <5% para los siguientes TC. Lo anterior sugiere, que la TDE por sí misma no es capaz de describir el fenómeno de inactivación derivado del contacto

por el metal. Sin embargo, explica algunos fenómenos particulares derivados de la su inclusión, particularmente en concentraciones pequeñas, tal como se observa en la Figura 14-10. Asimismo, que la penetración del metal, no necesariamente se refleja en la pérdida de la capacidad de regulación del HH (TDE y HAL).

5.1.6 Ensayos de exposición a hierro

Los resultados de la exposición de los HH al agente metálico alcanzó para HTC una PV mínima de 46% y una máxima de 93%, mientras que los HAL obtuvieron desde 37%, hasta 93%. Adicionalmente, se observó que los HAL resultaron menos sensibles al agente. De manera particular, se registraron valores diferentes durante la aplicación de ambas técnicas de estimación de viabilidad, siendo significativas ($\alpha=0.05$) con respecto al testigo en todos los casos. Por su parte, los HH sometidos a Fe (0) consiguieron para HTC una inactivación desde 51%, hasta 91% y de 37-89% en HAL. El FeS_2 (+2) alcanzó en HTC 51-93% y para HAL un 48-82%, mientras que, el FeSO_4 (+2), obtuvo desde 46-93% y 68-89%. Finalmente, la aplicación de Fe_2O_3 (+3) logró 64-93% en HTC y 54-93% para HAL.

Asimismo se encontró que los compuestos con un estado de oxidación ofrecen un mayor efecto en ambos casos, encontrando diferencia de hasta 25% en comparación con el estado metálico, que sugieren ser consecuencia de la solubilidad del agente, así como de los mecanismos de acción involucrados, donde ellos facilitan la interacción con el organismo.

Exposición a Fe (0)

Los resultados de exposición de los HH al agente metálico arrojaron sensibilidad (PV) en todos los casos evaluados. Los HTC evidenciaron una mayor PV con hasta un 20% más de inactivación en comparación con los HAL. Asimismo se encontró, que ambas técnicas resultan en comportamientos gráficos diferentes (ANEXO V).

Los HTC (LIV) mostraron el mayor efecto sobre la viabilidad con respecto al resto de los ensayos efectuados a los HH. La inactivación ofrecida por el hierro (0) fue desde un mínimo de 87%, hasta 91%, la cual ocurrió durante el primer TC, correspondiente a 30 minutos. Dicho comportamiento se observó de manera sostenida para los siguientes tiempos evaluados (60-180 min). No obstante existe un incremento <2% para los TC

referidos anteriormente. Sin embargo, la curva de inactivación se encuentra descrita durante los primeros 30 minutos, al ocurrir hasta el 98% del fenómeno durante dicha medición.

Los ensayos efectuados para la misma especie estimados mediante TDE, evidenciaron una menor inactivación (desde un 16%, hasta un 60%). La mayor PV fue registrada durante su primer periodo 30 min, alcanzando valores cercanos a 55-60% para todas las concentraciones evaluadas. Durante los TC posteriores, correspondientes a 60 min y 90 min mostraron un incremento de la PV, con respecto a los tiempos anteriores <5% en todos los casos. Los tiempos restantes (120 a 180 min) manifestaron dos tipos de comportamientos: a) las concentraciones correspondientes a 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹ obtuvieron comportamientos similares a los obtenidos en los tiempos anteriores, al solo registrar inactivaciones <5% para todos los casos, lo cual sugiere la evaluación completa del fenómeno y b) las relativas a 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ que evidencian un incremento de hasta 10%, alcanzando valores entre 80% y 85%.

Por otro lado, los ensayos efectuados para HAL estimados mediante LIV refleja un efecto progresivo relacionado con el incremento de las concentraciones y los tiempos de exposición que van desde 37%, hasta 77%. La mayor PV se registró durante los primeros 30 minutos de la prueba, al alcanzar entre 39% y 61%, correspondiente a la menor y mayor concentración expuesta. Posteriormente el incremento de la inactivación se evidencia para los tiempos posteriores de 60 y 90 minutos con hasta un 10% de incremento de la PV en cada caso. Dicha tendencia progresiva continúa hasta alcanzar los valores máximos que se presentaron entre 150 min y 180 min con inactivaciones cercanas al 70% para todos los casos. No obstante las concentraciones 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹, evidencian una mayor capacidad de inactivación hasta 78±13% ante los HAL. Lo anterior parece ser consecuencia de la relación existente entre la osmorregulación metálica permitida en algunos casos y la oligodinamia que presenta el metal ante los huevecillos. Las concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ logran una menor inactivación hasta de 14% (Figura 14-4). No obstante, los resultados estadísticos reflejaron incertidumbre de hasta 40%, lo cual sugiere ser consecuencia de la disponibilidad del agente en el medio. Sin embargo, los resultados obtenidos para 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹ sugieren la posibilidad de la continuación del fenómeno de inactivación para tiempo posterior al comprendido en el ensayo efectuado.

Finalmente, los HAL (TDE) registraron una PV para todas las concentraciones evaluadas. Se observó un comportamiento diferente para las tres primeras concentraciones (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹) y otro para las tres restantes (0.5, 1 y 2 g mL⁻¹). La primera medición (30 minutos) mostró un porcentaje de inactivación de 53%, hasta 68% encontrando los mayores resultados a las menores concentraciones. Adicionalmente las siguientes estimaciones obtuvieron un incremento menor al 5% durante cada una de ellas. La curva ofrecida por el metal se completó a los 120 min y registró una PV entre 60% y 70%, ofreciendo una inactivación mayor a las concentraciones 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹. Asimismo se evidenció el incremento de la PV, con respecto al aumento de la concentración del metal. Sin embargo, tampoco fue mayor al 5% con respecto a la medición anterior. La curva correspondiente ocurre mayoritariamente durante los primeros 30-60 min de TE, obteniendo entre 60% y 70% de la misma durante dicho periodo. No obstante, se muestran picos de incremento de inactivación (alcanzando hasta 85%) ocurridos a los 90 min y 120 min. Los anteriores pueden ser consecuencia de la aceptación del metal por fenómenos de osmorregulación, tal como se reporta en otros organismos (bacterias o protozoarios) (Carrasco, 2000), o bien, tratarse de un comportamiento anómalo.

Exposición a FeS₂ (+2)

Los resultados de exposición al agente mostró sensibilidad en todos los casos evaluados. Los HTC mostraron una mayor PV, se registró hasta un 8% más de inactivación en comparación con los HAL. Los HTC registraron mediante LIV entre 81-88% y 51-90% por medio de TCE, mientras que la evaluación para HAL obtuvo 53-83% y 48-69%, respectivamente. Asimismo se evidenció que ambas técnicas de estimación resultan en comportamientos de inactivación diferentes. No obstante, es posible visualizar una respuesta de inactivación en cada caso, con respecto al incremento de la concentración y tiempo de exposición.

La inactivación registrada para HTC (LIV) al primer tiempo de evaluación correspondiente a 30 minutos fue la mayor obtenida (87-91%). Posteriormente se observó un incremento de la PV, aunque menor a 5% en todos los casos. Dicho comportamiento se observó hasta llegar a al final del ensayo. Sin embargo los primeros TC obtuvieron los mayores efectos

sobre la PV con las menores concentraciones evaluadas (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹). La curva de inactivación se encuentra descrita para todas las concentraciones en un 90% durante los primeros 30 minutos de TC. Sin embargo existe una mayor sensibilidad hacia el agente para primeras concentraciones evaluadas durante toda la prueba.

Los mismos organismos, pero evaluados mediante TCE reportaron una menor PV, hasta en 20%. Sin embargo ellos también registraron un incremento de la inactivación en relación al aumento de la concentración y TC. Igualmente el mayor efecto sobre la inactivación se observó durante la primer medición, al registrar valores entre 48% y 80%, ante la exposición a la concentración menor y mayor empleadas, respectivamente. No obstante resultaron dispersos. Dichos valores, corresponden a los valores máximos obtenidos durante ésta prueba, correspondientes a tiempo y concentración. Las siguientes estimaciones registraron incrementos de la PV entre 10-18%, particularmente para los ensayos con las concentraciones más altas. Asimismo, durante ellas (90-120 min) se registraron picos para las concentraciones menores ensayadas (0.01, 0.05, 0.1 g mL⁻¹). No obstante, las concentraciones (0.5, 1 y 2 g mL⁻¹) evidenciaron los mayores porcentajes de inactivación para el resto de los TC.

Con respecto a la curva de inactivación se observó que ésta ocurre de igual manera en forma mayoritaria durante los primeros 30 minutos, al describir el 80% del fenómeno en dicho intervalo, lo cual apunta a la solubilidad del agente y su interacción con los HH.

Por otro lado, los ensayos efectuados a HAL evaluados mediante LIV evidencian durante el primer TC una inactivación entre 65% y 73%, correspondiente al 80% y 90% de la inactivación ocurrida durante todo el ensayo. En dicha medición (30 min) se registraron valores superiores a las menores concentraciones evaluadas (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹), al igual que ocurrió en HTC y menores para las concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹. Lo anterior concuerda con los procesos de inactivación ocurridos en otros organismos bacterianos, donde una aceptación moderada de metal usualmente deriva en daño del organismo (Carrasco, 2000). No obstante los valores registrados de inactivación incrementan con respecto al aumento del TC, superando en todos los casos a las primeras concentraciones evaluadas, hasta en un 20%.

En contraste, las evaluaciones para TCE resultan en mayor inactivación, con respecto a la prueba de LIV, particularmente para TE superiores a 60 min. De hecho, la mayor inactivación se encuentra en la primer medición, al registrar en promedio entre 48% y 78%, dónde el incremento de la concentración implicó una menor inactivación para las concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 g mL⁻¹), las cuales manifestaron la mayor PV. La anterior relación de la inactivación y concentración se mantiene hasta los 120 minutos para todas las concentraciones antes mencionadas. Sin embargo, cada medición posterior a 30 minutos reporta un incremento en la PV <5% para las primeras tres primeras concentraciones evaluadas (0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹) durante todos los TE. El resto de las concentraciones (0.5, 1 y 2 g mL⁻¹) presentan un porcentaje de inactivación superior al 5%, resultando en una mayor PV con respecto a las primeras concentraciones, tal como ocurrió en LIV. La curva de inactivación se representa con las dos primeras estimaciones, con valores entre 58-78%, donde dicho intervalo se expresa el fenómeno derivado del contacto con metal.

Exposición a FeSO₄ (+2)

Los resultados de exposición directa del agente sobre los HTC y HAL indica un efecto de PV ($\alpha = 0.05$) en todas las evaluaciones con respecto a los tiempos de exposición y concentraciones para ambas metodologías empleadas, en comparación con el testigo para cada caso.

Los HTC resultaron ser más sensibles durante la evaluación por LIV, en comparación con los HAL. Los HTC registraron desde 89%, hasta 92% por LIV y 65-90% por LIV. Por su parte, los HAL alcanzaron desde 65.47%, hasta 85.88% y desde, 58.33%, hasta 89.58%, respectivamente.

Los HTC tuvieron a partir del primer TE la mayor PV estimada por medio de incubación, registrando en promedio un $89 \pm 3\%$ para todas las concentraciones, lo cual corresponde al máximo valor para dicho TE con respecto al resto de los ensayos efectuados con el agente metálico. Dicho comportamiento de inactivación se mantuvo en porcentajes similares de PV ($\approx 89\%$) para el resto de las mediciones efectuadas hasta finalizar la prueba (180 min), lo cual señala que no existe una diferencia significativa con respecto a la concentración y

tiempos de exposición entre ellos, señalando en un 95% la curva de inactivación durante los primeros 30 min, desde concentraciones $\geq 0.01 \text{ g mL}^{-1}$. No obstante, si existió diferencia significativa con respecto al testigo en todos los casos.

Por otro lado, las estimaciones efectuadas por medio de TDE para los mismos organismos, resultaron en PV menores en comparación a la estimación efectuada por LIV. La inactivación registrada para el primer SE TE encontró entre 53% y 85%, para las concentraciones más baja (0.01 g mL^{-1}) y más alta (2 g mL^{-1}) evaluadas, respectivamente. Durante la siguiente medición (60 min), presentó un incremento de hasta un 40% para las concentraciones ($0.5, 1 \text{ y } 2 \text{ g mL}^{-1}$) ubicando valores de entre 68% y 88%, respectivamente, mientras que en $0.01, 0.05 \text{ y } 0.1 \text{ g mL}^{-1}$ resultaron ser de 20-30%. Dicho comportamiento fue observado con la misma tendencia para las siguientes TE, observándose en promedio de incremento de 3-4% de incremento en cada TE, mostrando el efecto máximo a los 180 min para todas las concentraciones (80-90%). Sin embargo, la desviación estándar mostrado durante dicho TE fue considerable para todos los casos (5-10%).

Por otro lado, las estimaciones hechas a HAL mediante TD resultaron mayores para el primer TE, hasta en un 13% en comparación con las efectuadas mediante incubación, observando en ambas técnicas una PV que aumenta con respecto a la concentración y al el tiempo de exposición. La misma prueba evidenció para el resto de los TE valores entre 50% y 70% para todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, durante los tiempos superiores a 90 min se registró un incremento en la PV, hasta en 20%: Dicho comportamiento es constante para los tiempos posteriores de evaluación. No obstante durante el último TE, correspondiente a 180 min, se mostró un comportamiento progresivo con una pronunciada desviación estándar, lo cual sugiere que el efecto inducido por el metal no refleja su capacidad máxima de inactivación, o bien la capacidad del organismo de revertir el efecto tóxico ejercido por el compuesto metálico. Igualmente, los HAL evaluados mediante LIV evidencian durante el primer TE una inactivación entre 73% y 78%, siendo las concentraciones $0.5, 1 \text{ y } 2 \text{ g mL}^{-1}$ las que presentan los mayores valores de inactivación. Asimismo, es visible la tendencia evidenciada a partir de un TE de 60 min, dónde se incrementa el efecto de la inactivación con respecto al incremento de la concentración y el tiempo de exposición, ubicando una PV de hasta 3% durante cada TE.

No obstante, para tiempos de 150 y 180 min. La PV alcanzada fue ubicada entre 70 y 80%. Los ensayos referidos anteriormente muestran una desviación estándar de hasta 15% en las primeras mediciones y 8% durante los últimos TE (150 y 180 min), respectivamente. Por su parte, los HAL evaluados mediante TDE resultaron menos sensibles en comparación con el resto de los ensayos efectuados para FeSO_4 , evidenciando inactivaciones menores de hasta un 30%, con respecto a HTC y HAL evaluados mediante LIV y hasta un 20% con respecto a HTC mediante TDE. Igualmente, la curva de inactivación evidencia todas las concentraciones evaluadas el mayor incremento durante los primeros 30 minutos, al registrar entre 50% y 78% de PV. Sin embargo, de manera particular para los casos 0.01, 0.05 y 0.1 g mL^{-1} ésta se extiende de manera progresiva hasta los 90 min, aunque en porcentajes mejores al 5% para cada TE posterior, mientras que para las concentraciones superiores 0.5, 1 y 2 g mL^{-1} no se observa un incremento considerable estadísticamente, logrando solo un 3% adicional para el tiempo máximo de exposición (Figura 14-7). Lo anterior sugiere que el efecto máximo ejercido por el agente metálico ha sido alcanzado para dichas concentraciones. No obstante para las concentraciones inferiores tienen desviaciones estándar en su mayoría de las estimaciones, donde en algunas ocasiones son de hasta 10%. Dicha fenomenología corresponde a un efecto débil sobre el organismo, que usualmente resulta reversible.

Lo anterior se concluye al no contar con mediciones posteriores que señalen comportamientos similares al TE anterior, o bien por no contar con el efecto ejercido a tiempos posteriores a los definidos durante el ensayo. Asimismo, es concluyente que la TDE por sí misma no es capaz de describir el fenómeno de inactivación derivado del contacto con el metal. Sin embargo, explica algunos sucesos particulares derivados de la inclusión del metal hacia el interior del HH, lo cual ocurrió en ambos casos, particularmente en concentraciones menores (0.01, 0.05 y 0.1. Asimismo, que la penetración del metal, no necesariamente se explica íntegramente la causa de la PV por modificación en la osmorregulación del HH (TDE y HAL).

Exposición a Fe_2O_3 (+3)

Los HH de ambas especies expuestas al óxido contenido de hierro (+3) evidenciaron efecto sobre la viabilidad de éstos. El porcentaje de inactivación ofrecido por el Fe_2O_3 en el caso

de HTC fue de 64% a 93%, mientras, que para los HAL resultaron ser de 51.5%, hasta 85%. Particularmente, los HTC resultaron más sensibles al obtener desde 87% a 93% mediante TCE y desde 64%, hasta 91% para LIV, mientras, que los HAL obtuvieron desde 59%, hasta 82%, así como, 51.5%, hasta 84%, respectivamente.

El comportamiento de inactivación observado durante el ensayo para los HTC mediante LIV evidenció durante el primer TE (30 minutos) el mayor porcentaje de inactivación con respecto a su tiempo anterior, al obtener entre 88 y 90%. Los mayores resultados de inactivación fueron registradas en el siguiente orden 0.05, 0.5, 0.01, 1, 2 y 0.1 g mL⁻¹. No obstante, que las diferencias de PV entre éstas fueron >2%. A tiempos posteriores se registraron valores similares (entre 88% y 93%) para todas las concentraciones evaluadas. De igual manera se observaron diferencias menores al 2%. No obstante, el orden de las inactivaciones ofrecida se observa superior durante las tres primeras mediciones correspondientes a 0.01, 0.05, 0.1 g mL⁻¹, mientras que para los siguientes 90-180 se observan mayores valores para las concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹.

La curva de inactivación ocurre durante los primeros 30 minutos, al obtener hasta el 98% de toda la PV ofrecida por el compuesto para las concentraciones evaluadas. No obstante es visible una respuesta de la PV del huevecillo ante el aumento de la concentración y tiempo de exposición, No obstante, que la PV sea menor al 5% para los tiempos posteriores (entre éstas).

Los ensayos efectuados mediante TCE muestran de igual manera la mayor PV durante el primer TE, al registrar entre 65% y 84% para la menor y mayor concentración, respectivamente. El resto de las concentraciones (0.05, 0.1, 0.5 y 1 g mL⁻¹) se ubicaron dentro de dicho intervalo, donde pudo apreciarse un incremento de la inactivación con respecto a la concentración del agente con contenido metálico. Durante los siguientes TE (60, 90 y 120 min) se registró una inactivación similar a la obtenida en su tiempo anterior (no mayor al 5%) para cada concentración. Sin embargo, es visible un incremento de la PV, principalmente para las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 g mL⁻¹, al inclusive evidenciar valores de inactivación cercanos (menor al 2%), en comparación con los resultados obtenidos para 1 y 2 g mL⁻¹. Por otro lado, los resultados en 150 y 180 min muestran un incremento en la PV ofrecida por las concentraciones, en particular para 0.1 y 0.5, 1 y 2 g

mL^{-1} , ya que lograron en promedio los mismos porcentajes de inactivación (84%). Finalmente, el último TE (180 min) mostró un resultado similar al obtenido durante el primer TE, al obtener una mayor inactivación al incrementar la concentración del agente, aunque con un mayor porcentaje de PV, con respecto al primer resultado registrado. Dicha diferencia sugiere que el fenómeno puede no encontrarse descrito en su totalidad durante el tiempo de prueba efectuado.

De igual manera, los ensayos efectuados a HAL estimados mediante TDE muestran en todos los casos una menor sensibilidad al óxido, hasta 25%, evidenciando el mayor porcentaje de PV durante el primer TE (desde 60%, hasta 82%), en comparación con el tiempo anterior. Asimismo se evidenció la sensibilidad ante la exposición a diferentes concentraciones durante todo el ensayo, al obtener resultados de inactivación en todas las mediciones efectuadas. Se encontró que las concentraciones 0.01, 0.05 y 0.1 g mL^{-1} registraron efectos de PV menores al 10%, desde 30-120 min, en comparación con las evaluaciones efectuadas a concentraciones superiores. Dicho fenómeno se presentó para todos los TE. Asimismo, se observa dentro de la curva de inactivación valores similares desde los 90-180 min, encontrando diferencia menor a 5% con respecto a su evaluación anterior. No obstante, el mayor porcentaje de inactivación fue observado durante los primeros 60 minutos (61-83%), mientras que para el resto (90-180 min) de las TE logró entre 64 y 74% (Figura 14-6). Lo anterior sugiere en conjunto la aceptación del metal en concentraciones bajas, así como su regulación al paso del tiempo, lo cual evita el efecto tóxico producido por el compuesto.

Por otro lado, los ensayos estimados mediante TCE para los mismos HAL muestran el mayor porcentaje de inactivación (51-83%) durante la primera estimación (30 min), en comparación con su tiempo anterior. Durante el siguiente TE fue observado un incremento de la inactivación hasta en 25%, alcanzando una PV entre 68% y 84%. Dicho comportamiento de inactivación se encontró para el resto del ensayo (entre 60 y 80%). No obstante los porcentajes de inactivación obtenidos para las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 g mL^{-1} resultaron muy cercanas o inclusive superiores a las concentraciones de 0.5, 1 y 2 g mL^{-1} para las estimaciones efectuadas entre 30-120 min. Sin embargo, los TE restantes

(150-180 min) evidenciaron para las concentraciones 0.5, 1 y 2 g mL⁻¹ valores de inactivación superiores de hasta en 15%.

La curva de inactivación se pronuncia durante los primeros 60 min. Sin embargo, los tiempos restantes no evidencian cambios superiores a 10% con respecto al tiempo anterior. Sin embargo, se observan diferencias de inactivación entre los tiempos correspondientes a 150 y 180 min, lo cual sugiere que la capacidad máxima de inactivación otorgada por el metal en cada concentración no se encuentra agotada.

5.1.7 Mecanismos involucrados en la inactivación con AM, Ag, Cu y Fe

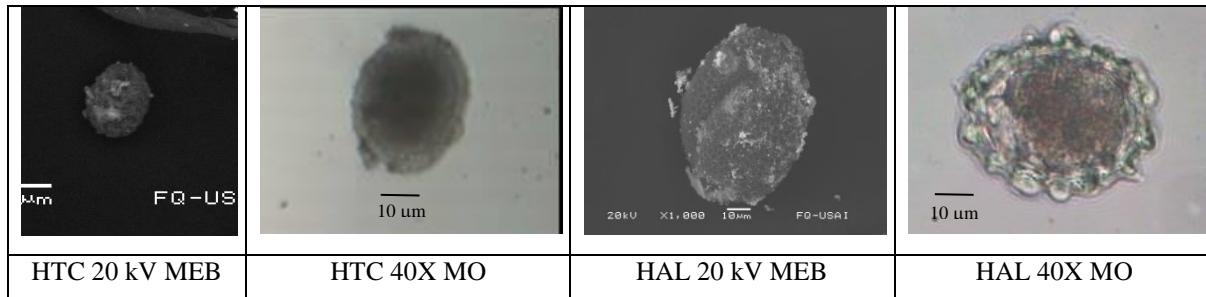
La explicación del mecanismo de inactivación inducido por el contacto con metales aún no se encuentra descrita para HH en ninguno de los casos. Su esclarecimiento presenta problemas en cuanto al uso de las técnicas preexistentes y comúnmente empleadas en otros organismos, como consecuencia del tamaño y la naturaleza de las estructuras que poseen los huevecillos. Por ello, su estudio se efectuó de manera directa e indirecta empleando TCE, LIV, MO y SEM. Con base en un análisis integral de las cuatro técnicas antes mencionadas, se encontró que la inactivación ocurre en las capas, solución hialina y núcleo. En ellos se encuentran involucrados las capas, la solución hialina y el núcleo y se relaciona con la interacción del metal con sus componentes (lípidos, proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos). La interacción ocasiona que se modifican la conformación de las capas, la capacidad de osmorregulación, la naturaleza física y química de los componentes que conforman al HH y la inactivación de procesos, así como de las vías metabólicas.

El contraste de las técnicas de estimación de viabilidad sugiere que la técnica de TCE refleja principalmente la modificación de la osmoregulación inducida por el agente. Lo anterior sugiere para evaluar el accionar sobre las capas externas del organismo. No obstante, que esta no necesariamente implique la inactivación del mismo. Por otro lado, la LIV puede estimar los efectos ocurridos al interior del organismo y eventualmente la letalidad de los externos, como de los internos. Asimismo, cada agente evaluado evidenció diferentes fenomenologías en cuanto al efecto producido sobre el HH y en la capacidad de inactivación. Por ello, es conveniente efectuar la descripción y análisis de cada uno de ellos.

5.1.7.1 Mecanismo de acción sugerido para plata 0

La presentación de la granalla de plata no facilita su disolución. Sin embargo, las pruebas de inactivación evidenciaron para ambas especies un porcentaje de PV delimitada de entre 15 y 42% (en ambos casos), encontrando una correspondencia de su incremento con los tiempos de exposición y concentración empleada. No obstante, que el medio acuoso promueve la existencia iones +1 derivada del contacto con el medio. Orta et al., (2008) señalan para el caso de la plata, a las interacciones de iones metálicos con proteínas sulfuradas como las principales responsables de la inactivación en HH (Figura 12-1 y Figura 12-13). Asimismo, el mecanismo de inactivación sugerido pudiera relacionarse con el paso de la plata a través de la cubierta, ya sea por los espacios y/o fracturas que usualmente muestran los HH y que emplean para funciones de osmorregulación. Lo anterior se sugiere, ya que el contraste de ambas técnicas de larvado no refleja el mismo resultado numérico derivado de la capacidad de osmorregulación del organismo. Por ello, una vez adentro, pueden ubicarse en la solución hialina, o bien, migrar hacia el núcleo del organismo, donde su presencia puede tener un impacto en la generación de la larva (impactando al material genético). De hecho, Pham et al., (2012), mencionan, que estudios de contacto con plata efectuados en bacterias (*Escherichia coli* y *Salmonella* gen. sp.) han identificado la formación de compuestos complejos en los ácidos nucleicos. De hecho, una propuesta de inactivación también se constituye de la adhesión del metal a algunos aminoácidos proteínogénicos con contenido de azufre, como la cisteína y la metionina que resultan esenciales, ya que el adenosil-metionina sirve como donante de metiles en reacciones de transferencia como intermediario y también en la biosíntesis de la cisteína, fosfatidilcolina y algunos otros fosfolípidos (Nelson y Cox, 2005), la cual posteriormente es convertida en S-adenosilmetionina (SAM) por la metionina adenosil-transferasa, que son importantes en el mantenimiento de las condiciones de aislamiento en las cubiertas de protección de los organismos con el medio. Por ello, la inclusión en dichos aminoácidos condiciona el mantenimiento de la homeostasis del organismo. De manera adicional, cabe destacar que, la metionina es el único aminoácido que tiene por un único codón (AUG), que es también la señal de inicio del mensaje para que el ribosoma comience la traducción de una proteína desde el RNAm (Jenkins, 1997), tal como se muestra en la (Figura 5-15).

y Figura 5-16). Lo anterior sugeriría que el impacto de la plata podría influenciar el desarrollo de la larva y con ello la viabilidad del organismo, al no permitir su correcto larvado. No obstante, los autores mencionados anteriormente señalan que los mecanismos involucrados en la inactivación a nivel nucleico no son claros.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-15. Efecto de plata metálica (Ag^0) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

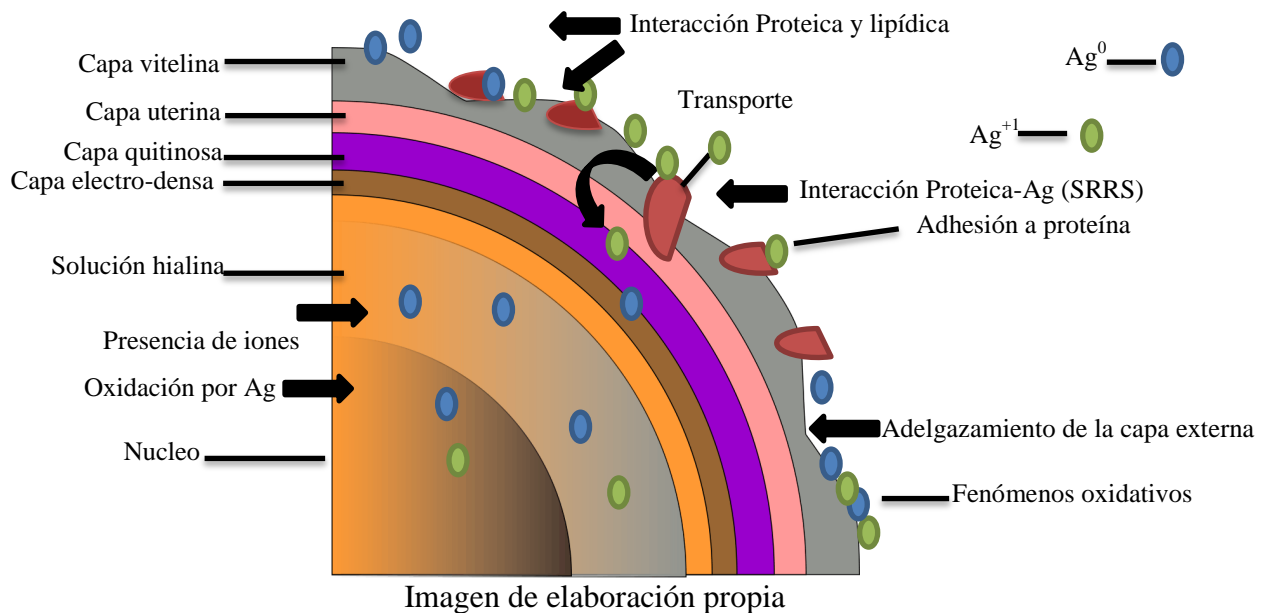


Figura 5-16 Mecanismo propuesto para la inactivación con Ag^0

5.1.7.2 Mecanismo de acción sugerido para plata +1

El uso de plata +1 explorado mediante el uso de plata coloidal grado comercial (3500 ppm), Ag_2O y $AgNO_3$, donde el primero se considera como una combinación de $Ag(0)$ y $(+1)$, mientras que los otros dos compuestos contienen $Ag(+1)$ en un 99.99%, según la información referida por el fabricante. Los resultados obtenidos mediante las pruebas

estimación de viabilidad (TDE y LIV) son diferentes numéricamente. No obstante, que ambos casos resultan en una PV derivada de los iones de la plata en solución, que impactan sobre la viabilidad del HH con respecto al incremento de la concentración y tiempo de exposición. La utilización de plata coloidal no evidenció ningún efecto visible de tipo morfológico mediante MO, Sin embargo la MEB registró la presencia del agente en la cubierta del organismo (Figura 12-2, Figura 12-3, Figura 12-4, Figura 12-15 y Figura 12-16). Lo anterior sugiere, que el medio de entrada por el cual se derivó la inactivación del HH ocurrió por los mecanismos anteriormente mencionados en 5.1.7.1. No obstante, el porcentaje de PV fue inferior al obtenido mediante otros compuestos con contenido de plata.

Por su parte, los ensayos de exposición efectuados con Ag_2O y AgNO_3 evidencian en HTC y HAL comportamientos similares en cuanto a la PV. Dichas características, tales como la acumulación del agente metálico (Figura 12-2, Figura 12-3, Figura 12-4, Figura 12-15 y Figura 12-16), adhesión al HH, adelgazamiento de la capa externa, así como captación del metal (mediante la coloración de los componentes del huevo) (Figura 5-17), las cuales, en conjunto se acentúan con respecto al incremento del tiempo de exposición y concentraciones aplicadas en el ensayo. La PV sugiere ser consecuencia de las modificaciones antes mencionadas, que son causadas por la interacción de los componentes del huevo con el metal. Pham et al., (2012) señalan que los agentes con contenido de plata $+1$ actúan sobre las enzimas y proteínas como disruptores de procesos celulares. Su naturaleza electronegativa favorece su adhesión en la superficie del organismo, donde la Ag^{+1} reacciona en particular con los grupos amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$) y sulfhidrilo ($-\text{SH}$). Su acumulación potencia su poder oxidante al combinarse con oxígeno (particularmente observable en el AgNO_3), modificando los mecanismos de transporte de membrana y la fuerza motriz protónica, promoviendo la entrada del agente. Orta et al., (2008), mencionan en estudios de inactivación con agentes oxidados de plata forman compuestos complejos que inactivan enzimas superficiales responsables de la respiración. Sin embargo, las biomoléculas se encuentran a nivel capa, como solución hialina y núcleo. Por ello, los iones plata podrían actuar también como venenos protoplasmáticos que al unirse con las proteínas forman enlaces R-S-S-R interrumpiendo con ello la transferencia

de electrones, ya que el enlace S-Ag es sumamente estable, tal como lo sugiere Orta et al., (2008) al exterior de algunas bacterias. Lo anterior sugeriría la presencia de procesos similares en la solución hialina del HH causantes de la inactivación del organismo y eventualmente en los ácidos nucleicos, como lo señala Pham et al., (2012). Dicha interacción afecta al metabolismo en los procesos metabólicos por la inactivación proteica (mediante unión a proteínas), así como el envenenamiento enzimático y la capacidad de osmorregulación.

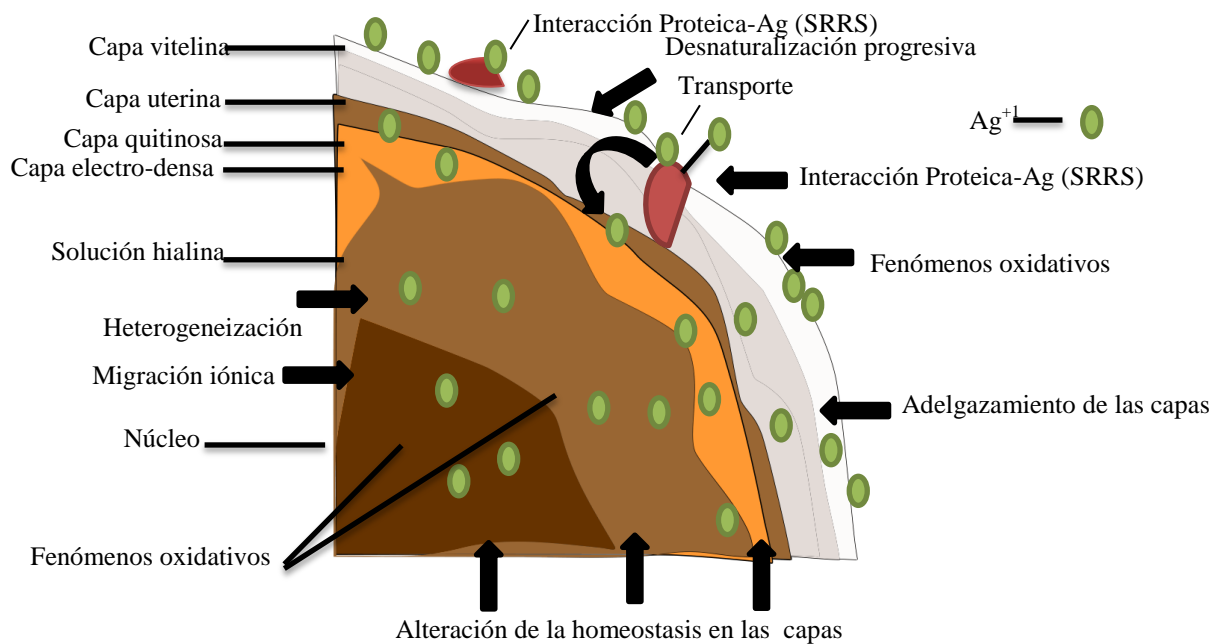


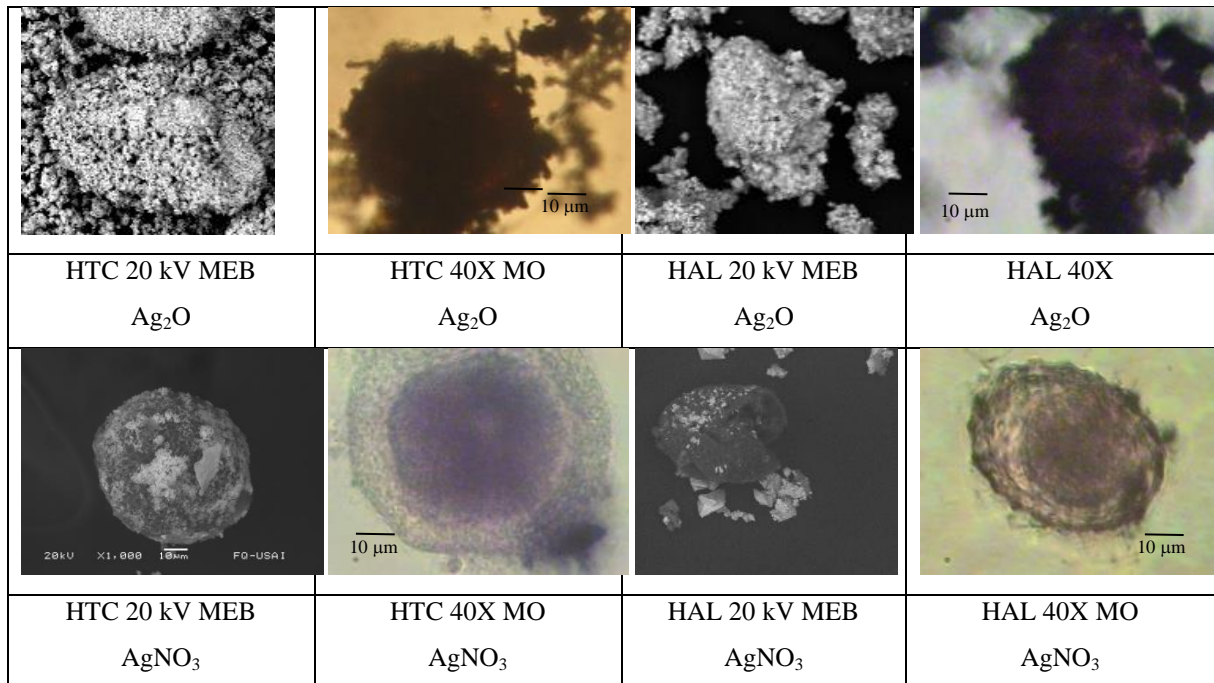
Imagen de elaboración propia

Figura 5-17. Mecanismo propuesto para la inactivación con Ag^{+1}

Diversos autores, tales como: Davies and Etris, (1997); Aguilar et al., (2006) y Chaloupka, (2010) han señalado, que los compuestos metálicos suelen interactuar de manera estable con los ácidos nucleicos (ADN y ARN); inclusive llegando a ser insolubles y difíciles de eliminar por vías comunes.

El $AgNO_3$ brinda un mayor poder de PV, en comparación con el Ag_2O , lo cual sugiere la relevancia de la solubilidad del compuesto, y por ende su concentración iónica y su relación con la capacidad (facilidad) de interactuar con el HH. Asimismo, la prueba también sugiere, que la sobresaturación del medio no necesariamente relaciona directamente el poder de

inactivación ofrecido por éstos (Figura 5-18). Lo anterior apunta a la importancia de los procesos oxidativos ocurridos en el exterior, así como a la relevancia de los acontecidos en el interior del organismo (solución hialina y núcleo), los cuales también promueven la PV del HH y que pueden ser observados directamente en el incremento de la inactivación, tal como se evidencia en la Figura 5-18.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

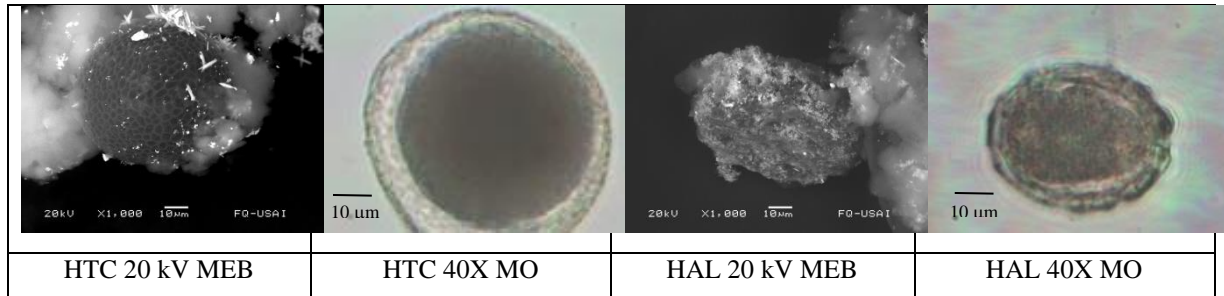
Imagen de elaboración propia

Figura 5-18. Efecto de plata +1 (Ag₂O y AgNO₃) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

5.1.7.3 Mecanismo de acción sugerido para cobre 0

Las pruebas de contacto efectuadas con granalla de cobre (Cu⁰) sobre HH evidenciaron una PV en ambos casos (LIV y TDE) de manera progresiva con respecto al aumento de tiempo de exposición e incremento de concentración aplicada. El medio acuoso, así como avance del ensayo promueve la existencia del cobre en estado oxidado, aunque con presencia mayoritaria de cobre metálico. El mecanismo de inactivación derivado del contacto con cobre no ha sido aún abordado. Por ello, la propuesta es efectuada con base en lo observado en otros organismos y con sustento en la información derivada de las pruebas de microscopias (MO y MEB) en las técnicas de estimación de viabilidad (TCE y LIV). Los

HTC y HAL mostraron comportamientos similares en cuanto al efecto producido por el cobre metálico en la morfología del HH, así como en porcentajes similares de PV (Figura 5-19).



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-19. Efecto de cobre metálico (Cu^0) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

Los organismos evidenciaron un cambio de coloración en la capa externa hacia un tono naranja, que sugiere la interacción del metal con la cubierta, así como la captación del metal en dicho sitio (Figura 5-19). En Silbergeld, (2012) se menciona, que el cobre posee propiedades bariostáticas (inhibidores) y oligodinámicas, así como una tendencia a formar compuestos coloidales que atraen y fomentan la fijación de partículas en suspensión de distinta polaridad. Dicho fenómeno podría ocurrir en las zonas cercanas al HH, generando con ello un microambiente diferente al de la neutralidad del medio ($\text{pH}=7$), tornándolo en uno de naturaleza oxidante, que modifica la homeostasis, tal como parece ocurrir en los HAL mostrados en la Figura 5-19. Así, las condiciones que propicia el cobre modifican la estructura y permeabilidad de las capas del HH, el cual se ve alterado en cuanto al intercambio iónico-osmótico y de nutrientes, que sugiere el incremento de la PV ocurrida durante la progresión del ensayo (Figura 12-5). El efecto deriva en un efecto tóxico para el organismo, debido a la disminución del nivel de oxígeno en la célula al atrapar los grupos sulfhidrilo, aminas y carboxilo de las enzimas respiratorias ubicadas en la capa del HH. Por otro lado, los iones metálicos que atraviesan las capas interfieren con los cationes presentes en el protoplasma, ya que poseen mayor afinidad que algunos otros que se desempeñan de manera natural dentro de los procesos metabólicos, tal es el caso del zinc. Asimismo, ambas especies manifiestan una disminución de la cantidad de solución hialina, aunque no es claro su destino, ya sea que es liberada, o incorporada dentro del núcleo. No obstante, el

aumento del tamaño del núcleo, así como el cambio de su consistencia sugieren la dispersión del material nuclear al interior, así como la mezcla con la solución hialina (Figura 5-20 y Figura 12-17). Ello sugiere, que eventualmente sea una causante de la PV.

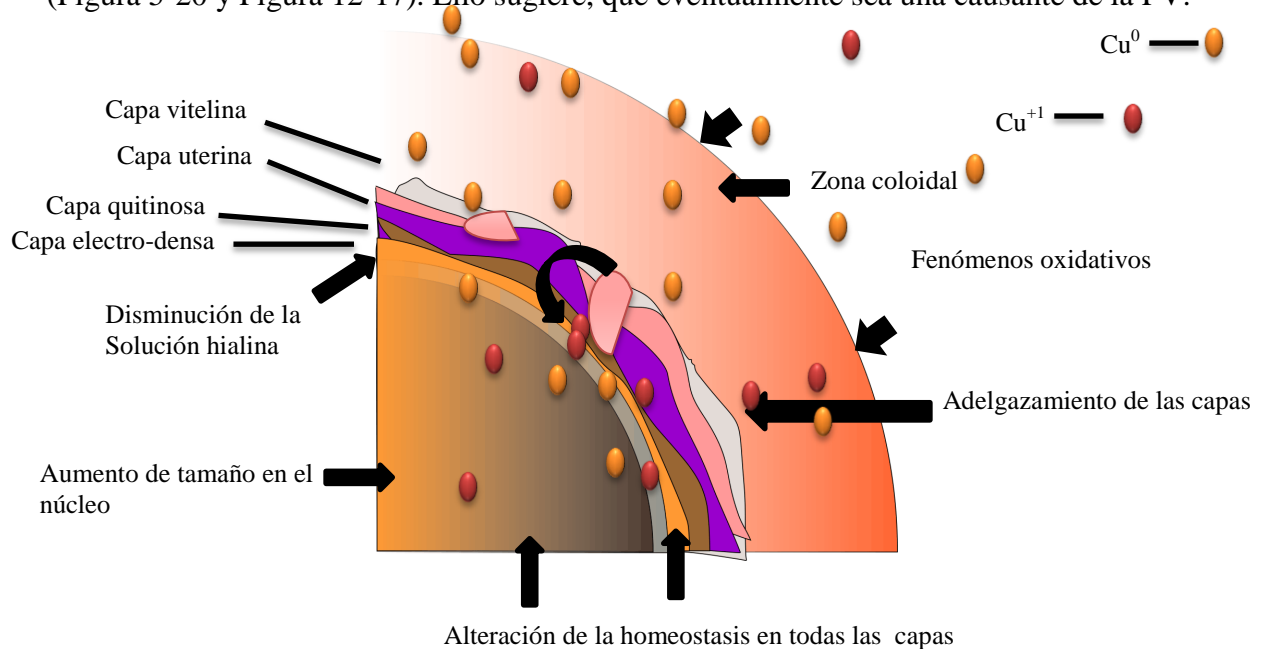


Imagen de elaboración propia

Figura 5-20. Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu^0

5.1.7.4 Mecanismo de acción sugerido para cobre +1

La evaluación efectuada empleando Cu_2O , permitió encontrar que el metal promueve una inactivación progresiva a partir del primer TC (30 min), acentuado por el aumento de la concentración aplicada y el incremento de tiempo de exposición.

Los ensayos efectuados proponen que el mecanismo de acción involucrado en la PV de los HH ocurre en las capas (exteriores), en la solución hialina y núcleo (interior) del organismo. En primera instancia, las estimaciones contrastivas efectuadas mediante LIV y TCE evidencian comportamientos similares de PV, donde la MO y MEB evidenciaron características morfológicas similares a las obtenidas al emplear cobre metálico, aunque con mayor intensidad en la solución hialina y en el núcleo.

Lo anterior sugiere en ambos casos la acción de los iones del cobre con los componentes del HH, que reitera lo propuesto en el punto 5.1.7.3 como mecanismo promotor de la inactivación del organismo. De manera adicional se observó que el estado de oxidación

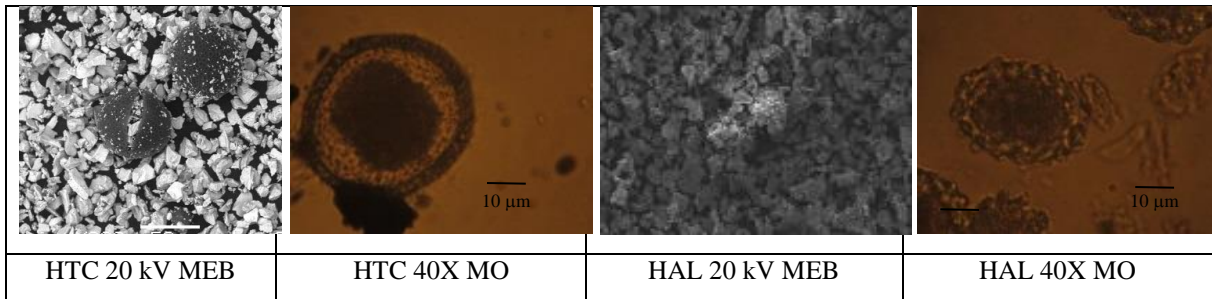
empleado (+1) resultó ser más agresivo que el estado (0), al promover una disminución del grosor de las capas externas, así como incrementos de la impregnación y acumulación del metal al exterior, tal como lo evidencian las imágenes obtenidas por microscopía (Figura 12-6, Figura 12-18, Figura 12-8 y Figura 12-19). Dichas observaciones sugieren favorecer la entrada y transporte del compuesto metálico en el interior, que deriva en inactivación del organismo, tal como lo sugieren los ensayos contrastivos de inactivación efectuados por LIV y TCE.

En Prado et al., (2012) se menciona, que el mecanismo de acción en algunos virus y hongos involucra la inactivación enzimática de proteasas en las capas fosfolipídicas, así como de algunas proteínas y lípidos ubicados en de la barrera física existente con el medio (cubierta o pared celular), modificando la capacidad homeostática y selectividad del organismo. Por otro lado en los HH cuentan con compuestos lipídicos y proteicos dentro de sus capas, lo cual sugiere la posibilidad de la existencia de dichos mecanismos de inactivación.

Por su parte Silbergeld, (2012) enfatiza la relevancia de las metalotioneinas (proteínas con capacidad de unirse a metales), tanto fisiológicas, inorgánicas, o inclusive xenobióticas, empleando para ello los grupos “tiol” (-SH). Tanto, su presencia en las capas, como al interior del organismo cumple también con la función de evitar la toxicidad; mediando su entrada o expulsión del organismo. Sin embargo, de manera controlada no representa un riesgo, ya que puede ser incluido dentro de procesos metabólicos; aunque un exceso de éste podría ser nocivo. Su regulación depende de las metalotioneinas, que al ser superada libera el metal en el plasma, generando con ello microambientes que promueven la inactivación del organismo, tornando heterogénea a la solución. De hecho, en Carrasco (2000) se señala, que existe una relación directa entre el cobre absorbido y la metalotioneína existente (Figura 5-21), lo cual condiciona a la cantidad de grupos tiol contenidos. No obstante, en algunas bacterias se presentan mecanismos de regulación adicionales para dichos casos, tal es el del transporte mediante chaperonas cúpricas (proteínas especializadas) y por varias ATP-*asas* cuprodependientes. Cabe señalar que las concentraciones aplicadas superan los ambientes comunes en las cuales se desempeñan los HH, sobrepasando la capacidad de acción del sistema, saturando, e inclusive inhabilitando al sistema regulador. Dicho

fenómeno es subsanado mediante su liberación *in situ*, particularmente, cuando ocurre en la solución hialina o en zonas cercanas al núcleo (Figura 5-22).

Las foto micrografías obtenidas por MO, muestran una la disminución de la delimitación y consistencia del núcleo en comparación con el huevo control, así como el cambio de coloración del HH hacia una tonalidad similar a la evidenciada por el metal, lo cual sugiere también la impregnación en el núcleo. En Aguilar et al., (2006) se menciona, que el cobre facilita la hidrólisis y las reacciones de desplazamiento nucleofílicas en cadenas de péptidos y de ácidos nucleicos, siendo capaz de formar quelatos con los grupos fosfato. Dicho proceso resulta en la apertura del ADN, conducente a la incapacidad de reproducción del organismo, ya que los grupos fosfato son los responsables de la energía química (ATPasas). En resumen, el cobre desnaturaliza proteínas, altera grupos que forman parte de los centros activos de enzimas y proteínas, altera grupos funcionales de ácidos nucleicos y componentes de la pared y membrana celular.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Figura de elaboración propia

Figura 5-21. Efecto de cobre metálico (Cu^{+1}) Cu_2O sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

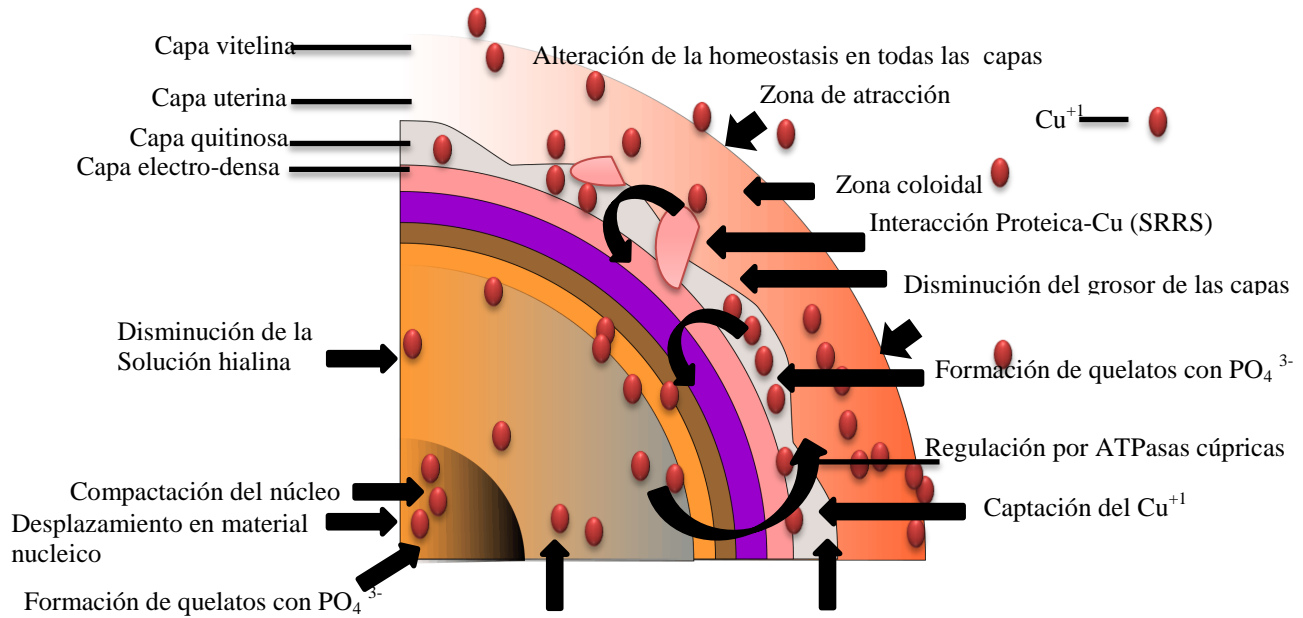


Figura de elaboración propia

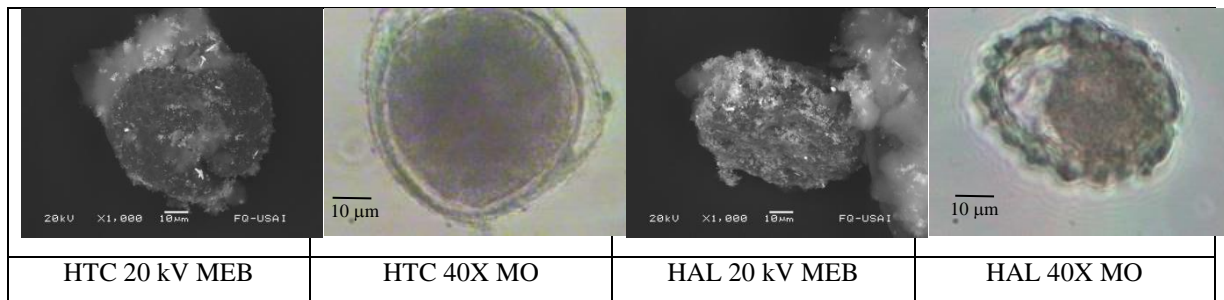
Figura 5-22. Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu^{+1}

5.1.7.5 Mecanismo de acción sugerido para cobre +2

Los ensayos de contacto con CuSO_4 evidenciaron respuestas morfológicas con respecto a la concentración y el tiempo de exposición aplicada en ambas especies evaluadas. La inactivación derivada por dicho agente no ha sido explorada en HH, aunque si han existido acercamientos en algunas bacterias, tales como *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, así como en organismos fúngicos y virales (Kappes et al., 2012; Borkow y Gabbay, 2005). La presencia de azufre constituye un elemento biocida a considerar, debido a la posibilidad de formación de sulfuros que resultan tóxicos en mayor o menor grado para otros organismos (Akao et al., 1995). Por ello, el mecanismo propuesto se basa en lo ocurrido en otros organismos estudiados previamente, así como en la asociación con las respuestas morfológicas obtenidas en la memoria fotográfica de los HH para el ensayo efectuado de TCE y LIV (Figura 12-6).

Los huevecillos evidenciaron una acumulación del agente en el exterior de la capa, tal como lo confirman las MEB, así como un cambio de tono y color (virando hacia azul) en la capa externa-uterina. Lo anterior sugiere la interacción con el CuSO_4 , así como su aceptación, al mostrarse completamente homogénea la cubierta por ambos lados, apuntando inclusive a su transporte hacia el interior del organismo, tal como lo muestran las micro-

fotografías efectuadas a los organismos durante el ensayo (Figura 5-33 y Figura 12-6). Asimismo, se aprecia un tono azulado y turbio en la zona colindante al huevecillo, la cual debería ser concordante a las características del disolvente empleado (ADDE). En Silbergeld, (2012) se menciona, que el cobre posee propiedades bariostáticas (inhibidores) y oligodinámicas, así como una tendencia a formar compuestos coloidales que atraen y fomentan la fijación de partículas en suspensión de distinta polaridad, lo cual explicaría el fenómeno ocurrido en la cercanía del HH. Las condiciones prevalentes modificaron su estructura y permeabilidad, derivando en el incremento de inactivación de los organismos, tal como lo muestran las (Figura 14-10 en HAL y HTC). Asimismo, la disminución de oxígeno, tal como sucedió en otros estados de oxidación menores, donde no permitió captar los grupos sulfhidrilo, aminas y carboxilo de las enzimas respiratorias ubicadas en la capa del HH.



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-23 Efecto del (Cu^{+2}) CuSO_4 sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

Adicionalmente, las foto-micrografías (Figura 12-6) evidenciaron un cambio en la relación solución hialina y núcleo, así como de su consistencia, lo cual puede ser consecuencia del flujo de iones (fosfato, por ejemplo) que atraviesan las capas e interfieren con los cationes presentes en el protoplasma. Dicho fenómeno causa anomalía en el tamaño, en el contenido citoplasmático, en la membrana, debido a alteraciones en la osmorregulación (Kappes et al., 2012), tal como ocurre al emplear agentes con Cu^{+1} . Igualmente sugieren impactar en la viabilidad del organismo inclusive a nivel nuclear, tal como muestran la Figura 14-10, donde se muestra un incremento de inactivación al ocurrir dicho cambio al interior del organismo, tal como lo señalan los ensayos de viabilidad (Figura 14-10) y la memoria fotográfica (ANEXO V).

De manera general, el agente no constituye un problema en bajas concentraciones, ya que ocurre un proceso desintoxicación de las formas iónicas del cobre tanto en el citoplasma como en el espacio periplásmico (Figura 5-24). Para realizar la expulsión del agente se involucran bombas de expulsión, tanto ATPasas como transportadores dependientes del gradiente de protones, y enzimas oxidativas, que tendrían la función de alterar el estado de oxidación de los iones de cobre disminuyendo su toxicidad (Kappes et al., 2012).

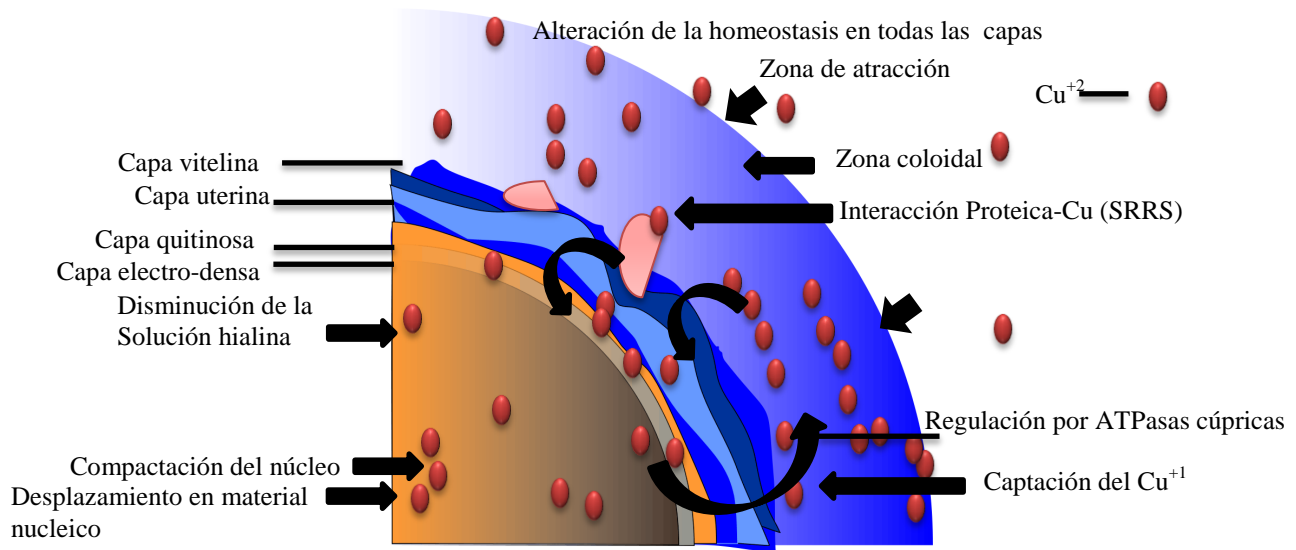


Imagen de elaboración propia
Figura 5-24 Mecanismo propuesto para la inactivación con Cu⁺²

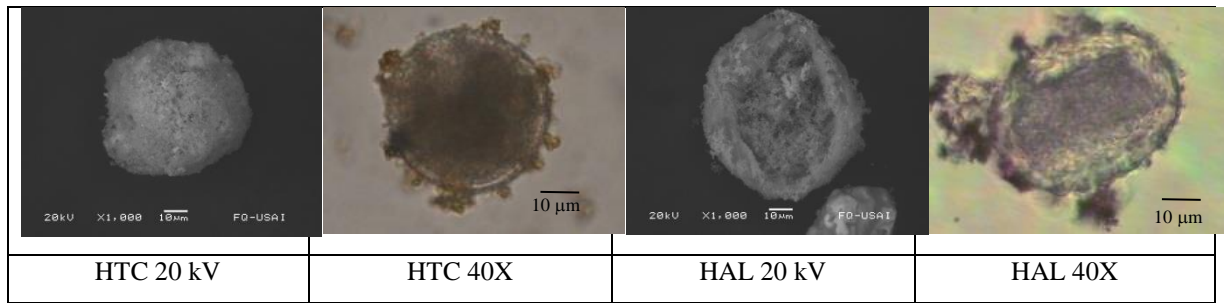
5.1.7.6 Mecanismo de acción sugerido para hierro 0

El efecto inducido por el hierro 0 se exploró por medio de granalla de hierro. Su contacto sobre los HH originó respuestas morfológicas. Si bien, el hierro no se emplea con fines desinfectantes, éste se encuentra reconocido como agente promotor de la desinfección; principalmente en procesos de oxidación avanzada (POA), tal como, los de tipo “Fenton”. Las foto-micrografías obtenidas por MO y MEB durante los ensayos de PV se muestran su efecto progresivo con respecto al incremento de la concentración del agente y el TC. Los ensayos sugieren, que el mecanismo de acción involucrado en la PV de los HH ocurre, tanto en las capas (exteriores), como en las estructuras internas del huevo. Sin embargo, éste no ha sido estudiado para HH. No obstante, existen mecanismos los cuales ocurren en

otros organismos, principalmente en bacterias y hongos y que pudieran ocurrir en los HH. Los huevecillos estudiados (HAL y HTC) evidencian un efecto inicial en las capas exteriores, particularizado su por la acumulación del metal y el cambio de color de estas (similar al de la granalla de hierro), lo cual sugiere su impregnación con el agente metálico (Figura 5-25), En Solís, (2009) se sugiere, que el mecanismo de inactivación involucrado se deriva de un estrés oxidativo producido por los radicales libres, así como de las especies reactivas al oxígeno existentes. Asimismo, enfatiza, que los compuestos derivados de dicho estrés suelen promover una reacción en cadena que conduce a la co-oxidación y peroxidación de lípidos, ver Figura 12-9 y Figura 12-21, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos poli-insaturados y las proteínas, afectando principalmente los puentes disulfuro insertos en ellas.

La combinación de estos eventos modifica la estructura interna, conduciendo a la alteración de la permeabilidad, el incremento de la incapacidad de compensación de los sistemas de defensa antioxidantes, así como de los mecanismos de osmorregulación. Las anteriores, en conjunto explicarían los cambios morfológicos sufridos en la capa externa, así como su disminución de grosor.

Dichos fenómenos, son consecuencia de la entrada y transporte del compuesto metálico al interior. Una vez dentro se incorporaría a la solución hialina generando cambios en ella, tal como fue evidenciado mediante la foto-micrografías (ANEXO V), donde se observa inclusive una disminución y modificación del color, asemejándose a uno similar al existente en el medio (con metal presente), con respecto al avance del ensayo. Asimismo se muestra en el núcleo la adquisición de una coloración similar a la mencionada anteriormente, así como la presencia de tonalidades oscuras en ciertas zonas que sugieren ser con cúmulos del agente (Figura 5-25).



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-25. Efecto de Fe sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

El hierro es relevante dentro de los procesos de óxido-reducción nucleares y se puede encontrar como parte esencial de las enzimas del ciclo de Krebs, en la respiración celular y como transportador de electrones en los citocromos. Por lo que resulta primordial su regulación, ya que una excesiva acumulación, conjugado con un elevado potencial redox puede promover compuestos tóxicos altamente reactivos (Alberts, 2002) que eventualmente pueden limitar el larvado del organismo. Los eventos descritos se acentúan conforme el ensayo continúa impactando en el incremento de la PV del HH, tal como se muestran en los ensayos de viabilidad efectuados y que se sintetizan dentro de la Figura 5-26.

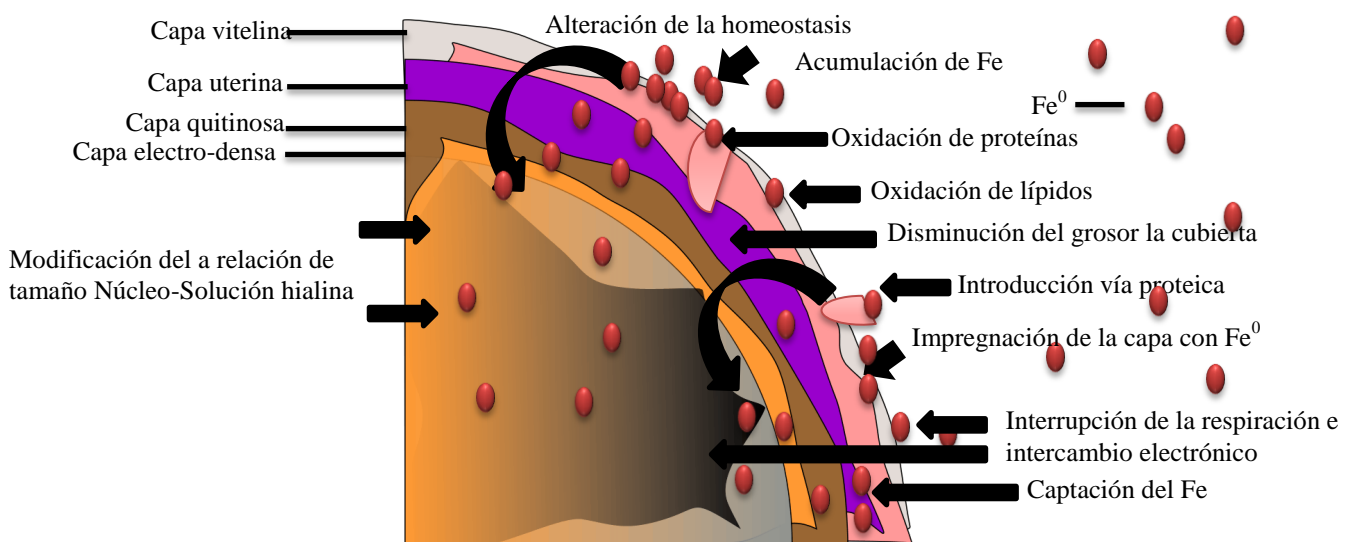
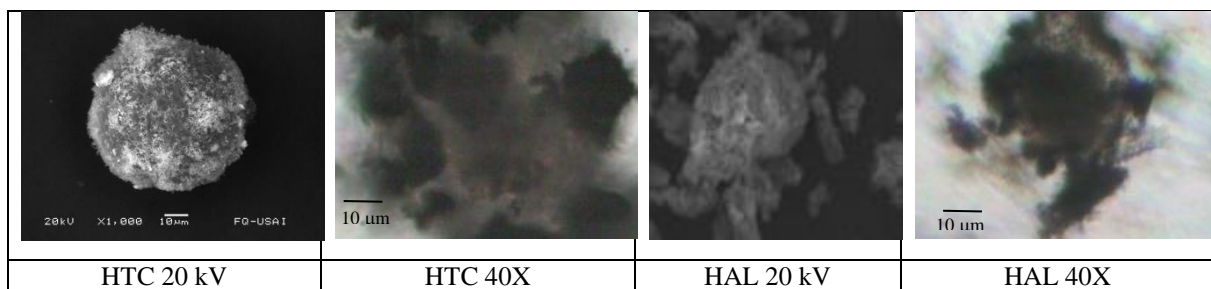


Imagen de elaboración propia

Figura 5-26 Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^0

5.1.7.7 Mecanismo de acción sugerido para hierro +2

La fenomenología mostrada por los HTC y HAL ante el contacto de hierro +2 con FeS_2 y FeSO_4 se caracterizaron por la acumulación del agente en las capas del HH (correspondiente con el aumento de la concentración aplicada) (Figura 5-27), la adquisición de un color similar al del agente por parte del HH, así como la presencia de algunas zonas heterogéneas y con mayor intensidad, que denotan cúmulos del agente metálico. En conjunto, las anteriores sugieren una interacción con el compuesto, así como la captación del mismo, tal como lo indican las MEB (Figura 12-12 y Figura 5-27).



HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-27. Efecto de FeS_2 sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

Lo anterior permite explicar la inactivación de ambos organismos, así como lo señalan las estimaciones efectuadas mediante LIV y TCE. Los ensayos evidenciaron un incremento de la PV progresiva, que se asocian con la fenomenología mostrada por los HH, lo cual puede ser consecuencia de la entrada del metal al organismo. De manera general, el mecanismo de inactivación derivado por metales no se encuentra explicado al momento, particularmente para HH. Sin embargo, los cambios evidenciados por los huevecillos son correspondientes con los mencionados al emplear otros compuestos con hierro, lo cual apunta, que el mecanismo puede corresponder con la interacción con proteínas y lípidos, tal como se menciona en el punto 5.1.7.6. En particular, Morales (2010), señala que el hierro (Fe^{++}) es capaz de atravesar la membrana, dada la capacidad de formar quelatos al interactuar con aminoácidos y azúcares, lo cual favorece su introducción y transporte en las capas.

El incremento de la inactivación se puede asociar por medio de las foto-micrográficas se evidenció un efecto sobre la solución hialina, caracterizado por su disminución de grosor, e inclusive por la desaparición de la misma. Lo anterior se relaciona con la alteración de la

osmoregulación derivada de los procesos señalados anteriormente, que ocasiona su eventual migración y como consecuencia la PV en el HH. Asimismo, es posible observar cambios en el núcleo, determinados por el aumento de su tamaño, cambio de su tonalidad, e inclusive la presencia de zonas con aun mayor coloración que sugieren corresponder a la acumulación del compuesto de manera puntual, tal como sucede con otros compuestos de hierro.

En Morales (2010) menciona, que en bacterias el hierro +2 es oxidado por la celuloplasmina (endoxidasa) dentro del citosol (matriz citoplasmática), por lo que de manera análoga esto podría ocurrir en la solución hialina. Una vez dentro, en forma de Fe^{+3} es captado por la transferrina, para ser utilizado en síntesis de enzimas y otras proteínas. Sin embargo, la saturación de los sitios activos puede derivar en la incapacidad de transporte del compuesto al interior o exterior del organismo, ocasionando con ello su acumulación en el medio. La forma oxidada genera un microambiente ácido, que resulta agresivo y eventualmente tóxico para el desarrollo de los procesos metabólicos, ya que promueve la oxidación de los componentes del interior del HH (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), limitando con ello el desarrollo de los estadios larvarios del helminto (CSA, 2012). Los procesos antes mencionados se recapitulan en la Figura 5-28.

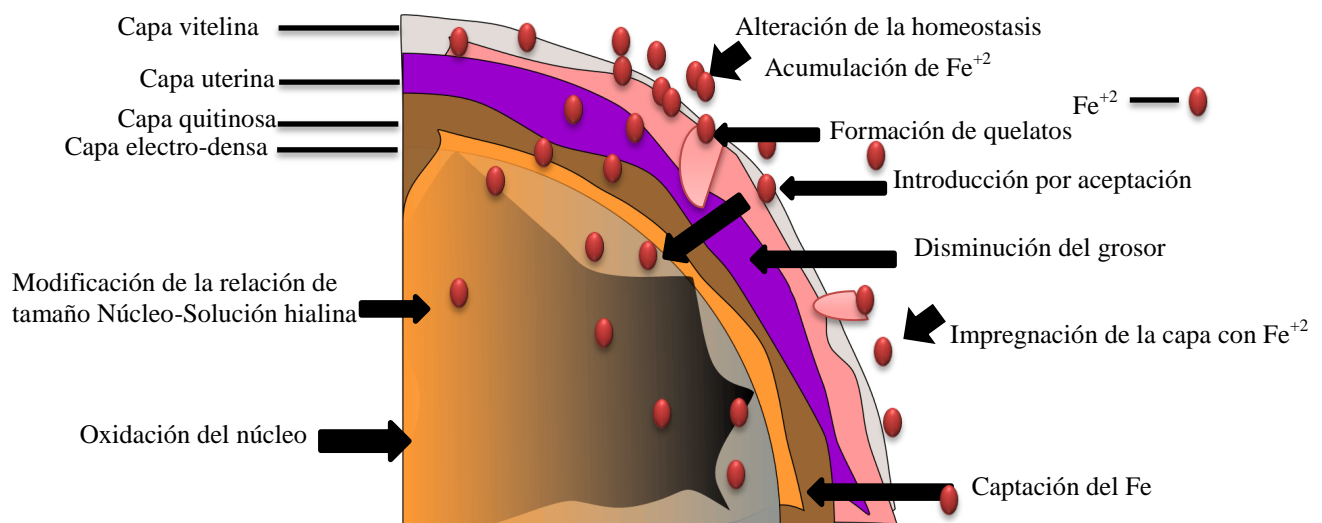


Imagen de elaboración propia

Figura 5-28. Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^{+2}

5.1.7.8 Mecanismo de acción sugerido para hierro +3

El estudio del efecto de hierro +3 sobre los HH evidenció respuestas morfológicas particulares, que sugieren ser causantes de la PV para ambas especies de helmintos.

Los HH de ambas especies mostraron en la capas exteriores: la acumulación del metal, disminución de su grosor y cambio de color (HTC=Huevos *T. canis*; HAL=Huevos *A. lumbricoides*)

Figura 5-29). Las características mencionadas apuntan hacia mecanismos que involucran un efecto en la parte lipídica y proteica de dichos componentes, similar a los evidenciados en otros compuestos metálicos empleados previamente con estados 0 y +2 (mencionados en 5.2.10.3 y 5.1.7.6), tal como se evidencia en Figura 12-10 y Figura 12-22. La condición oxidante brinda un efecto de mayor intensidad sobre los HH, reflejado en el incremento de inactivación de los HH estimadas mediante las pruebas de viabilidad.

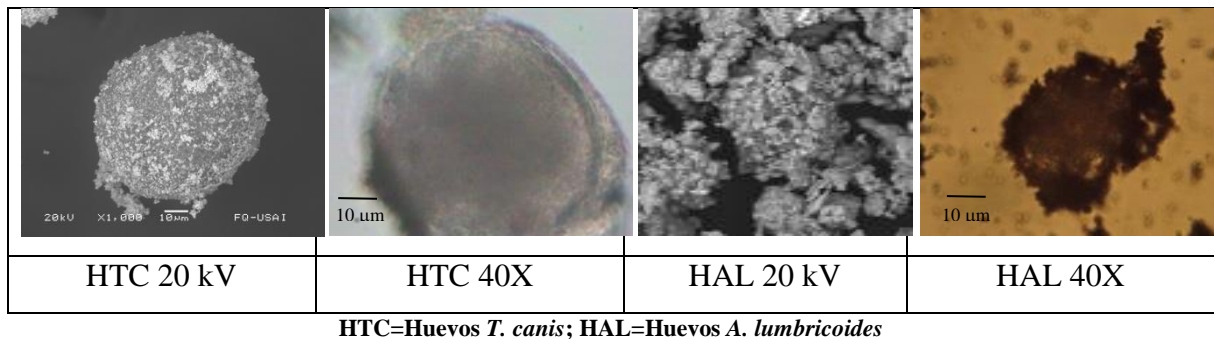


Figura 5-29. Efecto de Fe₂O₃ (Fe+3) sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

La alteración estructural derivada de la interacción metal-componente del HH sugiere favorecer la entrada y transporte del compuesto metálico al interior, alcanzando así a la solución hialina y al núcleo. Las foto-micrográficas muestran las soluciones hialinas y núcleos de los HH expuestos con coloraciones similares a las del metal aplicado, sugiriendo la alteración de los procesos relacionados con la captación de la transferrina para ser utilizado en síntesis de enzimas y otras proteínas. La presencia del metal en las partes estructurales del HH puede impactar de manera parcial e inclusive letal. Morales, (2010) durante un estudio de toxicidad con compuestos de hierro sobre HH menciona que el Fe⁺³ resulta tóxico al interior de los organismos por causar condiciones de acidez al interior. En resumen la PV se puede derivar de un conjunto de mecanismos ocurridos en los diferentes componentes del HH (Figura 5-30).

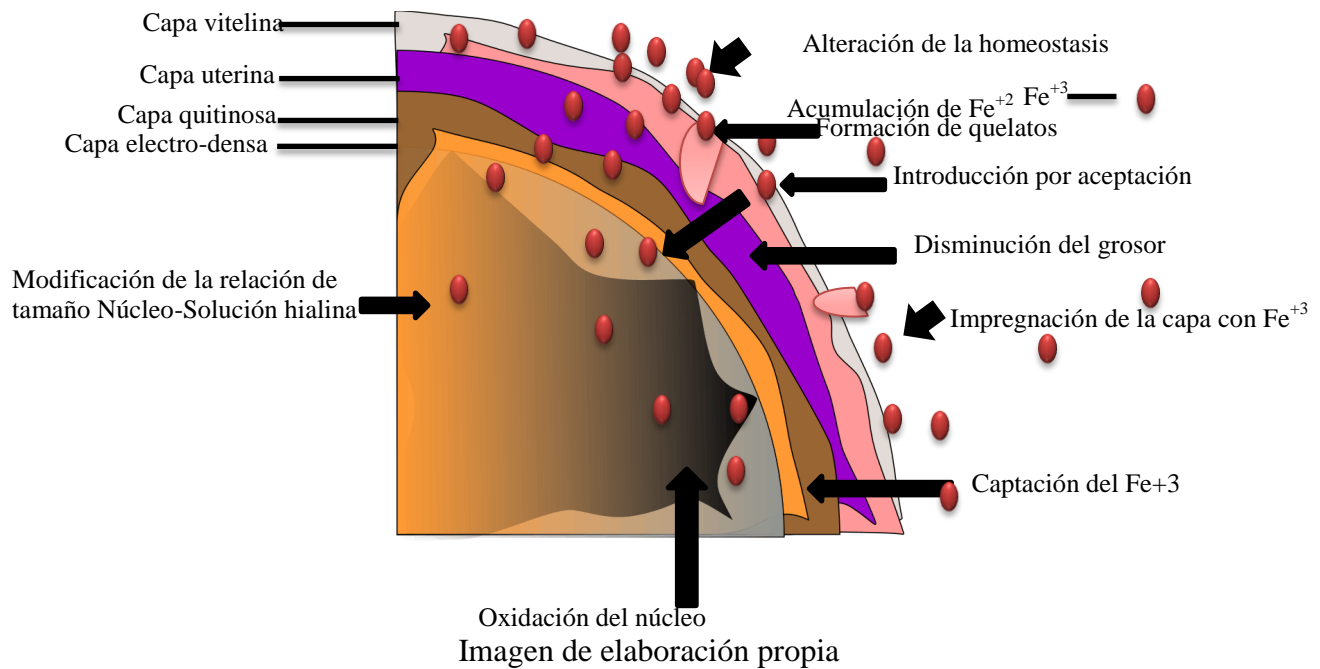


Figura 5-30. Mecanismo propuesto para la inactivación con Fe^{+3}

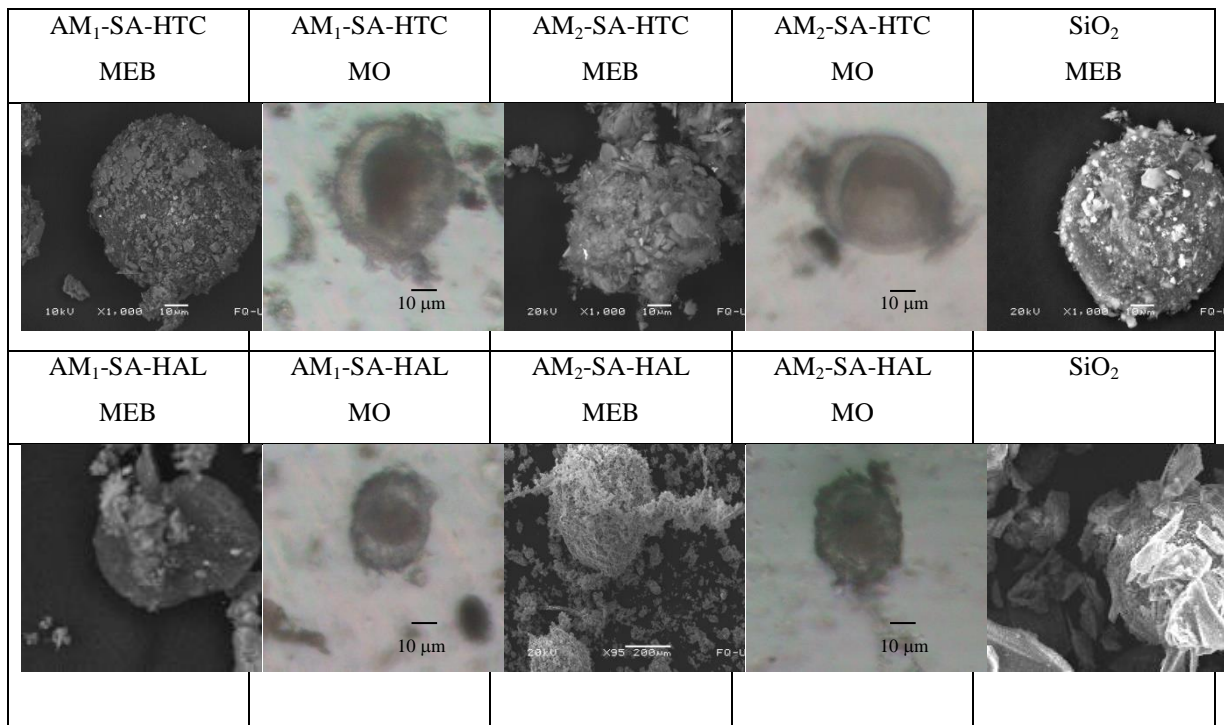
5.1.8 Mecanismo de pérdida de viabilidad de HTC inducido por AM

Los resultados muestran pérdidas de viabilidad progresiva en todas las condiciones evaluadas SA y CA, obteniendo los mayores porcentajes de inactivación para los últimos, bajo condiciones de mayor tiempo de exposición y concentración y acentuándose para los ensayos con menor granulometría. En consecuencia la PV diferenciada apunta al efecto de mayor contacto de los AM con la superficie de los HTC, así como de la presencia de elementos nocivos para el HH en la solución. Asimismo sugieren, que la inactivación de los HH se deriva de mecanismos de estrés mecánico y químico, que pueden actuar de manera independiente, o bien en sinergia, tal como lo señalan los experimentos efectuados con SiO_2 , así como los realizados con PP, que indican una existencia conjugada.

Los ensayos de TDE y LIV en SA permiten explicar una PV por estrés químico derivado del contacto con el AM. En la foto-micrografías de los HH se observan diferencias de figura (ovoide inicial), heterogeneidad estructural y variación del grosor de los constituyentes externos (Figura 5-31).

Dichas alteraciones estructurales se pueden relacionar con la co-oxidación y peroxidación de lípidos, (dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos poli-insaturados), así como

de las proteínas, tal como se menciona que ocurre en otros organismos durante pruebas de contacto con metales (Solís, 2009). Dicha interacción sugiere generar alteraciones en la capacidad de osmorregulación del organismo, lo cual puede derivar en la inactivación del organismo. En Aguilar et al., (2006), se mencionó que de manera natural los HH poseen fisuras para realizar actividades de osmoregulación, lo cual facilitaría el ingreso de elementos nocivos al interior del huevecillo. Dicho mecanismo podría ser igualmente consecuencia del ingreso de algunos otros elementos contenidos en el AM y que pueden resultar nocivos, tales como Ag, Cu, Zn, TI, Fe, Al, entre otros, los cuales han demostrado en otros trabajos una capacidad tóxica sobre virus, bacterias y hongos (Solís-López et al., 2014; Miranda et al., 2011 Orta et al., 2008; Dubas et al., 2006).



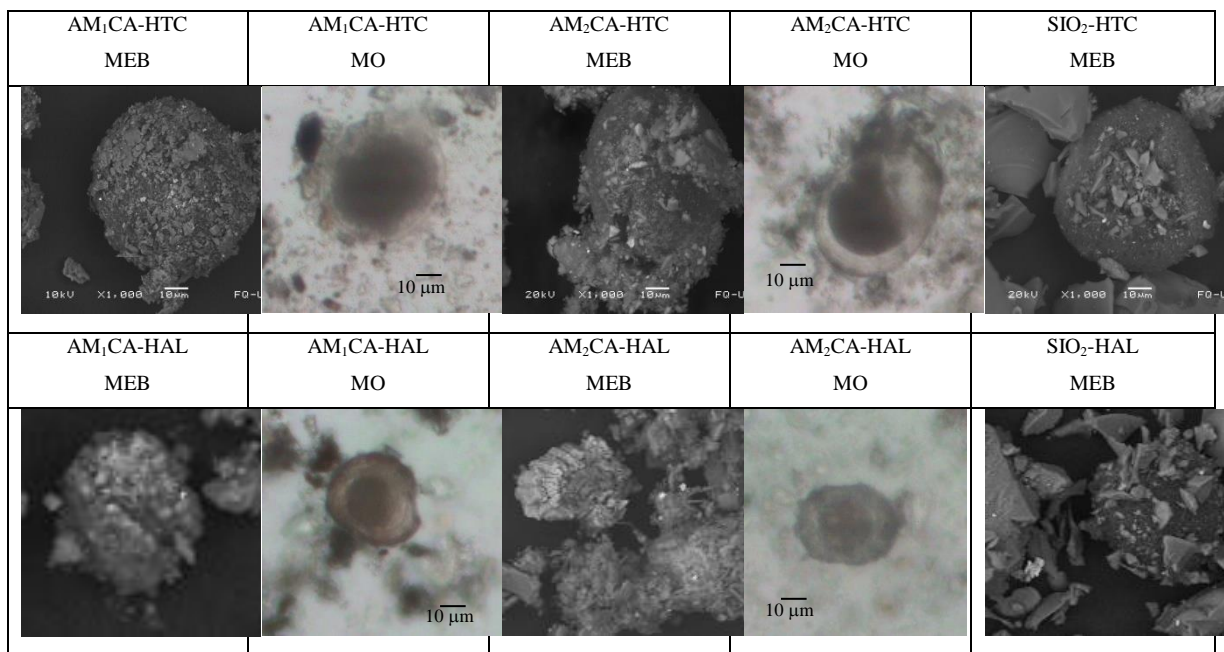
SA=Sin Agitación; MO=Microscopía Óptica; MEB=Microscopía Electrónica de Barrido; HAL=Huevo *Ascaris lumbricoides*; HTC=Huevo *Toxocara canis*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-31. Efecto de los agregados minerales 1 y 2 sin agitación sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

Por otro lado, en los ensayos CA se presenta una interacción entre el AM y los organismos, como consecuencia de la agitación, al ocasionar el choque y rozamiento de la superficie del HH con las partículas del AM. Ello implica el incremento de la inactivación, tal como los

ensayos de estimación de viabilidad lo sugieren. En consecuencia, las afectaciones resultantes sobre los HH, pueden atribuirse a la combinación del estrés mecánico e interacción química, causados por las formas de las partículas (con capacidad abrasiva), los contenidos metálicos de los AM y por el tiempo de exposición al que fueron sometidos. Las foto-micrográficas confirman la naturaleza de los daños estructurales atribuidos al efecto mecánico. Los huevecillos muestran perforaciones y disminución del grosor de la capa externa, la generación de laceraciones y rupturas de las capas. Cuando el daño es severo, se produce la salida de la solución hialina e inclusive del material nuclear, lo cual resulta letal para el HH. En comparación con los controles, donde se muestra un HH con todas sus estructuras íntegras (capas, solución hialina y núcleo), observando una clara delimitación, homogeneidad y diferenciación en cada una de ellas (Figura 5-32).



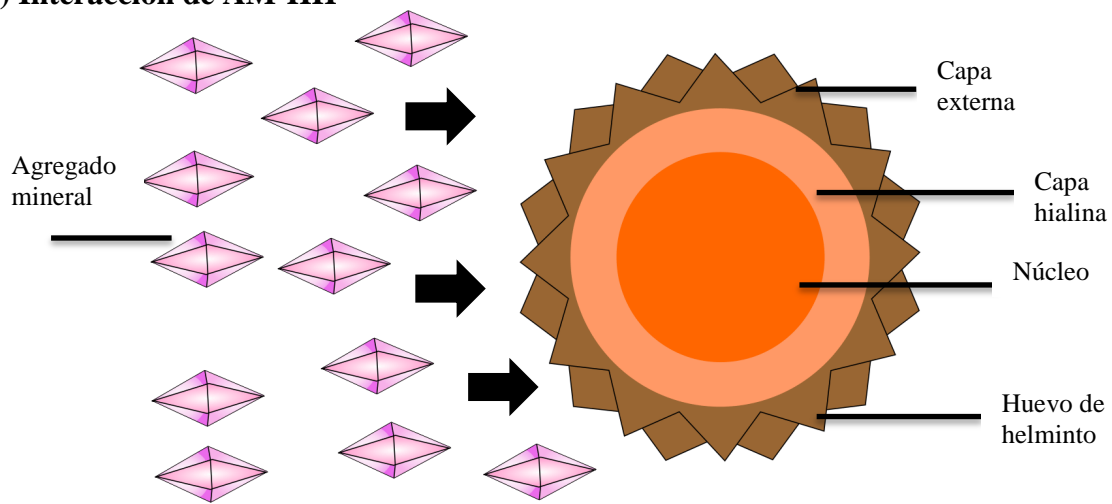
CA=Con Agitación; MO=Microscopía Óptica; MEB=Microscopía Electrónica de Barrido; HAL=Huevo *Ascaris lumbricoides*; HTC=Huevo *Toxocara canis*
Imagen de elaboración propia

Figura 5-32. Efecto de los agregados minerales 1 y 2 con agitación sobre HAL y HTC mediante MO y MEB

Por otro lado, las pruebas CA evidenciaron estrés mecánico, en forma de rupturas, rasgamientos, desgarres, cortes y disminución del grosor de las cubiertas externas e internas, así como por la segregación del material nuclear (Figura 5-32). La severidad de los daños producidos por el AM impide la correcta regulación de: la limitación del

contenido nuclear, el intercambio con el medio y de protección y estructural hacia el interior del organismo. El daño químico ocasiona adicionalmente al interior un cambio de la coloración, volumen y consistencia de la solución hialina, así como del núcleo. Lo anterior pudo ser consecuencia de la interrupción de la transferencia electrónica intermembranal, la penetración en la cubierta del HH y/o la oxidación los componentes macromoleculares, tanto en las capas, como al interior del organismo. En conjunto, se pueden relacionar con la generación de productos secundarios, algunos de los cuales son especies reactivas al oxígeno, o bien, causado por los iones de metales (con efecto tóxico) (Solís-López et al., 2014; Li et al., 2008). No obstante, de manera presumible también ocurre en los HH examinados. Lo anterior se conjunta en la propuesta del mecanismo de inactivación mostrado en la Figura 5-33

a) Interacción de AM-HH



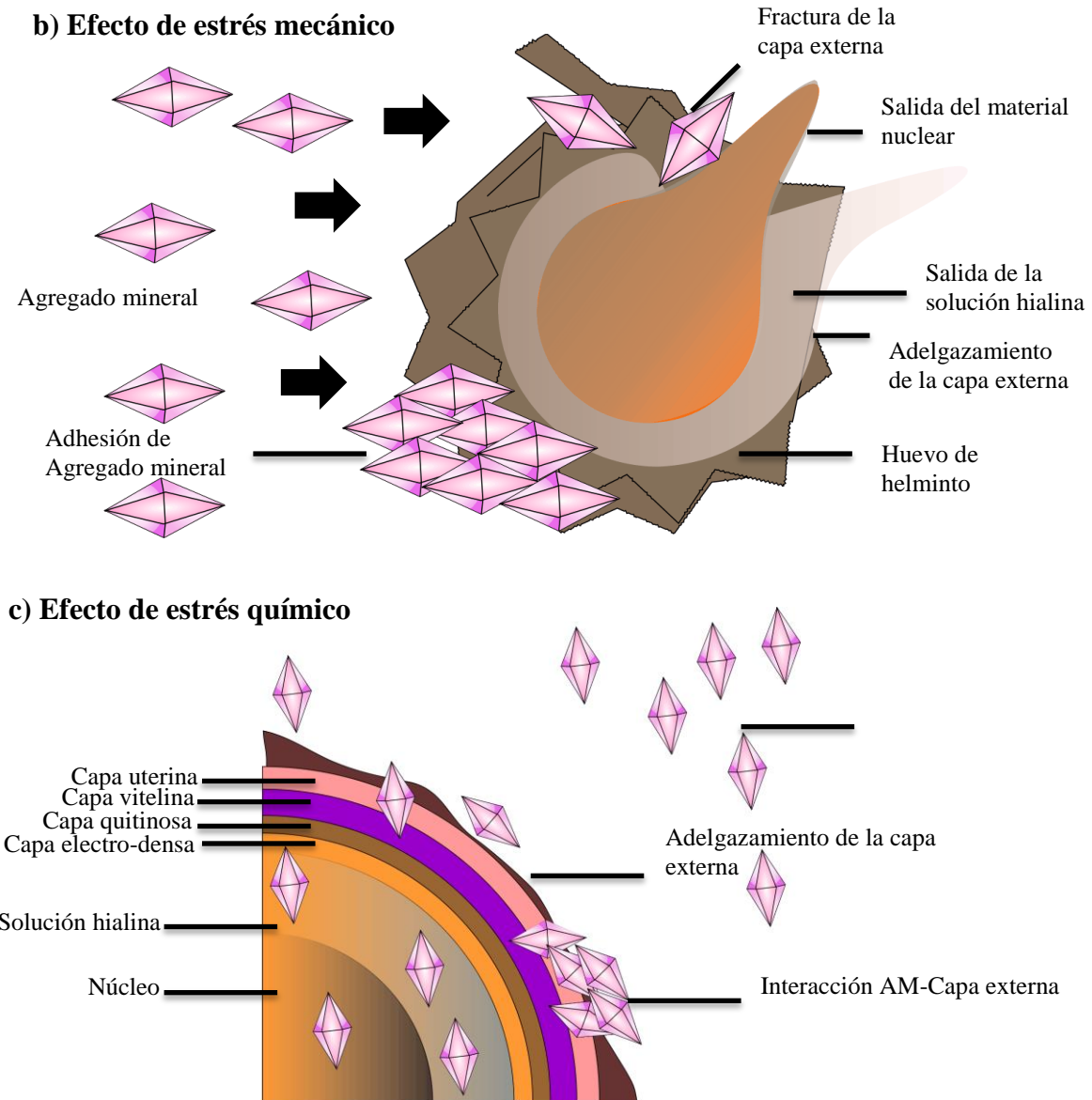


Imagen de elaboración propia

Figura 5-33 Mecanismo propuesto para la inactivación de HH inducido por agregados minerales

5.1.9 Caracterización de los parámetros cinéticos

A partir de los resultados de exposición directa a los metales se describieron los parámetros característicos que describen la desinfección generada por cada agente. El presente trabajo consideró su descripción empleando el modelo de Chick-Watson para dicho fin. Las estimaciones efectuadas para determinar “n” y “k” se efectuaron para cada estimación, así como para cada especie.

Las “k” para las concentraciones empleadas oscilaron entre 0.3060-0.0042 en el caso de HAL, mientras que en HTC resultaron ser entre 0.2062-0.0024. Los HAL presentaron mayor sensibilidad al Ag₂O con 0.306, mientras que en los HTC ocurrió para el Fe con 0.2062 (Tabla 5-12). De acuerdo a dicho parámetro los HTC presentaron mayor sensibilidad a los compuestos con hierro y menor ante los que contienen plata, mientras que los HAL resultaron más sensibles a los compuestos con plata y en menor grado a los que contenían hierro.

Tabla 5-12 Valores del parámetro “k” para los elementos evaluados

Compuestos con contenido metálico	HAL (k)	HTC (k)
Ag	0.3060-0.0042	0.1670-0.0936
Cu	0.2292-0.0522	0.1766-0.0024
Fe	0.1145-0.0402	0.2062-0.0186

Tabla de elaboración propia

Los HH presentaron valores del parámetro “k” similares a los obtenidos con UV aplicada a *Escherichia coli* con 0.223, así como para ZnO con 0.315, reportados en Lebig et al., (2017). No obstante, otros valores reportados en Lebig et al., (2017) son 0.993 para TiO₂ con el mismo organismo de prueba, y empleando *Lactobacillus. helveticus* resultaron de 0.628, 0.809 y 1.984, respectivamente. Dichos valores demuestran comparativamente la sensibilidad de un organismo de baja resistencia, ante uno de alta.

Por otro lado, las curvas de ajuste para caracterizar la desinfección resultó en todos los casos de tipo lineal, en particular para las concentraciones superiores a 0.05 g mL⁻¹, lo cual sugiere el efecto oligodinámico presente en agentes con contenido metálico, donde el primer tiempo de contacto (30 min) resulta particularmente significativo para describir el fenómeno de inactivación.

El parámetro de “n” se determinó de forma empírica, donde usualmente adquiere un valor de 1, tal como se sugiere en Metcalf, (1996), con el objeto de no modificar la relación de cálculo. Sin embargo, su estimación directa sugiere el factor de dilución ocurrido a lo largo del tiempo, y se relaciona con la cantidad promedio de desinfectante que se combina con el microorganismo y que eventualmente es el necesario para inactivarlo (Metcalf, 1996). No

obstante, en Lebig et al., (2017) se menciona que dicho parámetro no tiene un real sentido físico, ya que puede tomar valores negativos, tal como lo presenta dicho trabajo. Asimismo, menciona que, los valores calculados si son útiles para la determinación del tiempo teórico de inactivación de un huevecillo.

Los tiempos de inactivación (Tabla 5-13) se ubicaron entre 4.80 y 19.75 min para los HAL y entre 7.12 y 19.23 min para los HTC. No obstante la sensibilidad ante los agentes ocurre de manera diferente en cada especie. El orden de inactivación de los agentes evaluados, partiendo del menor tiempo teórico de inactivación para HAL resultaron: $\text{Ag}_2\text{O} < \text{AgNO}_3 < \text{Cu}_2\text{O} < \text{FeSO}_4 < \text{CuSO}_4 < \text{Fe}_2\text{O}_3 < \text{Cu} < \text{Ag (coloidal)} < \text{Ag} < \text{FeS}_2$, mientras que para los HTC registraron $\text{Fe} < \text{Cu} < \text{Ag}_2\text{O} < \text{FeS}_2 < \text{AgNO}_3 < \text{Fe}_2\text{O}_3 < \text{CuSO}_4 < \text{FeSO}_4 < \text{Ag (coloidal)} < \text{Ag} < \text{Cu}_2\text{O}$. Los resultados indican que HAL son inactivados hasta 2.5 minutos antes que los HTC. Lo anterior puede relacionarse con la letalidad del mecanismo de acción de cada agente, así como de la capa extra que contienen los HTC, tal como lo señala Aycicek et al., (2003), dónde se menciona que, ella tiene la función de brindar mayor resistencia ante factores mecánicos y químicos.

Tabla 5-13 Tiempos teóricos del inicio de la inactivación de los HH expuestos a agentes con contenido de Ag, Cu y Fe

Concentración aplicada 0.01 g mL ⁻¹	<i>Ascaris lumbricoides</i> (tiempo teórico) (min)	<i>Toxocara canis</i> (tiempo teórico) (min)
Cu	11.46	8.51
Cu₂O	6.41	32.32
CuSO₄	8.73	14.27
Ag	13.25	17.20
Ag₂O	4.80	8.80
AgNO₃	6.02	11.23
Ag (coloidal)	12.46	19.63
Fe	12.83	7.12
Fe₂O₃	10.13	13.76
FeS₂	19.75	10.96
FeSO₄	7.36	14.36
AM₁ (SA)	7.37	7.43
AM₁ (CA)	4.59	4.11
AM₂ (SA)	6.11	6.42
AM₂ (CA)	5.45	5.23

Tabla de elaboración propia

5.2 Ensayos en columnas empacadas

La propuesta de diseño y las condiciones de operación obedecen a su implementación en sitios con infraestructura similar a la prevalente en las áreas rurales de México, las cuales son similares a las existentes en países en situación de pobreza. Asimismo se pretende incorporar dichos principios y adecuarlos para implementarlos en sistemas de tratamiento tipo “humedales artificiales”, lo cual, en conjunto corresponde una innovación a nivel mundial.

El sistema experimental resultante se empacó en todos los casos con materiales de granulometría entre 2.00 y 2.05 mm. Los AM (1 y 2) empleados contuvieron en ambos casos 93% en dicho intervalo. Asimismo, para el resto de los ensayos se empleó perlas

plásticas comerciales (PP) con $97\pm 3\%$ (según la información del fabricante) y SiO_2 con $96\pm 5\%$.

En todos sistemas y medios de empaque se evaluaron los HH retenidos (considerados como filtrados), así como los inactivados (no viables). Para ello se empleó la recuperación de los HH a la salida de cada cartucho y mediante la técnica de incubación *in vitro* (Oaks y Kayes, 1979), donde ambos autores definen a un huevo viable como aquel organismo que es capaz de infectar mediante su avance de estadio biológico hacia larva móvil,

5.2.1.1 Operación del sistema filtrante

El sistema se operó de manera continua en dos formas diferentes: a) Diseño (OD), donde se manejaron un gasto de 1.33 L d^{-1} tiempos de residencia hidráulica (TRH) por diseño de 90 minutos para la primera (con base a las pruebas de contacto) que promueve la máxima inactivación y b) Máxima (OM), que consistió en operar con las válvulas totalmente abiertas, modificando con ello el TRH a 1.5 y 1.9 min para el AM_1 y AM_2 . Llevaron al sistema a tratar 60.5 L d^{-1} , respectivamente, la cual corresponde a una alimentación 45.10 y 47.95 veces superior a la operada en OD para los AM_1 y AM_2 , mientras que, para los testigos SiO_2 y PP fue de 51.25 y 58.39 veces, respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 5-14.

Tabla 5-14. Características de la operación de los filtros operación

Características de operación									
Lechos de empaque	AM ₁		AM ₂		PP		SiO ₂		
	OD	OM	OD	OM	OD	OM	OD	OM	
Gasto (mL s ⁻¹)	0.0154	0.6950	0.0144	0.6950	0.0119	0.6950	0.0135	0.695	
TRH (min)	90	1.98	90	1.95	90	1.54	90	1.75	
Capacidad de tratamiento (L d ⁻¹)	1.331	60	1.252	60	1.541	60	1.755	60	
Duración de la prueba (d)	15	3	15	3	15	3	15	3	
Evaluaciones efectuadas	210	1222	210	1222	210	1222	210	1222	
Volumen de muestreo (mL)	83	83	78	78	64	64	73	73	
Volumen total analizado (L d ⁻¹)	17.5	102	16.5	96	13.5	78.5	15.3	89.5	

AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; PP= Perlas plásticas; OD=Operación de Diseño; OM=Operación Máxima; TRH=Tiempo de Residencia Hidráulica
Tabla de elaboración propia

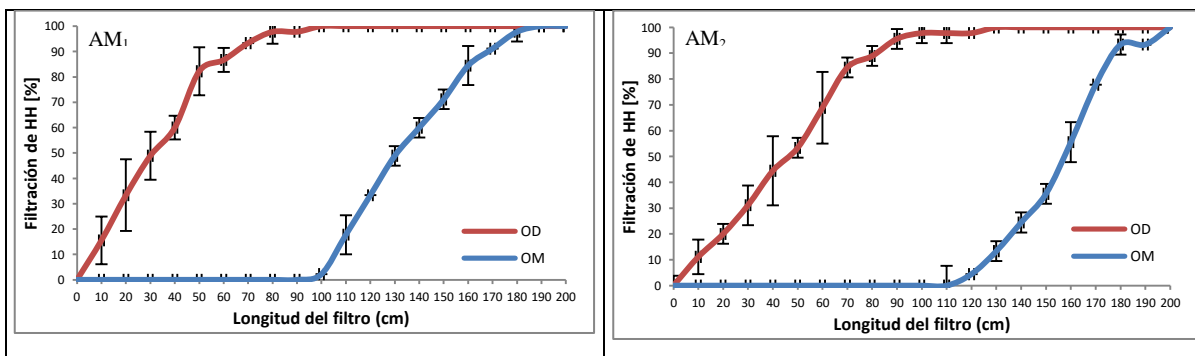
El presente trabajo evaluó dos especies de helmintos en todos sus rubros. Durante las pruebas preliminares en pequeñas columnas (10-60 cm) no se evidenciaron comportamientos significativamente diferentes en cuanto a las estimaciones evaluadas (inactivación y filtrado) al emplear de manera independiente las especies de HTC y HAL. Por ello, las pruebas definitivas en el filtro experimental se efectuaron empleando solo HTC y de manera adicional, ya que representan una menor probabilidad de infección en el espacio determinado para los ensayos.

En su defecto no se decidió emplear *Ascaris suum*, ya que a pesar de ser imperceptible la diferencia entre morfológica entre los huevos de *Ascaris lumbricoides* y *A. suum*, si lo es de manera proteica y biológica, por ser uno hospedero de humanos y el otro de cerdos, respectivamente. Lo anterior, implica que no reflejaría los mismos resultados,

particularmente para la inactivación. De manera adicional el helminto asociado a cerdos presenta un problema de infección hacia el humano, ocasionando “cisticercosis” (afección grave). El emplear HTC presenta un menor riesgo de morbilidad e infección, ya que el humano es hospedero accidental (De la Fé et al., 2007), aunque fármacos especializados resultan efectivos para eliminar la mayoría de los casos.

5.2.2 Ensayos de filtración en columnas empacadas

El sistema experimental empacado de manera independiente con AM₁, AM₂, SiO₂ y PP, se evaluó en OD por un periodo de 15 días y en OM durante tres. Todos ensayos mostraron una retención progresiva, con excepción de las PP (Figura 5-34). En particular, los efectuados con AM (1 y 2) resultaron los de mayor retención, en comparación con los empacados con SiO₂ y PP. El ensayo en OD mostró para el AM₁ el uso de un lecho efectivo de los primeros de 100 cm para lograr la retención del 100% de HH introducidos, con una remoción para el segmento de 0-30 cm de 49±9% (Figura 16-1), mientras que para el AM₂ alcanzó la totalidad de remoción a los 130 cm con una filtración de 44±7% durante los primeros 40 cm del lecho (Figura 16-2). Lo anterior indica un adecuado diseño del sistema en ambos casos, al aproximar la filtración a 50% durante el primer tercio del proceso efectivo (30%), tal como lo señala Auvinet, (1982), que en ambos casos es de 49% y 45%, logrando dicho valor con desviación estándar de ±6%, respectivamente, ofreciendo un mejor resultado AM₁ en un 4.44%, con una disminución de 10 cm (Figura 5-34).



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño

Imagen de elaboración propia

Figura 5-34. Curvas de operación (longitud vs filtración) de OD y OM para AM₁ y AM₂

Por su parte, en OM para el mismo segmento no se registraron HH retenidos, lo cual sugiere que se supera la capacidad de remoción por diseño. La parte restante del lecho logró

retener al 100% de los HH introducidos en ambos ensayos; tanto con AM₁, como AM₂. Es decir, emplea como lecho efectivo los 180 y 200 cm, correspondientes al 90% y 100% del sistema, respectivamente.

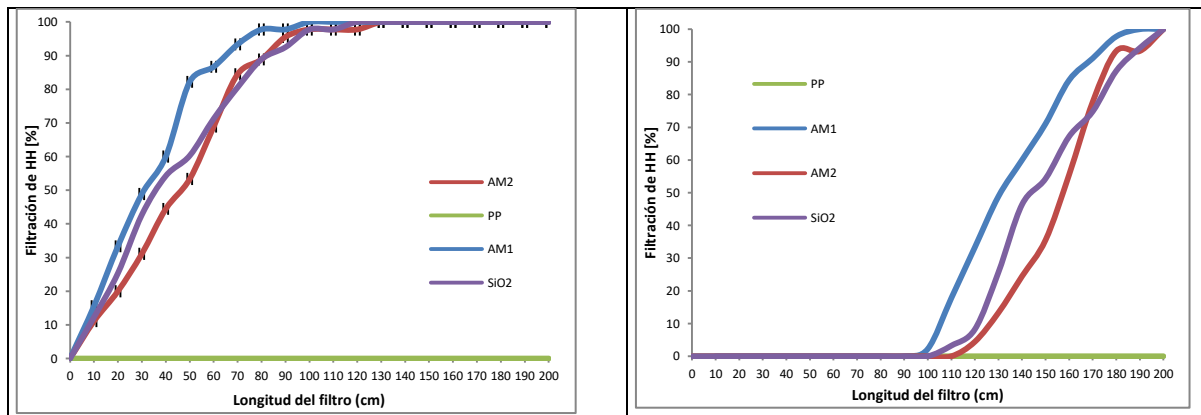
En ambos casos la filtración ocurre a partir del 50% de la dimensión total del filtro; los 100 cm para el AM₁ y 120 cm para el AM₂ (correspondientes al 50% y 60% del sistema experimental) (Figura 16-3 y Figura 16-4). Dicha operación derivaría en la saturación de la parte profunda del sistema, provocando un azolvamiento en la parte media del filtro. Dicho fenómeno no permitiría aprovechar de manera integral el lecho filtrante, a pesar de obtener un volumen de tratamiento 45 veces mayor en comparación a la OD. No obstante, algunas soluciones relacionadas con nuevos arreglos granulométricos o la exploración de un aumento en la circunferencia de la propuesta podrían constituir la solución.

La capacidad de filtración del sistema, evidencia para el caso del AM₂ encontrarse a su máxima capacidad con un rendimiento de 100%. No obstante, no cuenta con un lecho adicional que le permita entregar dicha calidad con respecto al incremento del tiempo de operación. Por otro lado, el AM₁ sugiere ser capaz de manejar más gasto, al lograr el la remoción total a los 180 cm.

Lo anterior sugiere que modificaciones del TRH, que podría ser orientado a eliminar otros organismos de importancia ambiental, tales como: bacterias, virus, protozoos y hongos, por mencionar algunos, que presumiblemente requerirían de un menor TC. De hecho Miranda (2005), menciona que para alcanzar un 100% de efectividad en la eliminación de *Esherichia coli* (organismo normado), mediante ensayos de contacto con un AM requirió de un tiempo de contacto de 30 minutos. Por ello, el uso potencial de componentes minerales en la eliminación biológica representa una alternativa viable dentro de los procesos depurativos del agua.

Por su parte, los sistemas experimentales empacados con PP en ambas condiciones de operación no mostraron ningún efecto filtrante (0%), al recuperar el 100% del material biológico introducido en todos los casos. Los ensayos efectuados con SiO₂ evidenciaron una retención del 100%, al igual que los otros materiales sólidos en ambas condiciones de operación. Estas evidencias dan certeza de un efecto filtrante promovido por los materiales minerales, tanto por los AM, así como por el SiO₂. En particular, el AM₁ y SiO₂, que

presentan un mayor contenido de cuarzo, lo cual sugeriría un mayor efecto interactivo con los HTC. No obstante los tres medios evidenciaron una remoción total del material helmintológico (Figura 5-35).



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; PP= Perlas plásticas

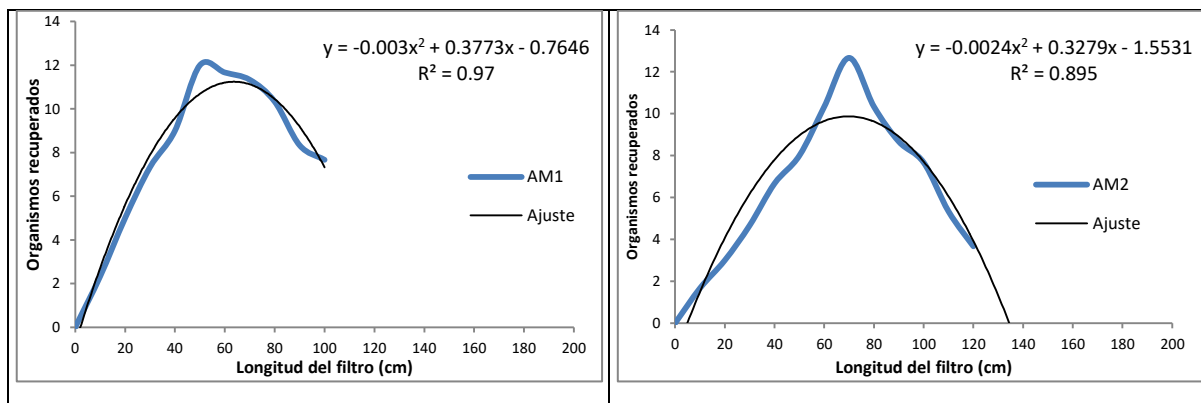
Imagen de elaboración propia

Figura 5-35. HTC retenidos por los sistemas empacados en OD y OM

De manera adicional, un examen exhaustivo al lecho filtrante, así como al filtrado en ambos tipos de operación evidenció una diferencia entre los HH introducidos y recuperados. De hecho, el análisis de búsqueda de organismos dentro del filtro *Millipore* evidenció restos de material no pétreo. Los anteriores sugirieron ser de naturaleza biológica, dada la similitud a los componentes del organismo (material ondulado con simetría marcada), que sugieren ser principalmente las capas del huevecillo introducido al sistema experimental. Ello indicaría la existencia del efecto de un estrés mecánico derivado del proceso filtrante al cual fueron sometidos los huevecillos, el cual es capaz inclusive ser capaz de destruirlos, tal como lo evidencian en todos los casos las MEB obtenidas en los ensayos.

Los ensayos efectuados en OD empacados con el AM₁, AM₂ y SiO₂, mostraron un incremento de la pérdida de organismos, en relación a la profundidad del lecho y su avance al interior del sistema experimental. De hecho, la diferencia entre los organismos introducidos y recuperados se inició a partir de los 60 y 70 cm, respectivamente. Por su parte el AM₁ presentó una diferencia de un 2, 2, 6 y 13 %, hasta los 100 cm, mientras que el AM₂ registró 15, 11, 6, 15 y 11%, no recuperando y no encontrando organismos después de las estimaciones correspondientes a los 100 y 120 cm y finalmente el SiO₂ con 18, 15, 12, 7 y 3%.

Para proyectar la posible destrucción del material helmintológico se efectuó un modelo ajuste para ambos medios de empaque. La ecuación que presentó el mejor ajuste en OD fue de tipo cuadrático en ambos casos con un $R^2 = 0.970$ para el AM_1 y de 0.895 para el AM_2 (Figura 5-36). Dicha proyección permitió determinar la profundidad teórica de la destrucción total del HH, la cual ocurriría aproximadamente a los 123 y 131 cm, respectivamente. Por su parte, el filtro empacado con SiO_2 se encontraría representada por $y = -0.0019x^2 + 0.2814x + 0.9764$ con un coeficiente de correlación de 0.7612 , donde la profundidad necesaria para destruirlos se constituiría por 151 cm.



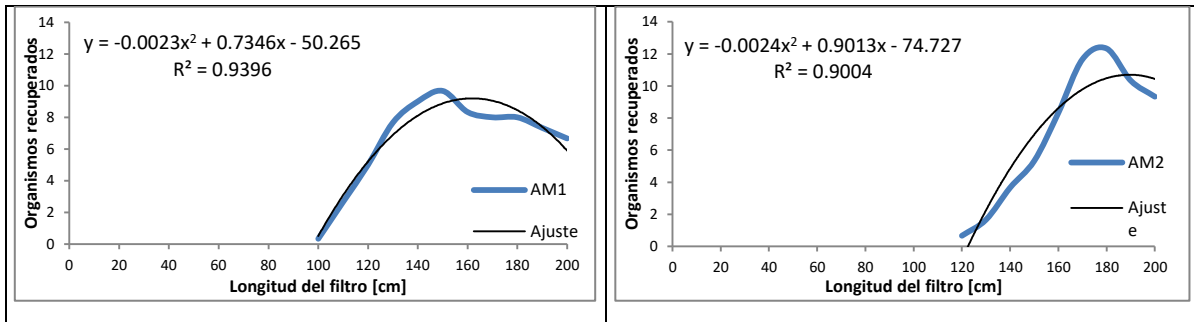
AM_1 = Agregado mineral 1; AM_2 = Agregado mineral 2

Imagen de elaboración propia

Figura 5-36. HTC recuperados del medio filtrante

De igual manera en los ensayos efectuados en OM se observaron fenómenos similares en cuestión de la diferencia de los organismos recuperados con respecto a las variables antes mencionadas. Dicho fenómeno se presentó a partir de los 150 y 180 cm en el sistema empacados con el AM_1 y AM_2 . El primero de ellos presentó un 8, 2, 0, 4 y 4%, mientras que el AM_2 registró 13 y 6%. No obstante, la profundidad máxima evaluada correspondió a 200 cm, donde para conocer los comportamientos de la posible destrucción de los organismos en longitudes posteriores se efectuó un nuevo modelo de ajuste. Igualmente, el comportamiento de los organismos registrado al interior del sistema correspondió a una ecuación de tipo cuadrático para ambos ensayos (AM_1 y AM_2) con un R^2 de 0.9396 para el primero y 0.9004 para el segundo (Figura 5-37). Las proyecciones generadas a partir de la ecuación de ajuste en cada caso, permitió determinar la destrucción total de los HH, la cual ocurriría aproximadamente a los 220 y 252 cm, respectivamente (Figura 5-37). Por su parte,

la ocurrida en el SiO₂ se encontraría representada por $y = -0.0016x^2 + 0.5347x - 39.653$, con un coeficiente de correlación de 0.7632, donde dicho fenómeno ocurriría a los 223 cm.



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

Imagen de elaboración propia

Figura 5-37 Ecuaciones de ajuste de filtración

Lo anterior sugiere la ocurrencia de fenómenos mecánicos similares en ambas operaciones y medios de empaque. En particular, dicha proyección evidencia en el caso de OD que los HH introducidos serían destruidos aproximadamente a los 130 cm de profundidad, recuperando con ello solo restos del organismo en ambos casos para los segmentos posteriores. Aunque, la profundidad propuesta (200 cm) y tiempo de permanencia proyectados por diseño (90 min) cubren el peor escenario, así como consideraciones del tiempo de larvado, que en HTC (oscila entre 28-30 días).

Ello, es corroborado empleando las ecuaciones de ajuste a partir de datos experimentales, que corresponderían a los tiempos teóricos de retención o permanencia dentro del filtro. El sistema filtrante empacado con AM₁ correspondió a 34.22 días y para el AM₂ es de 27.77 días, mientras que en OM acorde a las modificaciones operativas corresponde a 4.27 y 4.78 días, respectivamente. De hecho la calibración de dichos valores podría constituir criterios de diseño. No obstante, el ensayo demostró que la profundidad del lecho en OM destruiría solo un 35% de los huevecillos. Sin embargo, el lecho adicional de 20 y 52 cm (para el AM₁ y AM₂) en dicha operación lograría la destrucción del 100% de los organismos, aumentando su tiempo de permanencia a 4.77 y 6.02 días.

El seguimiento al material helmintológico mediante la apertura del sistema, recuperación y análisis del medio de empaque también evidenció un avance promedio de los HH en OD de 0.004 y 0.005 cm min⁻¹ para el AM₁ y AM₂, mientras que en OM fue de 0.029 y 0.032 cm

min^{-1} , respectivamente. De manera comparativa, la filtración entre ambos agregados bajo la misma operación resulta diferente hasta en un 20%, acentuándose particularmente en OM.

La operación de los sistemas experimentales mostró una filtración promedio diferenciada por cada sección de 10 cm en OD de 10% para el AM₁, 6% para el AM₂ y 8% para el SiO₂, mientras que en OM fue de 5% para el AM₁ y SiO₂ y de 4% para el AM₂. Ello sugiere que a mayor gasto se manifiesta la estructura del material como barrera.

Lo anterior, sugiere que la primera parte del filtro aporta la atenuación del contenido biológico, probablemente originado por la tortuosidad generada al interior del lecho. Sin embargo, una vez ocurrido dicho fenómeno, se observa un comportamiento de retención similar en ambos tipos de operación.

5.2.3 *Tiempo de contacto y avance promedio del HTC*

A partir del ensayo experimental de los filtros empacados con AM (1 y 2) se encontró que la probabilidad promedio de retención en el espacio intersticial entre los agregados representó un 0.61-0.65% para el AM₁, mientras que para el AM₂ fue de 0.58-0.62%. Dichos valores, también soportan lo propuesto en el presente trabajo, acerca de la interacción de los AM y los HH y que derivan en su efecto sobre la viabilidad. Asimismo, se estimó que el recorrido del HTC sería de aproximadamente de 43481 y 17860 probables eventos que involucren su retención, donde en cada uno puede ocurrir un daño parcial o letal originado de la estructura del agregado, así como por el contenido químico biocida. Adicionalmente el avance promedio del huevecillo al interior del sistema resultó ser en OD para el AM₁ de 0.053 y 0.067 cm h^{-1} para el AM₂ (Figura 16-1 y Figura 16-2), mientras que para el AM₂, en OM fue de 4.26 y 4.1 cm h^{-1} (Figura 16-3 y Figura 16-4), correspondientes a 0.78 y 0.96 veces más rápido en el caso del AM₁. El ensayo inactivó o retuvo a los HH introducidos al sistema antes de la profundidad máxima en todos los casos. Por ello, se efectuaron ecuaciones de ajuste para proyectar el tiempo de contacto total efectivo del organismo en el sistema, así como el comportamiento generalizado brindado por la filtración en cada empaque y operación. Todos los ajustes resultaron de tipo potencial con un coeficiente de correlación (R^2) de entre 0.95 y 0.99, tal como se muestra en la Tabla 5-15. La OD ofreció un tiempo de contacto de 32.05 d para el AM₁ y 25.73 d para el AM₂, mientras, que en OM fue de 1.04 y 0.8 d, respectivamente.

Tabla 5-15 Condiciones de operación empleadas

	OD		OM	
	AM1	AM2	AM1	AM2
Ecuación ajustada	$y=205.89x^{1.0224}$	$y=126.41x^{1.0722}$	$y=0.1738x^{1.7109}$	$y=0.243x^{1.6106}$
R²	0.9802	0.9917	0.9511	0.9882
Número de contactos	46166	37063	1502.73	1234.93

AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; x=profundidad del lecho (cm); y= tiempo (min)

Tabla de elaboración propia

5.2.4 Relación β

Los resultados evidencian el material retenido en los diferentes sistemas filtrantes a profundidad progresiva (analizados como filtros unitarios). Ellos relacionan la cantidad de material previo al punto de análisis (retenido), con respecto al que logró pasar (debajo del punto de muestreo) para cada incremento de longitud.

En OD (Tabla 16-1 y Tabla 16-3) es posible identificar en el AM₁ el aumento continuo de dicho parámetro, a partir de los 10 cm, hasta los 50 cm de profundidad de lecho filtrante, logrando para el coeficiente, desde 1.18, hasta 5.62, mientras que en el AM₂, se alcanza a los 70 cm, reportando, desde 1.12, hasta 6.42. No obstante, ambos casos registran eficiencias superiores al 80%, mientras que el resto del lecho señala valores (9-45), así como, (7.5-45), respectivamente. Los anteriores corresponden a la retención de una menor cantidad de biomasa, con respecto a la longitud y al introducido al inicio del sistema. Sin embargo, el comportamiento del sistema experimental con relación a dicho parámetro apunta a un buen funcionamiento y diseño del filtro, ya que la filtración debe ocurrir en su mayoría dentro del primer tercio de éste, mientras que en el resto ocurre de forma paulatina.

Por otro lado, en OM se identificó un comportamiento para dicha relación de 1 (uno), durante la primera mitad del sistema filtrante 100 para y 110 cm (Tabla 16-2 y Tabla 16-4), lo cual refleja una nula capacidad de retención bajo las condiciones de operación establecidas. Dicha sección funciona como regulador de velocidad del influente, tal como

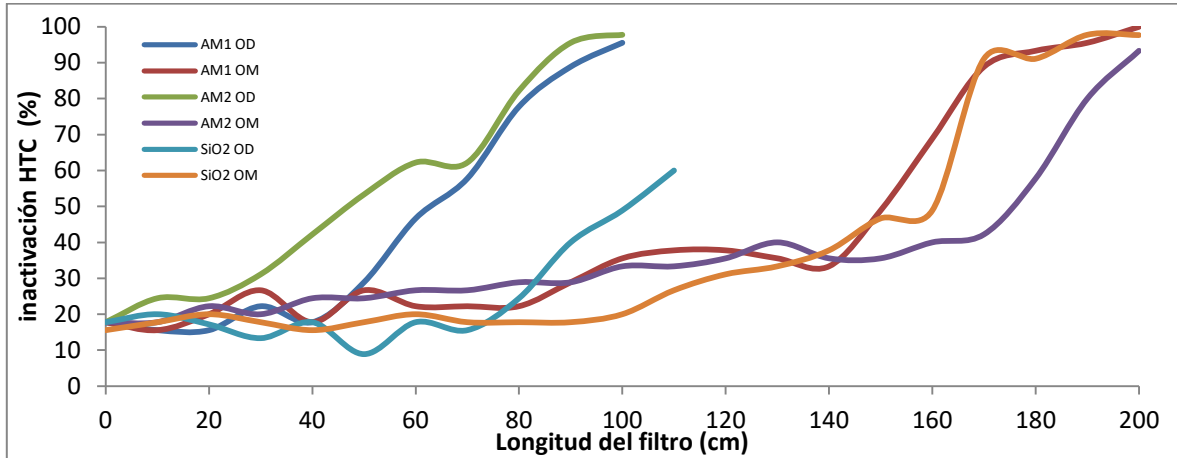
Lo evidencia el diferencial de gasto obtenido a profundidades superiores. La filtración se inicia a partir de una profundidad de 110 y 120 cm, en cada caso, reportando el incremento de dicho coeficiente desde 1.02, hasta 6.42 para el AM₁ y 1.05-450 en el AM₂, ambos en un intervalo de 60 cm, con retención progresiva y el doble de filtración, con respecto a cada segmento de longitud (10 cm), en comparación con la OD. El análisis integral (independiente) del filtro arrojó, que a partir de 70 cm para el AM₁ y 90 cm para el AM₂ como filtros eficientes, con valores superiores al 90 cm, con coeficientes β de 15-45 y 22-45, respectivamente, que representan hasta 40 y 44 veces dicho parámetro. Por su parte, en OM resultó dicho fenómeno a partir de la profundidad de 180 cm en ambos casos, reportando 11.25-45 y 15-45, con 42 y 44 veces, en comparación con la ocurrida para los primeros 10 cm de profundidad, alcanzando eficiencias superiores al 90% en ambos casos. Las estimaciones muestran porcentajes de filtración progresivas en ambos tipos de operación con respecto al incremento de la profundidad del lecho filtrante, aunque en diferentes secciones. No obstante, los filtros con una mayor relación beta retienen más huevecillos y tienen una mayor eficiencia.

5.2.5 Ensayos de inactivación en columnas empacadas

La operación de cada sistema se realizó de dos maneras (en OD y OM), empleando de manera independiente, AM₁, AM₂, SiO₂ y PP como empaque dentro del sistema experimental. En ellas, se alcanzó en ambos tipos de operación un 100% de PV para los agregados (1 y 2), mientras que para el SiO₂, se logró hasta un 60% y un 96%, respectivamente. Por su parte, las PP no registraron ningún efecto sobre la viabilidad de los huevecillos en ningún ensayo. La inactivación de los HH aumentó con respecto a la profundidad del lecho en todos los casos, tal como sugieren las mediciones efectuadas por LIV para los organismos recuperados en cada punto de muestreo del filtro.

Las PV evaluadas en OD ocurrieron a los 120 cm para el SiO₂, a los 100 cm para el AM₁ y a los 80 cm en el AM₂, resultando ésta última la de menor profundidad de todo el ensayo. La inactivación ofrecida por cada sistema empacado con AM₁, AM₂ y SiO₂ ofreció por cada sección del lecho evaluada (10 cm) una inactivación promedio de 10±11%, 7±7% y 8±5%, respectivamente. Por su parte, en OM se consiguió entre 170 (AM₂) y 190 cm (AM₁ y SiO₂), con una inactivación promedio por ΔL de 7±6%, 3±6% y 8±5%, sugiriendo que

dicha diferencia es consecuencia del contenido particular de cada AM. Lo anterior se acentúa en OD con una diferencia de hasta 13 y 40% para el AM₁ y SiO₂, en comparación con el AM₂, que logra la inactivación de la totalidad de los huevecillos con 20 cm menos (Figura 5-38).



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

Imagen de elaboración propia

Figura 5-38 Ensayos de inactivación en columnas empacadas para OD y OM

La PV de los HH se determinó para cada sección del sistema por incubación *in vitro* mediante inspección visual con ayuda de MO, logrando identificar dos tipos de huevos; a) con ruptura parcial o total (capas y núcleo), que resultan inviables y b) sin evidenciar un aparente daño físico, aunque con resultado negativo de viabilidad. Ambos comportamientos resultaron progresivos en cuestión de inactivación con respecto a la profundidad del lecho filtrante del cual fueron recuperados, aunque el incremento de las curvas de inactivación obtenidas por ensayos en matraz no reportan los mismos resultados. Esto sugiere que la inactivación se deriva por efectos mecánicos y químicos y que no es necesaria la ruptura total del organismo para incidir un efecto sobre su inactivación.

5.2.5.1 Caracterización de la inactivación

El AM₁ (en OD) obtuvo sus primeros resultados de inactivación a partir de una profundidad de 50 cm, sin encontrar daño considerable (por MO) en los HTC introducidos. Sin embargo, a partir de la siguiente sección (60 cm) se identificaron huevecillos con ruptura parcial y gradualmente acrecentada con respecto a la profundidad del lecho, así como un

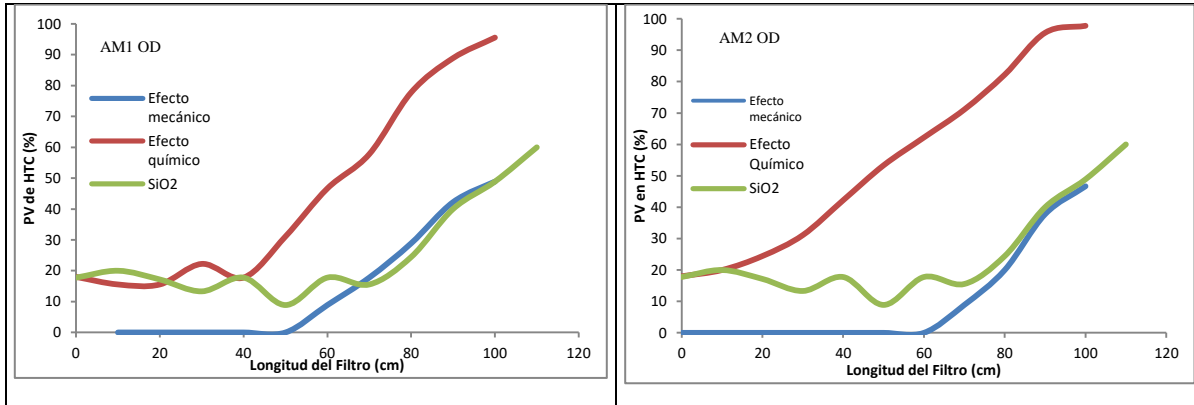
efecto en el incremento en la PV estimada hasta en un 10% por cada ΔL . De manera particular el daño mecánico ocurrió en el intervalo de 50-100 cm. De hecho, le fue atribuido hasta un 43% de la inactivación derivada el proceso, con un promedio de $5 \pm 5\%$ por cada segmento analizado, mientras, que la estimada por incubación fue de 95.5%, con un promedio de $7 \pm 7\%$, donde ésta última sugiere ser consecuencia del contenido del agregado mismo, en conjunción del efecto producido por su estructura cortante sobre los HTC.

No obstante, los ensayos con SiO_2 muestran un comportamiento similar en cuanto a la inactivación de los HH, en comparación al obtenido para el agregado durante todo el ensayo (curvas similares). Lo anterior, apunta a que la PV en el ensayo empacado con AM_1 es relevante la interacción del medio filtrante con los huevecillos, ya sea por efectos químicos y/o mecánicos, donde ésta última adquiere una mayor responsabilidad del efecto sobre los HH.

Para el AM_2 evidenció un comportamiento diferente en comparación al AM_1 , al presentar inactivación de los organismos desde la primera medición (10 cm), no encontrando evidencia de HH fracturados o potencialmente dañados. Ello sugiere, que éste es promovido por el contenido del agregado, más que por la presencia de SiO_2 . Dicha tendencia de incremento en la inactivación se mantuvo consistente hasta los 90 cm, logrando hasta un 98% de PV, con una relación de $8 \pm 3\%$ por cada segmento analizado. Por su parte, el efecto mecánico inducido sobre los HH resultó ser responsable hasta del 43%, con promedio de $12 \pm 4\%$, ocurrido a partir de los 60, hasta los 100 cm. Los ensayos efectuados con el AM_1 mostraron una inactivación similar al registrado por el SiO_2 , lo cual indica que existe un efecto relacionado con el contenido del agregado. No obstante, que la PV es resultante de factores mecánicos que dañan al huevecillo, así como el contenido del agregado, que resulta influir sobre la viabilidad del mismo.

Los resultados indican en OD, que el aumento del tiempo de contacto derivado por el avance lento del organismo dentro de los sistemas filtrantes contribuye a la PV del HTC. En conjunto, la estructura del mineral y el contenido del mismo promueven su inactivación, aunque ambos AM poseen contenido con poder biocida (Ag, Cu, Fe, Al, Ti y Zn) (Ruparelia et al., 2008; Dubas et al., 2006; Panacek et al., 2006; Morones et al., 2005;

Sondi y Salopek-Sondi, 2004), se evidencian comportamientos particulares en cada caso, tal como se muestra la Figura 5-39.



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño

Imagen de elaboración propia

Figura 5-39. Efecto mecánico y químico en OD

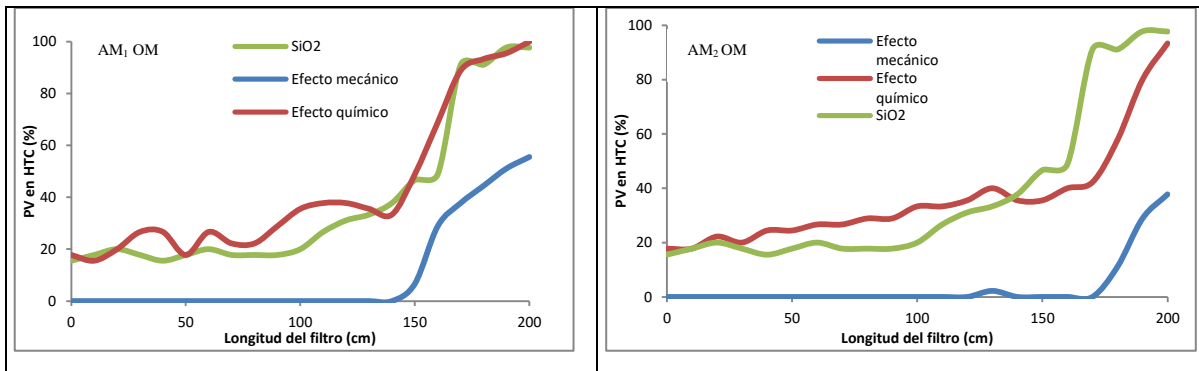
El AM₂ promueve la inactivación desde las primeras secciones como consecuencia del contenido nocivo para los HH antes mencionados. De manera particular éste contiene sulfuros en $\approx 10\%$, que resultan también tóxicos para los organismos (Reyna, 2014), en comparación con el AM₁ que no evidencia un marcado efecto químico durante la primer sección del filtro, al contener $\approx 4\%$.

Por otro lado, el AM₁ promueve en mayor grado la inactivación por efectos mecánicos, en comparación con el AM₂. Dicho resultado sugiere ser consecuencia del contenido de SiO₂, correspondiente al 91% para el primer agregado y 63% para el segundo. No obstante, ambos ejercen inactivación mecánica, tal como lo demuestra de manera comparativa la curva generada para el SiO₂ (que contiene un 99%), al evidenciar valores similares en cuanto a la PV durante el proceso (Figura 5-39). Asimismo, los resultados obtenidos sugieren la PV ser consecuencia de la interacción de efectos mecánicos y químicos, dónde la composición del AM es de suma importancia dentro del proceso, ya que refleja la magnitud de cada efecto ejercido sobre el HH, aunque cada uno contribuye en promover la inactivación del organismo y que se incrementa en relación a la longitud del proceso.

Los ensayos efectuados en OM mostraron comportamientos diferentes para cada AM. El AM₁, no evidenció organismos potencialmente dañados durante los primeros 140 cm del proceso. Sin embargo, el resto del lecho filtrante (conformado por los 60 cm restantes)

manifestó de manera progresiva la presencia de HH con ruptura parcial o total con una tasa de $9\pm 7\%$ por cada sección analizada, logrando una PV total de 57% por dicho efecto. La inactivación por incubación para organismos sin daño aparente, tuvo un comportamiento similar al antes mencionado a partir de los 100 cm y que logró 100% de inactivación en los filtros con longitud de 200 cm, con un promedio de PV de $4\pm 7\%$ por cada segmento cruzado por el organismo. La última, sugiere ser consecuencia de la combinación del efecto mecánico y químico ofrecido por la composición y estructura del agregado, tal como lo muestra la inclinación ascendente de la curva en la Figura 5-40.

Los ensayos con SiO₂, mostraron un comportamiento menor al obtenido por incubación durante todo el ensayo (aunque cercano a dicha curva). La anterior apunta al efecto químico inducido por el AM₁ sobre la PV, así como el mecánico producido por el mismo. No obstante, éste se incrementa en el SiO₂ por la longitud del filtro y la probabilidad de producir daño sobre el HH como consecuencia de los impactos derivados del recorrido al interior del filtro.



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño

Imagen de elaboración propia

Figura 5-40. Efecto mecánico y químico en OM

De igual manera que la PV en el ensayo empacado con AM₁ deriva la inactivación de los huevecillos por efectos químicos y/o mecánicos, dónde ésta última adquiere una mayor responsabilidad del efecto sobre los HH a medida que la longitud del lecho filtrante se incrementa. Asimismo, a que las condiciones de gasto introducido al sistema impacta sobre la inactivación de los HTC al disminuir la interacción y el tiempo de contacto con el AM, tal como lo sugieren los resultados obtenidos durante los 100 cm, donde, no se observa una inactivación, tal como sucedió en OD con el mismo agregado.



Por su parte, el AM₂ promueve la inactivación progresiva a partir de las primeras estimaciones, logrando hasta 20% en la sección de 10-160 cm, con un promedio de $4\pm 6\%$ para cada ΔL . No obstante en OD se observa una curva con incrementos graduales, en comparación a lo ocurrido en el AM₂, donde para 160-200 cm ocurre un 60% de la PV total, con un promedio $17\pm 4\%$. Dicho comportamiento, sugiere ser consecuencia del efecto químico inducido sobre la viabilidad del HH, en particular para los primeros 160 cm, resultando más representativo que el efecto mecánico inducido por el agregado. No obstante, la curva generada a partir de 170 cm, identificaron HH con daños estructurales incrementados de manera progresiva resultando hasta en un 39% de PV, con un efecto de $25\pm 13\%$ por ΔL analizado.

La curva de inactivación obtenida para el SiO₂ resultó cercana a la correspondiente a la PV por incubación, lo cual refuerza la idea de la inactivación por efecto mecánico, así como su incremento con respecto a la profundidad del lecho filtrante. No obstante, ambos AM ejercen inactivación mecánica, tal como lo demuestra de manera comparativa la curva generada para el SiO₂, donde en todos los casos se encontraron organismos que sugieren perder la viabilidad por efectos mecánicos (observaciones al MO y MEB), que derivan en daños estructurales; a pesar de la diferencia de contenido de SiO₂ en los agregados. Estos resultados sugieren, que la PV es resultado de la interacción de efectos mecánicos y químicos, donde la composición del AM es de suma importancia dentro del proceso, ya que refleja la magnitud de cada efecto ejercido sobre el HH. Por otro lado, cada efecto es particularmente importante dentro del proceso para promover la inactivación del huevecillo, el cual adquiere una mayor representatividad de acuerdo su desarrollo particular.

5.2.6 Efecto sinérgico

La respuesta de inactivación derivada por efecto químico y mecánico fue caracterizada para identificar su independencia. Sin embargo, los ensayos en matraz sugieren la PV como resultado de la interacción de ambos. Su exploración se realizó mediante el contraste de la inactivación por efecto “no sinérgico”, resultante de la suma del daño mecánico más el daño químico, contra el registro de inactivación obtenido en el sistema experimental. La curva obtenida para el primer caso correspondería a un efecto no interactivo (“no

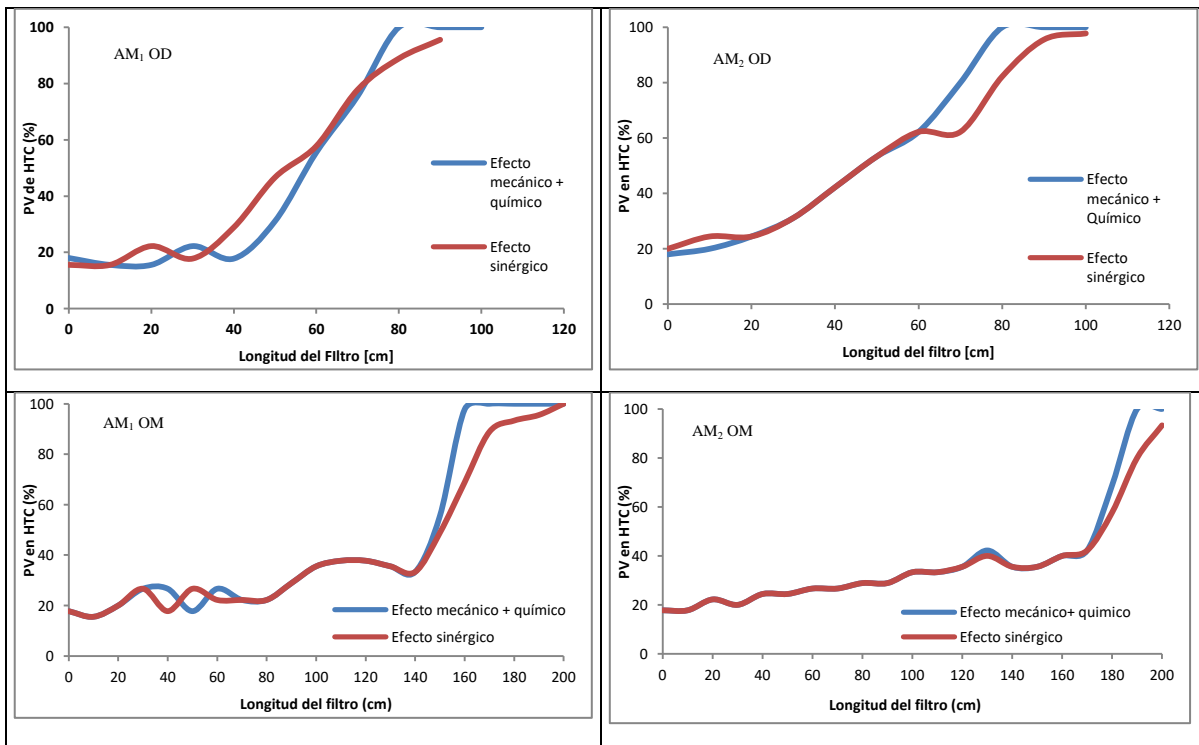
sinérgico”), mientras que la segunda, sería de un interactivo (“sinérgico”), ver la Figura 5-40. No obstante, el presente trabajo enfatiza en la ocurrencia de daños por efecto mecánico y/o químico progresivos durante todo el proceso, que impacta en la representatividad de cada uno y su modificación con respecto al avance del ensayo.

La Figura 5-40 en la OD muestra para las curvas del AM_1 y AM_2 , para las secciones 0-30 y 0-60 cm una inactivación no sinérgica, al mostrar el traslape de ambas curvas. Éste, sugiere ser derivado principalmente del efecto químico inducido por el contenido del AM, tal como se mencionó anteriormente durante los ensayos de filtrado. Sin embargo, el resto de la prueba (hasta 200 cm) evidencia a ambas curvas diferenciadas, que apuntan principalmente hacia un efecto sinérgico de naturaleza mecánica observado mediante la aparición de HH con daños (parcial o total) que derivan en la PV del huevecillo. Sin embargo, también se identificaron cambios al interior del huevecillo, que sugieren la aportación de un efecto químico y que podrían implicar la inactivación del mismo. Lo anterior indica una combinación de efectos acorde al tiempo de contacto, la profundidad del lecho y la naturaleza del AM.

De igual manera para la OM se evidenció un comportamiento no sinérgico para el AM_2 durante los primeros 140 cm de profundidad del lecho, al ver la superposición de ambas curvas. Dicho resultado corresponde a una inactivación principalmente por efecto químico, tal como lo apuntan los ensayos previos. Posteriormente, a partir de 150 cm se observa la separación de ambas curvas, lo cual apunta hacia uno sinérgico, donde, en particular el mecánico adquiere una mayor importancia, tal como lo sugieren los HH recuperados y caracterizados previamente. Por su parte, el AM_1 evidenció igualmente un resultado de PV no sinérgico para los primeros 30 cm del proceso resultante principalmente químico. Sin embargo, a partir de 40 cm existe uno de naturaleza mecánica, el cual se incrementa con respecto a la profundidad del lecho y continúa hasta el final del ensayo, tal como lo evidencian los HH introducidos.

En todos los ensayos se observó la participación de ambos fenómenos como promotores de la inactivación del organismo. De acuerdo a los ensayos efectuados, tanto en matraz, como en filtro experimental se relacionan con el tiempo de contacto, así como con la interacción entre el AM y organismo, los cuales actúan de forma acumulativa en su inactivación, ya sea

por efecto químico o mecánico, según sea el caso. Aunque su contribución puede no determinar la PV como único responsable, sin que por ello pueda contribuir como factor parcial dentro de la PV del huevecillo (Figura 5-41).



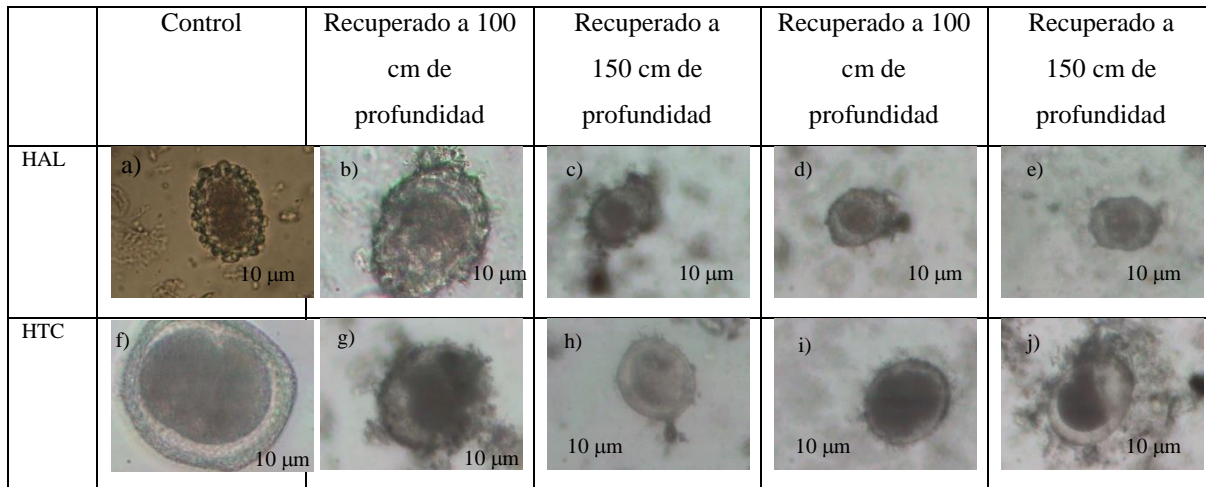
AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño

Imagen de elaboración propia

Figura 5-41 Sinergia de inactivación en columnas empacadas

5.2.7 Daño morfológico en ensayos de columnas empacadas para AM₁ y AM₂

En los huevecillos sometidos al proceso de filtración en ambos tipos de operación evidenciaron daño morfológico visible en comparación con el control, el cual se incrementó con respecto a la profundidad del lecho filtrante, tal como se observa en la Figura 5-42.



HAL= Huevo de *A. lumbricoides*; HTC= Huevo de *T. canis*

Imagen de elaboración propia

Figura 5-42 HH recuperados de ensayos efectuados en el filtro experimenta observados mediante MO (20X)

Las imágenes “a” y “f” muestran al organismo control de HAL y HTC, respectivamente, los cuales presentan sus estructuras definidas y homogéneas. Por otro lado, organismos recuperados del proceso a una profundidad de 100 cm “b” y “g” para el AM₁ y “d” e “i”, para el AM₂ muestran acumulación de partículas del mineral en la cubierta externa, disminución de volumen y forma de las “fosetas” y “mamelones”, así como laceraciones en ella. Asimismo, los organismos recuperados a 150 cm evidencian fenomenologías similares, aunque de mayor severidad, tal como se muestra en las figuras “c” y “h” y “e” y “j”, respectivamente. En ellas, se observa la desaparición de las estructuras características externas de los huevecillos en ambas especies de helminto, así como la nula definición de las capas, ruptura del HH, e inclusive la salida del material nuclear.

A partir de las imágenes obtenidas por MO de los organismos recuperados del sistema filtrante se observan los daños ocasionados con respecto a la profundidad del lecho filtrante. Asimismo, se corrobora en la operación del filtro, que no es necesaria la destrucción total del organismo para favorecer el efecto desinfectante, no obstante, que con ello se garantiza indudablemente su inviabilidad.

5.2.8 Curva de operación

Los sistemas experimentales fueron operados en OD y OM de manera continua durante 15 y 3 días, a un gasto de 0.015 y 0.695 mL seg⁻¹, correspondientes a 1.33 y 60.5 L d⁻¹,

respectivamente, manteniendo una temperatura entre 20-25 °C durante todo el ensayo. Lo anterior para evitar inactivación por motivos asociados a temperatura. Ello, ya que en Darimani et al., (2016), se señala, que valores cercanos 40 °C ocurre el inicio de la curva de inactivación de los HH, resultando la más efectiva para valores cercanos a 50 °C, empleando como modelo *Ascaris suum*.

Todos los ensayos efectuados reportaron curvas de filtración de 100%, así como valores superiores a 90% para la PV. El AM₁ resultó retener organismos en promedio 1.31% para OD (Figura 16-5) y 0.47% en OM (Figura 16-7) con respecto a cada incremento de sección de 10 cm, en comparación con el AM₂. Por otro lado, la inactivación resultó superior para el AM₂ en un 3.07% (OD) (Figura 16-4), aunque, en OM el AM₁ (Figura 16-2), obtuvo un resultado superior en 0.04%. El anterior, apunta al efecto de tipo mecánico ejercido por el contenido del AM₁, el cual adquiere relevancia a medida que se aumenta la profundidad del filtro. No obstante, que el AM₂ promueve un efecto más pronunciado de naturaleza química desde sus primeras estimaciones, aunque con un menor efecto mecánico. Así entonces, el valor final del proceso ambos efectos (mecánico y químico) resulta similar numéricamente en cuestión de la PV. No obstante, que durante las diferentes secciones del sistema existe una inactivación particular promovida por alguno de ellos o por ambos.

En todos los ensayos de inactivación se evidenciaron comportamientos similares descritos por ecuaciones ajustadas de tipo potenciales para la filtración con coeficientes de correlación cercanos a 0.95, así como de tipo polinómicas para las de inactivación con R² entre 0.87-0.97 (Tabla 5-16). No obstante, que durante la OD empleó solo la mitad del sistema para efectuar la filtración, caracterizada por una PV lenta, mientras que en OM ocurrieron de manera más rápida, tal como lo señalan gráficamente el cambio de curvatura en la Figura 16-5 y Figura 16-7 para el AM₁ y la Figura 16-2 y Figura 16-4 para el AM₂). Ello contrasta con el comportamiento evidenciado en la OM, que requirió de la totalidad del sistema para ofrecer las mismas condiciones. En conjunto, durante ambos sistemas y tipos de operación se encontró que el incremento de la profundidad del lecho aumenta el daño de tipo mecánico y químico ejercido por los AM.

Tabla 5-16 Caracterización de la curva de operación del sistema experimental

Estimaciones	OD		OM	
	1	2	1	2
AM				
PV total (%)	96	98	98	94
Filtración total (%)	100	100	100	100
Tasa de filtración (%) x±s (por sección)	8±7	7±3	4±7	4±6
Tasa de inactivación (%) x±s (por sección)	5±5	8±4	4±7	4±6
Ecuación de ajuste filtración	$y = 0.012x^2 - 2.2067x + 102.19$	$y = 0.007x^2 - 1.645x + 94.969$	$y = -0.0041x^2 + 0.2134x + 100.8$	$y = -0.0055x^2 + 0.6075x + 90.562$
R²	0.9859	0.9845	0.9454	0.9597
Ecuación de inactivación	$y = 11.64e^{0.0216x}$	$y = 20.01e^{0.0171x}$	$y = 14.665e^{0.0089x}$	$y = 17.019e^{0.0066x}$
R²	0.9294	0.9759	0.8737	0.8781

AM= Agregado mineral; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño; R2= Coeficiente de correlación; x= Media; s= Desviación estándar

Tabla de elaboración propia

En OD los valores constantes sugieren que el daño físico y químico se derivan de un arrastre continuo y donde las condiciones físicas del huevo (diferentes en la población) como: diámetro, resistencia de las capas, viabilidad, capacidad de reparación y la ocurrencia de eventos probabilísticos de contacto con plata y algunos otros metales con un efecto sobre la viabilidad (Metcalf, 1996; Begon et al., 1990; Auvinet-Guichard, 1982). De hecho, en combinación con el tiempo de residencia registrado fomentan un resultado constante.

En OM existe un arrastre de mayor fuerza que incrementa el daño mecánico, en particular para el AM₁, con un menor efecto químico para las primeras capas ($\Delta L=10$ cm), ya que la filtración es menor en cada capa. Con lo cual se concluye que la probabilidad de que un huevo resista el recorrido total y salga de aún viable es nula. De hecho la pérdida total de viabilidad se presenta durante la primera parte del lecho y la segunda se encarga de

destronar a los huevos por abrasión, siempre y cuando el huevo llegue con daño mecánico considerable.

La versatilidad del diseño experimentado, permite operar un gasto de hasta 45.5 veces el gasto nominal de diseño, entregando el 100% de porcentajes de filtración y de pérdida de viabilidad, así como el TRH para adecuarlo a otros organismos de interés sanitario. Lo anterior, brindaría una mayor versatilidad y robustez al sistema, al no solo limitarse en eliminar a los organismos para los cuales fue diseñado, sino de estar preparado para agua parcialmente tratada con carga de otro tipo de microorganismos.

5.2.9 Tiempo de saturación y agotamiento del sistema experimental

Los ensayos de filtración emplearon agua destilada y desionizada con duración de un mes. En dicho lapso, solo se logró ocupar el 0.26% del espacio total disponible en el lecho por motivos de operación. Partir de éste, se estimó el tiempo de saturación del filtro, resultando ser de 1393.83 años en OD y 30.91 en OM, con capacidad de tratamiento de 677492 y 637118 L, respectivamente, dónde se recomienda un mantenimiento al 20-30% (Metcalf, 1996) de la saturación. Sin embargo, la calidad de agua a tratar en un escenario real, modificaría drásticamente el tiempo en alcanzar dicho porcentaje.

La forma de alimentación descendente prevé una saturación en primera instancia del primer tercio del sistema en OD, mientras que en OM ocurría en la segunda mitad de éste, alcanzando el tiempo recomendado de mantenimiento aproximadamente a los 6 años de operación. El desazolve de la parte del sistema saturado, consiste en retirar la parte correspondiente del lecho y efectuar un lavado manual y empacar de nueva cuenta, o bien cambiar el material de empaque, lo cual depende del desgaste del material sufrido. Las dimensiones de la tubería (1/2 in ancho y 2 m alto) y el peso del sistema (0.5 kg), permiten un adecuado manejo, ejecución y re-empacamiento por parte del usuario.

Sin embargo, solo se dio seguimiento solo a Ag, Cu y Fe como agentes promotores de la inactivación de HH para determinar el tiempo estimado de agotamiento. No obstante, el contenido elemental del AM es aproximadamente de 32 y 25 elementos en el caso del AM₁ y AM₂, respectivamente. No obstante, ambos agregados contienen algunos elementos reportados con efecto sobre la PV en HH, tales como Ti, Al y Zn (Ruparelia et al., 2008; Dubas et al., 2006; Panacek et al., 2006; Morones et al., 2005; Sondi y Salopek-Sondi,

2008), los cuales no fueron considerados durante el presente trabajo para determinar dicho parámetro. El perfil de disolución efectuado mediante absorción atómica contribuyó a la determinación del agotamiento del material con capacidad biocida. Los tiempos a los cuales la constante de disolución de los metales contenidos en el am agota el metal contenido en el filtro fue para la Ag entre 3-5 años, el Cu, de 1-4.5 años y el Fe de 1-3 años (Tabla 5-17)

Tabla 5-17 Caracterización de condiciones de saturación y agotamiento del medio de empaque en OD y OM.

Característica	AM ₁		AM ₂	
	OD	OM	OD	OM
Tiempo de saturación (años)	1393	31	1393	20
Vol. total tratado hasta saturación (L)	677492		637118	
Tiempo de agotamiento Ag (años)	4.34	3.04	5.23	3.80
Tiempo de agotamiento Cu (años)	3.05	1.60	4.50	3.01
Tiempo de agotamiento Fe (años)	1.26	0.98	2.86	2.34

AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2; OM= Operación máxima; OD= Operación de diseño
Imagen de elaboración propia

El contenido liberado con respecto al tiempo, indica tiempos menores a lo señalado en la normatividad mexicana (ver Tabla 5-20). Otros elementos señalados como peligrosos, tales como As, Cu y Pb, no fueron detectados dentro del extracto analizado bajo las condiciones de la prueba; aunque ellos se encuentran dentro del AM. Cabe mencionar, que en otras condiciones del influente, en conjunto con la forma de operación pueden determinar un contenido diferente dentro del efluente, así como las medidas del mantenimiento a efectuar, las cuales consistirían en el reemplazo del empaque.

Por otro lado, los diagramas y gráficas contenidas en el Figura 16-9, Figura 16-10, las contenidas en el ANEXO IX, así como en el presente trabajo ayudan a precisar los parámetros de inactivación y filtración que debe ofrecer el sistema al momento de la operación. Ésta eficacia puede determinarse por diferentes vías, ya sea por concentración empleada, por tiempo de residencia, por porcentaje de pérdida de viabilidad o de filtración, por profundidad de lecho o por el uso de las ecuaciones que describen la desinfección.

5.2.10 Características relevantes de los AM para ser considerados como agentes desinfectantes

En Metcalf (1996) se señalan algunas características a considerar en el momento de seleccionar algún agente con fines de desinfección. A continuación se muestra el análisis efectuado:

5.2.10.1 Capacidad de disolución del AM

El ensayo de disolución del AM (1 y 2) en medio ácido efectuado por medio de ICP-Ms registró un total de 22 de los 24 elementos que lo componen y 23 de 24. Los análisis efectuados a ambos analitos no evidenciaron rastros de Si, de manera adicional tampoco fue registrado vanadio en el AM₂.

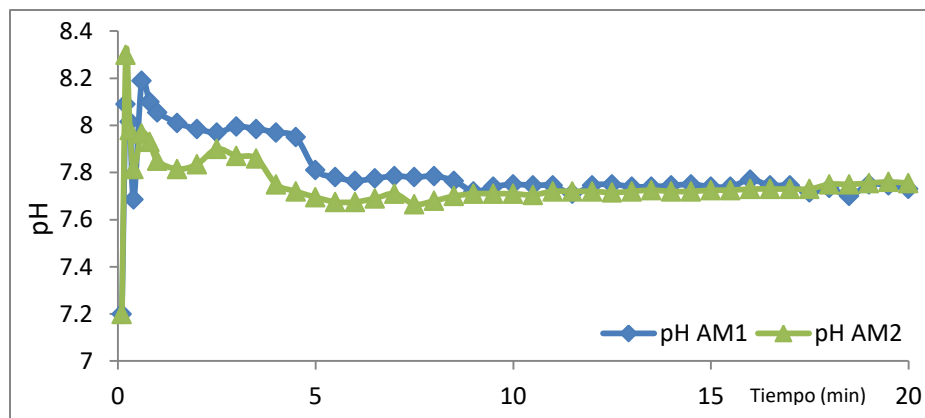
Los elementos con mayor concentración (mg L^{-1}) en los ensayos a tres meses en medio ácido fueron para el AM₁: Zn (47256 ± 3051), Nd (13658 ± 2621), Pb (16844 ± 1301), Mn (11984 ± 3112) y Al (5397 ± 526), correspondientes al 47, 13, 12 y 5%. El resto de los elementos obtuvieron representaciones menores al 2% (1982 ppm), mientras que en el AM₂ fueron: Mn (18221 ± 5456), Nd (16971 ± 719), Zn (13856 ± 3334), Pb (10471 ± 12638) y el resto de los elementos con una representatividad menor al 1% (1296 mg L^{-1}). En medio alcalino para ambos minerales se encontraron 22 de 24 elementos (91.66%), no encontrando Si y Sr, con respecto a la determinación inicial. Los elementos con mayor abundancia en el AM₁ resultaron Zn (47256 ± 3051), Nd (13658 ± 12621), Pb (16844 ± 1301), Mn (11984 ± 3112), encontrando el resto con valores inferiores al 1%. El AM₂ reportó Y (190 ± 83) Al (160 ± 23 y Nd 185 ± 95), así como los elementos restantes con valores menores a 0.1%.

5.2.10.2 Modificación de pH

La evaluación del pH como promotor de la inactivación en HH fue determinado mediante el contacto del AM y Agua Destilada, Desionizada y Esterilizada (ADDE @ pH=7.2). Para ambos AM se registraron cambios instantáneos en el pH durante los primeros dos minutos, alcanzando los máximos en 8.3 para el AM₁ y 8.5 en el AM₂. Posterior a dichos puntos se observan descensos a razón promedio de 0.26 ± 0.09 y 0.26 ± 0.05 unidades de pH por minuto, respectivamente. La prueba se dio por finalizada a los 30 minutos de iniciado el

ensayo. Dicho tiempo fue determinado al no observar cambios mayores a 0.01 unidades de pH en el potenciómetro durante tres réplicas. Sin embargo, se dio seguimiento para descartar cualquier cambio significativo, aunque esto no fue incluido en la Figura 5-43.

La inactivación en HH como consecuencia de pH se explora en Jiménez y Maya (2007), así como en Solís-López (2014), donde se menciona que a pH igual a 4 y 12 en procesos post-estabilización con cal y de tipo Fenton logran eficiencias cercanas al 90% para ambos casos usando como modelos huevos de *Ascaris suum*. El comportamiento del pH en las condiciones del ensayo evaluadas apunta a que dicho parámetro no es considerable para inducir la inactivación de HTC y HAL. No obstante, se desconoce el comportamiento de los HH en contacto con AM en medio ácido o alcalino. No obstante, debido al contenido de sulfuro en los AM, se podría generar “drenaje ácido de mina”, el cual no tendría impacto en el uso previsto.

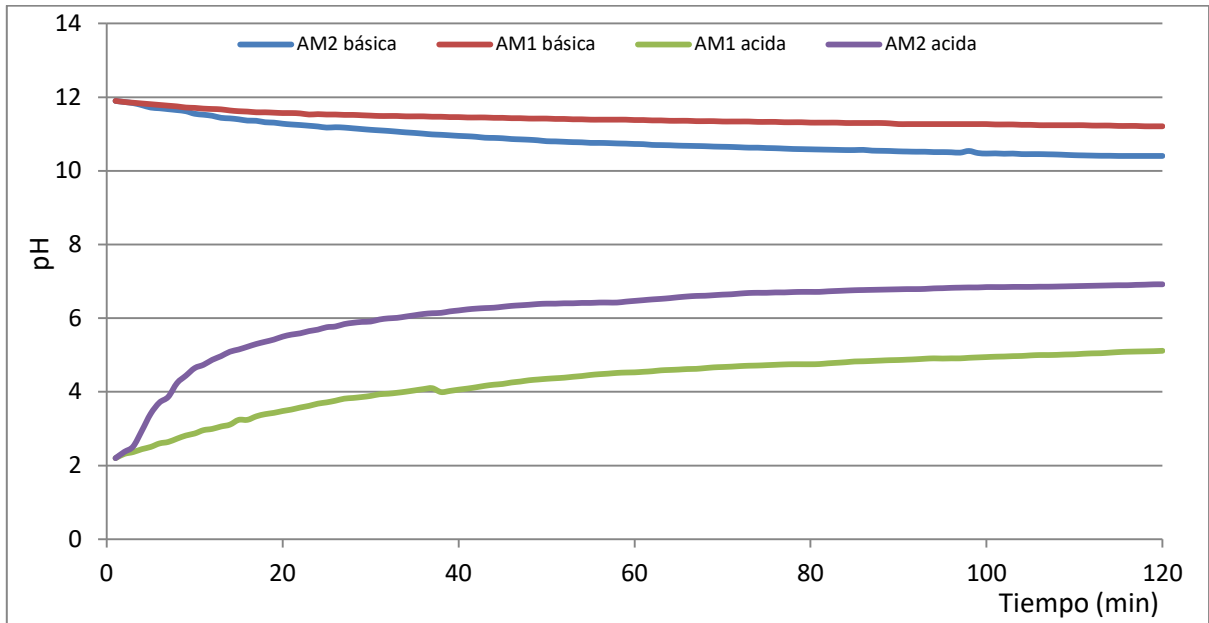


AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

Imagen de elaboración propia

Figura 5-43. Efecto sobre el ADDE al contacto con los AM

Los resultados que simulan las condiciones de acidez (pH=2.1) y alcalinidad (pH=11.9) evidenciaron para ambos AM un comportamiento de tipo “amortiguador”, con tendencia hacia la neutralidad (pH=7). En medio básico se registró una disminución 0.79 y 0.9 unidades de pH al contacto en los agregados 1 y 2, mientras que en el ácido fue de 3.05 y 4.86, respectivamente. El ensayo se dio por finalizado empleando nuevamente el criterio de repetición de observaciones referido anteriormente, transcurriendo éste cuatro horas después de la primera medición. Los valores finales se ubicaron en 11.41 y 11.2 para condiciones alcalinas y básicas en 5.95 y 6.96 (Figura 5-34).



AM₁= Agregado mineral 1; AM₂= Agregado mineral 2

Imagen de elaboración propia

Figura 5-44. Efecto sobre las pruebas con pH extremos al contacto con los AM

De manera comparativa en el ensayo de disolución extrema (pH=11.9 a 2.1) se encontró que en medio ácido existe una pérdida del 9.8 y 6.4% del material contenido en agregado, mientras que para el medio básico es de 1.1 y 0.84%.

5.2.10.3 No colorante

El ensayo de contacto de tres horas entre agua destilada con cada AM (1 y 2), tanto en medio neutro, ácido, como en medio básico no evidenció mediante inspección visual ningún cambio de color. Los resultados obtenidos por medio de nefelometría, arrojaron para la solución neutra 1, 3 y 4 NTU, respectivamente. Lo anterior sugiere, que la implementación de los agregados minerales como medio filtrante no contribuye de manera negativa al aspecto visual del caudal introducido. No obstante, dicho ensayo fue efectuado empleando una solución de NaOH llevado a pH=2.1 y otro con H₂SO₄ a un pH=11.9 para efectos de disolución del medio, aunque de manera real el caudal en una PTAR doméstica

no ocurriría de la misma manera, al presentar condiciones de pH entre 6 y 8, así como una carga de compuestos diferente, de acuerdo al origen del influente.

5.2.10.4 Disponibilidad

El presente trabajo representa una aproximación al empleo de agregados minerales como promotores de la pérdida de viabilidad en organismos de alta resistencia. La disponibilidad del material es factible, al ubicar sitios de extracción alejados de la veta de explotación, lo cual no presenta ninguna pérdida para la mina, ya que el contenido metálico no resulta redituable para su explotación. Es decir, que el material no proviene de ningún proceso extractivo, asegurando con ello las características de contenido deseadas para impactar a los organismos objetivo.

Asimismo el presente trabajo caracterizó de manera adicional elementos con capacidad biocida (Fe y Cu), contenidos en los AM examinados y que se encuentran de manera natural dentro de las minas, tales como el zinc y titanio, por mencionar algunos. Asimismo el material también registró Nd, que se considera escaso y de demanda dentro de la industria electrónica. Lo anterior indica que minas con otras características pueden ser empleadas y con ello consolidar la exploración de los AM con contenido metálico como agente promotor de la pérdida de viabilidad en organismos.

5.2.10.5 Seguro al manejo y transporte

La naturaleza de los agregados minerales no representa ningún peligro al manejo o al transporte, tal como señalaron las pruebas de explosividad, así como la de reactividad por modificación de temperatura las cuales resultaron en ambos casos negativas.

5.2.10.6 Económicamente viable

Los agregados minerales empleados no se encuentran asociados a un costo. De hecho, la minera no contempla un costo o uso para ellos, ya que no le han encontrado alguna utilidad. Por ello, su implementación como lecho filtrante o dentro de algún proceso depurativo constituye un valor agregado para dicho material y su eventual remuneración.

Los métodos de desinfección comúnmente empleados (cloro, ozono y UV) incorporan equipos adicionales, consumibles, así como, la necesidad de condiciones infraestructurales específicas: la existencia de energía eléctrica, uso de tanques contenedores, dosificadores

especializados, e inclusive, de personal especializado. Por ello, su aplicación resulta complicada, lo cual no ocurre en el caso del sistema propuesto.

De manera comparativa resulta ser la opción de menor costo (Tabla 5-18), aunque éstos no han sido empleados para eliminar otros organismos, así como con agua cruda, o con algún tratamiento parcial, desconociendo con ello su efectividad.

Tabla 5-18 Costo de desinfectantes comúnmente empleados

Desinfectante	Costo \$ m ⁻³	Fuente
ClO ₂	0.10-0.20	FAO, (2017)
NaClO	0.005-0.01	Elaguapotable (2017)
Sistemas de cloración	0.27-0.36	Wikiwater S.A. de C.V. (2017)
Luz UV	0.01-0.03	Germicidal S.A. de C.V. (2017)
ozono	0.03-0.04	Elaguapotable (2017)
Agregados minerales*	0.000025-0.000026	Resultados experimentales

*= No presenta costo adicional en equipos complementarios

Tabla de elaboración propia

5.2.10.7 Efectivo contra los organismos objetivo

Al momento los AM utilizados solo han sido empleados para inactivar huevos de helminto, en particular, huevecillos de *Toxocara canis* y de *Ascaris lumbricoides*, logrando hasta un 96% de inactivación durante los ensayos de contacto. Por otro lado, los ensayos en columna empacada lograron el 100% en los rubros de filtración e inactivación. Ambos casos emplearon un tiempo de 120 min, lo cual hace competitivo a los AM con otros desinfectantes comúnmente empleados (Tabla 5-19). No obstante, en Miranda et al., (2011) se empleó otro agregado para eliminar *Escherichia coli*, logrando un 100% de efectividad en 13 min. Los resultados sugieren que los agregados pueden ser útiles para eliminar otros organismos, haciendo con ello su aplicación para otros organismos con diferente resistencia.

Tabla 5-19 Inactivación de huevos de helminto en condiciones experimentales

Desinfectante	Concentración	Tiempo de contacto (minutos)	Inactivación	Referencia
Ácido Peracético	550 mg L ⁻¹	10	2-3 unidades log	Rojas-Valencia, 2011
H ₂ O ₂ /Fe (II)	280 mmol L ⁻¹ / 10 mmol L	120	84%	Bandala et al., 2012
Fe (II)	10 mmol L ⁻¹	120	30%	Bandala et al., 2012
NaClO ₄	150 mg min L ⁻¹ cloro libre	120	20-30%	Bandala et al., 2012
H ₂ O ₂	3-10 HE L ⁻¹ y cuando es posible reducirlo a < 20 mg TSS L ⁻¹ el contenido de HH será ≤ 1 HE L ⁻¹ .	2280	Reducción 47% Inactivación 37%	Guadagnini et al., 2013
H ₂ O ₂ /radiación solar	Hasta 280 mmol L ⁻¹	120	70%	Bandala et al., 2012
H ₂ O ₂ /UV	30 mg L ⁻¹ 770 mJ cm ²	2280	Reducción 67% nactivación 11%	Guadagnini et al., 2013
O ₃	8.3 mg O ₃ L ⁻¹	45, 90 y 180	80-96%	Gadomska et al., 1991
O ₃	4.6 mg O ₃ L ⁻¹	60	94%	Rojas-Valencia et al., 2004
radiación UV	70 mJ cm ⁻² to 400 mJ cm ⁻²	>60	Reduction 62% Inactivation 10%	Guadagnini et al., 2013
Radiación UV	15370 mJ cm ⁻²	60	Inactivación 93%	Aldawi et al., 2006

Continúa Tabla 5-19 Inactivación de huevos de helminto en condiciones experimentales

Perhidrol	6%	240	95%	Avramova et al., 1985
Radiación Gamma	⁶⁰ Co 5KGy	47.73	100%	De Souza et al., 2011
Solución de Iodo	4%	120	95%	Avramova et al. 1985
Ácido Performico	6%	240	95%	Avramova et al., 1985
Trifosfato de aluminio	6.25 g L ⁻¹	30	100%	Akao et al., 1995
Yodo	10%	40	100 % (Sin motilidad observada)	Ayçiçek et al., 2001
Glutaraldehido	2%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
Cloruro de Benzalkonio	10%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
NaClO₄	7%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
KMnO₄	1%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
Alcohol etílico	70%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
KOH	10%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001
Fenol	3%	10	100%	Ayçiçek et al., 2001

Tabla de elaboración propia

5.2.10.8 Toxicidad

La prueba de germinación efectuada constituye el caso extremo para la utilización de los AM, al presentarse como sustrato de siembra, donde el modelo estadístico $Y_{ijk} = \mu + AM_i + P_j + (AMP)_{ij} + E_{ijk}$, detallado en el 0 y desglosado en Figura 17-1 muestra que no existe ningún efecto interactivo en ninguna para las proporciones que van desde 0% hasta 100% del medio de prueba (AM₁, AM₂, SiO₂ y PP) tal como lo evidenció la prueba estadística de

F, con un $\alpha=0.05$, respectivamente. El ensayo planteó su estimación con tres especies que presentan alta sensibilidad (jitomate, lechuga y trébol), según la prueba OCDE 131. Por otro lado, la prueba de ANOVA realizada para las germinaciones de las tres especies indica que no existe diferencia significativa para las fracciones intermedias (40-60%) de soporte evaluado, en contraste con los extremos de 0 y 100%, donde si existió diferencia. En particular, las PP que no registraron valor, al no registrar crecimiento. Lo anterior parece ser consecuencia de no contar con una fuente de alimentación que favoreciera la germinación y posterior crecimiento de la plántula, mientras que en el caso de los AM1 y AM₂ se registró un valor de entre 66 a 77% idéntica a las empleadas como testigo (70%), con lo cual se puede concluir que no existe efecto interactivo aparente relacionado con la germinación como se muestra en la Figura 5-45.

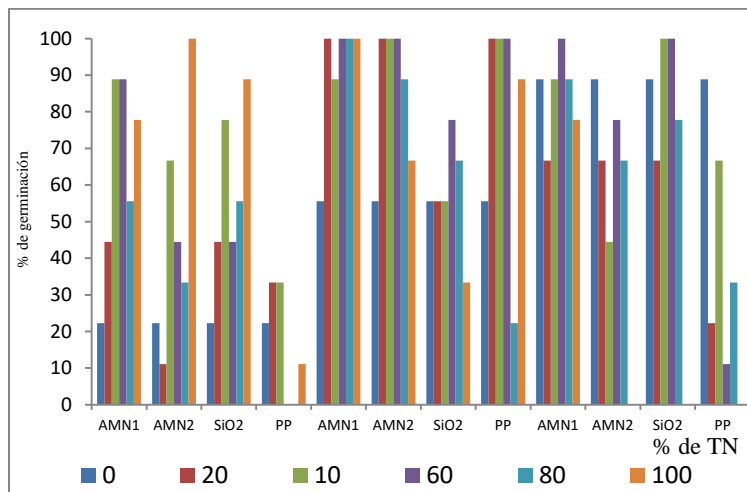


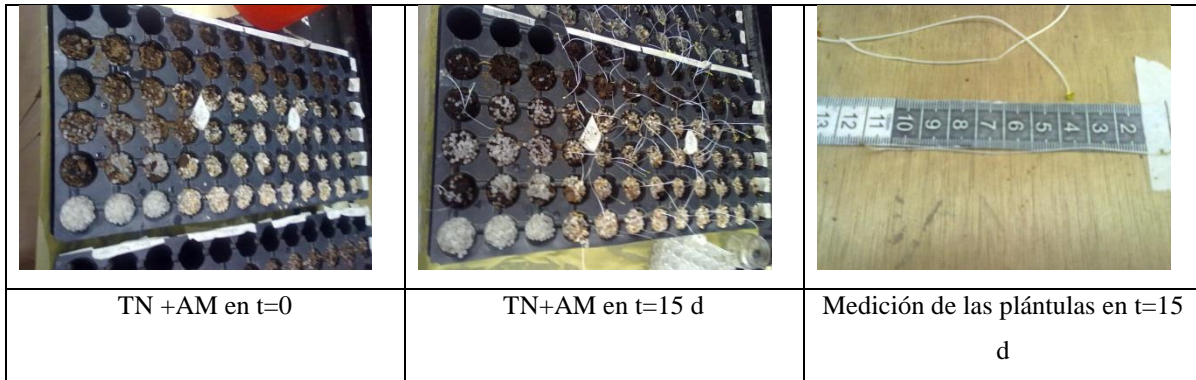
Imagen de elaboración propia
TN= Tierra Negra

Figura 5-45. Ensayos de germinación en diferentes soportes

Por otro lado, el ANOVA efectuado a las tallas finales de las plántulas de las tres especies evaluadas, muestran que no existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en ninguno de los tres casos al obtener para el jitomate 12.5 ± 0.2 , trébol 6.2 ± 0.1 y lechuga 9.3 ± 0.5 cm, mientras que los testigos correspondieron a 12.1 ± 0.8 , trébol 6.5 ± 0.1 y lechuga 9.2 ± 0.1 ,

respectivamente. De hecho se observa que las diferencias son menores al 5% en todos los casos.

Cabe destacar que de igual manera el mayor crecimiento fue observado para las fracciones medias 40-60% de soporte de prueba, mientras que en los extremos de 100% como puede ser observado en la Figura 5-46



TN=Tierra Negra; AM= Agregado Mineral; t=tiempo
Figura 5-46. Ensayos interactivos de germinación

5.2.10.9 Límites Máximos Permisibles por elemento

Los agregados minerales empleados en el presente trabajo, posterior al acondicionamiento de triturado y tamizado registraron una composición de 32 y 36 elementos. Sin embargo, la prueba de disolución a tres horas en condiciones de pH=7 evidenció la presencia solo 14 y 13 elementos en medio líquido, correspondientes al 43 y 36%, respectivamente, donde para ambos lotes se caracterizaron un total de 12 elementos (Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Nd, Pb, Ti, V, Y y Zn). Los anteriores se encuentran referidos en normas comúnmente aplicadas a agua residual tratada, descargas y para consumo humano en México, tales como la NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1997, NOM-127-SSA1-1994, NOM-052-SEMARNAT-1993. El AM₁ supera los valores establecidos por la norma solo en los casos de As, Cr, Cu, Ni y Zn, que representan al 12.5% de los elementos caracterizados, donde, solo los dos primeros (As y Cr) sobrepasan completamente la normatividad referida anteriormente. Lo anterior limitaría su uso posterior, mientras que el resto estaría constituido como uso restringido, al sobrepasar alguna de ellas. Por otra parte el AM₂ solo lo hizo en dos casos (Ni y Zn), que representan

el 5.55% de los elementos que componen al agregado. Sin embargo, de igual manera su uso posterior se encontraría restringido al sobrepasar los LMP establecidos (Tabla 5-20).

Por otro lado, la misma prueba en medio ácido y básico para los AM (1 y 2) se registraron un total de 23 y 22 elementos en ambos agregados. Los registros evidenciaron altas concentraciones en ppm de Zn (47256 ± 3051 y 13856 ± 3334), seguidos de Pb (16844 ± 1301 y 10471 ± 12638), Mn (11984 ± 3112 y 18221 ± 5456) y Nd (13658 ± 2621 y 16971 ± 719), Ca (1259 ± 137 y 978 ± 113), Mg (333 ± 64), así como Sr y Ba con representatividad menor a 2 ppm, en ambos casos, respectivamente. En medio básico el resultado fue de 21 y 22, respectivamente, donde el mayor contenido para el AM₁ se encontró para Zn (8387 ± 14472), Nd (1143 ± 1941), Mn (897 ± 1542), Cu (433 ± 704), mientras que el resto de los elementos caracterizados se ubicaron en valores menores a 60 ppm. Análogamente, el AM₂ fueron Y (190.03 ± 83), Nd (185.06 ± 96), Al (160.60 ± 23), Zn (43 ± 4) y el resto con concentraciones menores a 30 ppm.

Sin embargo, el análisis efectuado por ICP-MS para los blancos compuestos por H₂SO₄, agua destilada y NaOH empleados como medios de disolución ácido, neutro y básico, respectivamente, evidenció la presencia de compuestos ajenos a éstos. La solución básica registró un total de 14 diferentes elementos en la solución ácida y neutra, así como 12 para medio alcalino. (Tabla 11-5). Lo anterior, sugiere que el equipo empleado para las caracterizaciones ya cuenta con memoria. Por ello, el impacto de dicho análisis sugiere la posible ausencia de algunos elementos presentes en los ensayos de disolución efectuados, principalmente de bajo contenido. Sin embargo, solo seis elementos (Ca, Hg, Mg, Sr, Si y Zr) no fueron registrados en ninguno de los medios.

Tabla 5-20. Normatvidad mexicana (LMP) por elemento de los AM₁ y AM₂ en diversas instancias

	NOM-001-SEMARNAT-1996								NOM-002-SEMARNAT-1997		NOM-003-SEMARNAT-1997		NOM-127-SSA1-1994	NOM-052-SEMARNAT-1993		AM1	AM2	Conclusión
	Ríos				Embalses naturales y artificiales				Alcantarillado		Embalses naturales y artificiales							
	Uso en riego Agrícola		Uso público urbano		Protección vida acuática		Uso en riego Agrícola		Uso público urbano									
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.								
Ag	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5	0.06	ND	No Especificado	
Al	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.20	NE	ND	ND	No Especificado	
As	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.5	0.75	0.4	0.05	5	16.03	ND		Si supera	
Au	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	ND	No Especificado	
Ba	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.70	100	0.21	0.02	No Supera	
Ca	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	14.77	32.3	No Especificado	
Co	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.92	ND	No Especificado	
Cr	1	1.5	0.5	1	0.5	1	1.5	0.5	0.5	0.75	1.5	0.05	NE	2.55	ND		Si supera	
Cu	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	10	15	0.4	2	NE	11.89	1.48		Restringido	
Fe	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.30	NE	ND	ND	No Especificado	
Hg	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.015	NE	NE	0.46	ND	ND		No Especificado	
Mg	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	10.44	23.82	No Especificado	
Mn	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.30	NE	61.33	18.48	No Especificado	
Nd	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	18.18	No Especificado	
Ni	2	4	2	4	2	4	2	4	4	6	2	NE	NE	4.37	5.61		Restringido	
Pb	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	1	1.5	0.5	0.025	5	ND	17.04		Restringido	
Si	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	ND	No Especificado	

Continúa Tabla 5-20. Normatvidad mexicana (LMP) por elemento de los AM1 y AM2 en diversas instancias

Sr	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	ND	No Especificado
Ti	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	2.33	0.75	No Especificado
V	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	2.07	0.75	No Especificado
Y	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	47.16	43.48	No Especificado
Zn	10	20	10	20	10	20	10	20	6	9	10	5	NE	13.65	38.91	Si supera	
Zr	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	0.89	No Especificado

Tabla de elaboración propia

En todos los casos concentración expresada en (mg L⁻¹) y las cifras significativas contenidas en norma; NE= No especificada; ND=No determinada; PM=Promedio mensual;

6 CONCLUSIONES

- Los compuestos con contenido de plata, cobre y hierro aplicados directamente sobre los HH, si promueven la inactivación de los HTC y HAL. Asimismo, los agregados minerales también lo hacen, y al ser empleados como lecho dentro de un sistema de filtración remueven organismos del caudal e inclusive los destruyen.
- La evaluación de la inactivación de HH ante agentes con contenido metálico (Fe, Cu y Ag), debe ser efectuada empleando ambas técnicas de medición, ya que algunos de los eventos involucrados en la pérdida de viabilidad del organismo tienen un efecto neto en la osmoregulación, estimables mediante tinción diferencial por exclusión. No obstante, también ocurren otros fenómenos internos, que ocurren en el núcleo, solución hialina y en las cubiertas, que no necesariamente se reflejan directamente en la permeabilidad selectiva del huevecillo, a los cuales es sensible la técnica de larvado *in vitro*.
- Ambas especies de HH resultaron poseer diferente sensibilidad ante los agentes evaluados. No obstante, todos ellos registraron valores de inactivación superiores al 90%. El orden de efecto desinfectante ejercido sobre los HH resultó específico entre ambas especies, e inclusive entre ambas técnicas. Para *T. canis* usando TDE: AM₂>AM₁>AgNO₃>Fe₂O₃>Cu>Cu₂O>FeSO₄>Ag₂O>CuSO₄>FeS₂>Ag>Ag_(coloidal)>Fe, mientras que por LIV fue: AM₂>AM₁>Ag₂O>Cu₂O>AgNO₃>Fe₂O₃>FeSO₄>CuSO₄>FeS₂>Cu>Ag>Fe>Ag_(coloidal). Por otro lado, *A. lumbricoides* registró: AM₂>AM₁>Cu₂O>FeSO₄>Fe₂O₃>FeS₂>Ag₂O>CuSO₄>Cu>AgNO₃>Ag>Ag_(coloidal)>Fe, mientras que la evaluada por LIV fue AM₂>AM₁>Cu₂O>FeSO₄>Ag₂O>AgNO₃>CuSO₄>FeS₂>Fe₂O₃>Cu>Ag>Ag_(coloidal)>Fe, respectivamente.



- La pérdida de viabilidad en HH derivada del contacto con agentes con Fe, Cu y Ag se apunta a la combinación de eventos, caracterizados por su interacción con los componentes del huevecillo, tales como proteínas, compuestos lipídicos y material genético, que derivan en cambios en la capacidad homeostática, eventos oxidativos y de intervención metabólica, que en conjunto impiden el correcto desarrollo del siguiente estadio, e inclusive en el mantenimiento de las condiciones de regulación selectiva con el medio externo.
- Los ensayos de contacto efectuados entre los HH y los AM sugieren que su pérdida de viabilidad ocurre de manera sinérgica; por efecto mecánico asociado a la abrasión que las estructuras del material pétreo ejercen sobre el organismo, así como por efecto químico derivado de su contenido biocida, el cual ocurre de manera similar a los presentados con otros metales. Asimismo, que el material también puede ejercer la inactivación de forma mecánica o química.
- El sistema de filtración de 2 m y ½ in de longitud fue capaz de retener e inactivar la totalidad de los HH introducidos bajo las condiciones evaluadas. El tiempo de contacto teórico necesario para iniciar la pérdida de viabilidad del huevecillo ocurre durante los primeros 4-7 min de trayecto del organismo. Asimismo, el recorrido del organismo, que puede alcanzar hasta 30 días dentro del sistema de filtración promueve su destrucción total, la cual se acentúa con el aumento de la profundidad del lecho.
- El uso de AM constituye una tecnología alternativa innovadora contra HH al presentar resultados en bajas concentraciones y tiempos de contacto. Asimismo cumple con algunas de las características económicas, químicas y ambientales que hace factible su uso, tales como ser de bajo costo, alta durabilidad, fácil obtención, aplicación, manejo, transporte y disponibilidad.

7 REFERENCIAS

1. Aranda, L.A. 2001. *Evaluación de la aplicación del reactivo de Fenton como un proceso de depuración y de desinfección de aguas residuales*. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM. 82 pp.
2. Aguilar, P., Jiménez, B., Maya, C., Orta, T., Luna, V. 2006. Disinfection of sludge with high pathogenic content using silver and other compounds. *Water Sci. Technol.*, 54, 179-187.
3. Akao, N., Tsukidate, S., Kondo, K., Fujita, K., 1995. In vitro effects of benzalkonium intercalated aluminium triphosphate on the second stage larvae and fertilized eggs of *Toxocara canis*. *Jpn. J. Parasitol.*, 44, 138-142.
4. Aladawi, M.A., Albarodi, H., Hammoudeh, A., Shamma, M., Sharabi, N., 2006. Accelerated larvae development of *Ascaris lumbricoides* eggs with ultraviolet radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 75, 115-119.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. 4^{ta} ed. Ediciones Omega. 1468 pp.
6. Alonso, J.M., Bojanich, M.V., Chamorro, M., Gorodner, M.O. 2000. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, 42, 235-237.
7. Anderson, R.C. y Chabaud, A.G.S., A. Willmott (Eds.). 1974. *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. Nos. 1-10. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal UK, 765 pp.
8. Aquino, L.M. 2007. *Inactivación de esporas de Bacillus subtilis con dióxido de titanio inmovilizado*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ingeniería y Ciencias. Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, 99 pp.
9. Army Corps of Engineers [ACE]. 2010. Multimedia en internet. Filter experiments and design criteria. 1955. U.S Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg (TARDEC), Miss. 34 pp. Multimedia en internet. www.swri.org/4org/d08/tardec/default/filtration/sandantracie.htm, (Consultado en mayo de 2010)
10. Auvinet, G. 1982. *Conceptos y técnicas recientes en materia de filtros para usos geotécnicos*. Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería, UNAM, 46 pp.
11. Avramova, S., Dinev, D., Boeva, V., Dakova, A., Grigorava, M., Khadzhilarska, D., 1985. Study of the effect of some disinfectants on helminth ova. *Epidemiol. Mikrobiol. Infekt. Boles.* 22, 53-56.

12. Ayala I. 2007. *Efecto desinfectante del ozono sobre huevos de helminto, bacterias y amibas en aguas residuales*. Tesis de licenciatura, UNAM. México. D.F. 53 pp.
13. Aycicek, H., Yarsan, E., Tanyksel, H.O., Girginkardesler, N., Ozyurt, K. 2001. Efficacy of Some Disinfectants on Embryonated Eggs of *Toxocara canis*. *M. Turk. J. Med. Sci.*, 31, 35-39
14. Bandala, E.R., González, L., De La Hoz, F., Pelaez, M.A., Dionysiou, D.D., Dunlop, P.S.M., Byrne, J.A., Sanchez, J.L. 2011. Application of azo dyes as dosimetric indicators for enhanced photocatalytic solar disinfection (ENPHOSODIS). *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 218, 185–191.
15. Bandala, E.R., González, L., Sanchez-Salas, J.L., Castillo, J.H. 2012. Inactivation of *Ascaris* eggs in water using sequential solar driven photo-Fenton and free chlo-rine. *J. Water Health.*, 10, 20–30.
16. Bazán, R., Romero, C., Valencia, M., Nazario, J. y García, S. 2000. *Guía de prácticas de Edafología*. Departamento de suelos UNAM, 234 pp.
17. Begon, M., Harper. J.L., Townsend, C.R. 1990. *Ecology*. Blackwell Scientific Publications: Boston, Massachusetts, USA. 945 pp.
18. Bitton, D.S. 1994. *Wastewater Microbiology*. John Wiley and Sons. Inc. USA. 101-111 pp.
19. Bloomfeld, S.F. 1991. *Methods for assessing antimicrobial activity*. En: Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation. The society for applied bacteriology Technical series No. 27. Editado por S. P. Denyer and W.B. Hugo Blackwell scientific publications. Oxford. Gran Bretaña. 1-21 pp.
20. Borkow, G., Gabbay, J. 2005. COPPER As A Biocidal Tool. *Curr. Med. Chem.* 12(18), 2163-2175.
21. Bratton, R., Nesse, R. 1993. *Ascariasis: an infection to watch for immigrants*. *Postgrad Med.*, 93, 171-178.
22. Brusca, R.C., Brusca, G.J. 2002. *Invertebrates*. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A., 37-98 pp.
23. Buendía, J.A. 2001. *Evaluación de las lesiones histopatológicas producidas por las larvas de Toxocara canis en Jerbos (meriones unguiculatus) después del tratamiento con moxidectina*. Tesis Licenciatura (Médico Veterinario Zootecnista)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, 76 pp.

24. Buitrago, G.V., López, A.P., Coronado, A.P., Osorno, F.L. 2004. Determinación de las características físicas y propiedades mecánicas de papa cultivada en Colombia *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.*, 8(1),1-5 pp.
25. Carrasco, J. 2000. Regulation of the synthesis of brain metallothioneins, *Neurotoxicology.*, 19, 661-666.
26. Caspeta-Mandujano, J.M. 2005. *Nematode parasites of freshwater fish in Mexico: key to species, descriptions and distribution*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México, 175 pp.
27. Centro de Investigación y Desarrollo de Tecnología del Agua [CIDTA]. 2010. Multimedia en internet <http://cidta.usal.es/residuales/libros/logo/pdf/DESINFECCION.pdf>, (Consultado en mayo de 2008)
28. *Center for disease control & prevention; Center for global health* [CDC]. 2012. Multimedia en Internet En: http://dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Frames/S-Z/Toxocariasis/body_Toxocariasis_page1.htm y http://dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Frames/S-Z/Ascaris/lumbricoides_page1.htm (Consultada en Enero de 2012)
29. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente [CEPIS]. 2008. Multimedia en internet. <http://www.cepis.opsoms.org/bvsacep/e/sobrecep.html#elcepis>. (Consultado en mayo de 2008)
30. Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. 2010. Nano silver as a new generation of nanoproductions in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28(11), 580-588.
31. Clapp R.B., Homberger, G.M., 1978. Empirical equations for some soil hydraulic properties. *Water Resources Res.* 14, 601-618.
32. Consultora de Sustancias [CSA]. 2012. Toxicología: sustancias. Multimedia en internet. En: <http://www.consultoriamoron.ar/producciones/entrega.asp?identrega=43> (Consultado en Enero de 2012)
33. Davies, R., Etris, S. 1997. The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today*, 30, 107-114.
34. De la Fé, P., Duménigo, B.E., Brito, Alberto, E., Aguilar, J. 2007. Multimedia en internet. *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *Revista Electrónica de Veterinaria.* 7(4), 1-17. Multimedia en internet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html>, (Consultado en octubre de 2008).

35. De Souza, G.S.M.B., Rodrigues, L.A., de Oliveira, W.J., Chernicharo, C.A.L., Guimarães, M.P., Massara, C.L., Grossi, P.A. 2011. Disinfection of domestic effluents by gamma radiation: Effects on the inactivation of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Water Res.* 45, 5523–5528.
36. De Victorica, J., Galvan, M. 2003. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantitation/viability determination of helminths eggs in raw and treated wastewater. *Wat Res.*, 37, 1278-1287.
37. Departamento del Distrito Federal [DDF]. 2008. Multimedia en internet. <http://www.ddf.gob.mx>, (Consultado en octubre de 2008).
38. Dubas, S.T., Kumlangduksana, P., Potiyaraj, P. 2006. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 289, 105–109.
39. Duménigo, B.E., Lao, N. 1994. Prevalencia de *Toxocara canis* en perros caseros de Ciudad de La Habana. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 46, 99-102.
40. Elaguapotable.org. 2017. Multimedia en internet. <http://www.elaguapotable.com/desinfeccion%20con%20ozono.html> (Consultada en mayo de 2017).
41. Ente Nacional de Obras Hídricas de Saneamiento [ENOHS]. 2010. Multimedia en internet. Fundamentación-Cap X- desinfección. Multimedia en internet. http://www.frbb.utn.edu.ar/frbb/images/stories/frbb/materias/residuals_sanitaria/ENOHSa%20Fundamentaciones%20Desinfeccion.pdf, (Consultada en mayo de 2010).
42. Felder, R.M., Rousseau, R.W. 1986. *Elementary Principles of Chemical Processes*, Wiley Series in Chemical Eng, John Wiley & sons 2da ed. 347 pp.
43. Fondo de Población de las Naciones Unidas [UNFPA]. 2012. El agua y la población: El estado de la población mundial, tendencias del medio ambiente Multimedia en internet. <http://www.unfpa.org/swp/2001/espanol/ch02.html> (Consultada en Enero de 2012).
44. Gabriels, D., Lobo, D., Pulido M.M. 2014. Métodos para determinar la conductividad hidráulica saturada y no saturada de los suelos. *Venesuelos* 14, 7-22.
45. Gadomska, K., Maleszewska, J., Krogulska, W., Wichrowska, B., 1991. Analysis of survival rate of *Ascaris suum* (Goeze, 1782) eggs and of *Escherichia coli* in ozone-disinfected water. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.* 39, 347–352.
46. García, J.L., Mejía, L., Bandala, E., Corona, B. 2008. Inactivación de huevos de heminto mediante fotocátalisis homogénea. *Aquaforum*, 12(49), 14-18.

47. Gaudy, A.F., Gaudy, E.T. 1981. *Microbiology for environmental scientist and engineers*. McGraw Hill International. Tokio, Japon. 703 pp.
48. Germicidal S.A. de C.V. 2017. Multimedia en internet. <https://ramaucsa.wordpress.com/2010/12/17/purificacion-de-agua-por-rayos-ultra-violeta-uv/> (Consultado en enero de 2017).
49. Gross, M., Farrell-Poe, K. 2004. *Disinfection University Curriculum Development for Decentralized Wastewater Management*. University of Arizona and Arkansas. 1-19 pp.
50. Guadagnini, R.A., Dos Santos, L.U., Bueno, R.M., Guimarães, J.R. 2013. Inactivation of bacteria and helminth in wastewater treatment plant effluent using oxidation processes. *Water Sci. Technol.* 68, 1825–1829.
51. Gyürék, L.L., Finch, G.R. 1998. Modeling water treatment Chemicals disinfection kinetics. *J. Env. Eng.*, 124, 783-793.
52. *Institute for International Cooperation in Animal Biologics*. 2008. Multimedia en internet. <http://www.cfsph.iastate.edu>, (Consultado en mayo de 2008).
53. Instituto Mexicano del Seguro social [IMSS]. 2009. Comunicado de la Coordinación Social. Multimedia en internet. <http://www.imss.gob.mx/SiteCollectionDocuments/migracion/prensa/Comunicados2009/310309Com110.pdf> (Consultado en octubre de 2010).
54. Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]. 2008. Multimedia en internet. <http://www.insp.mx/rsp/esiduals/articulo.php?id=001206>, (Consultado en mayo 2008)
55. Jenkins, J.B. 1997. *Genética*. Editorial Reverte. 1ed. México, 800 pp.
56. Jiménez, B. 2007. Multimedia en internet. Helminths (worms) eggs control in wastewater and sludge. International Symposium on New Directions in Urban Water Management. UNESCO Paris. Multimedia en internet. <http://www2.gtz.de/Dokumente/oe44/ecosan/en-helminths-eggs-control-wastewater-sludge-2007.pdf>. Sustentado por: DeutscheGesellschaft für technische Zusammenarbeit, (Consultado en mayo 2008).
57. Jiménez, B., Maya, C. 2007. Multimedia en internet. Helminths and Sanitation. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.). Multimedia en internet. <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages60-71.pdf>, (Consultado en mayo de 2008).
58. Johnson, M.D., Lambert, R.J.W., Hanlon, G.W., Denyer S.P. 2002. A rapid method for assessing the suitability of quenching agents for individual biocides as well as combinations. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 784–789 pp.

59. Kappes, T., Domínguez, M., Bello, H., Mella, S., Riedel, G., González-Rocha, G. 2012. Actividad de cobre sobre bacilos gramnegativos multi-resistentes aislados en hospitales chilenos. *Rev. chil. infectol.* 29(6), 622-627
60. Kawashita, M., Toda, S., Kim, H.M., Kokoubo, T., Masuda, N. 2003. Preparation of antibacterial silver-doped silica glass micro-spheres. *J. Biomed. Mater. Res.*, 66A(2), 266-274.
61. Kennedy, M.W. 2005. *Toxocara: the enigmatic parasite* Eds: Holland C. y Smith, H. V. The larval surface. Cap: 3 32-45 pp.
62. Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nano-medicine*, 3, 95-101.
63. Laurent, P. 2005. Multimedia en internet. Household drinking water systems and their impact on people with weakened immunity. Multimedia en internet. http://www.who.int/household_water/research/HWTS_impacts_on_weakened_immunity.pdf, (Consultado en octubre 2010).
64. Leal, M., Gelover, S., Reyes, K., Gómez, L. 2006. *Inactivación de huevos de helminto mediante fotocatalisis solar con TiO₂*. XXX Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Punta del Este, Uruguay.
65. Lebdik, H., Madjene, F., Aoudijit, L., Igould, S. 2017. Metals Nanoparticles in microorganism removal. *IJRMS*, 1, 60-64.
66. Lee, H., Lee, H.J., Sedlak, D.L., Lee, C. 2013. pH-Dependent reactivity of oxidants formed by iron and copper-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. *Chemosphere*, 92, 652-658.
67. Litter, J., Blesa, M.A., Meichtry, M., De la Fuente, L., Levy, K., Mateu, M., Hidalgo M., Apella, C., D'Hiriart, J., Powell, P., Jardim, W., Mntagner, C., Ceballos, B., Cornejo, L., Leal, M.T., Jiménez, A., Rodríguez, J., Rimachi, J., Billvik, M. 2005. Multimedia en internet. Tecnologías Económicas para la desinfección y descontaminación de aguas en zonas rurales de América Latina. Multimedia en internet. <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/agua/pura/Informe2005finalWEB.pdf>, (Consultado en junio 2008).
68. Magaña-López, R. 2011. *Diseño y evaluación del funcionamiento de un filtro empacado con agregados minerales para la eliminación de huevos de helminto*. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, UNAM. 208 pp.
69. Magaña-López, R., Luna-Pabello, V.M., Barrera-Godínez, J.A., Orta de Velásquez, M.T., Fernández-Villagomez, G. 2016. Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs. *Ecol. Eng.*, 90, 125-134.

70. Maldonado, V. 2010. Multimedia en internet. Filtración. Biblioteca Virtual de Desarrollo Sostenible y Salud Ambiental [BVDSSA] Multimedia en internet. <http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manualI/tomoII/nueve.pdf>, (Consultado en septiembre del 2010).
71. Maya, C., Torner-Morales, F.J., Lucario, E.S., Hernández, E., Jiménez, B. 2012. Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. *Water. Res.* 46, 4770-4782
72. McCabe, W., Smith, J.C., Harriot, P. 1985. *Unit operations in chemical engineering*. 4ª. edición, McGraw Hill, 485 pp.
73. Melendez, B., Fuster, J. 2003. *Geología* 9ºed, Thompson Eds., Madrid, España. 911pp
74. Mengelle-López, J.J., Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., González-Partida, E., Camprubí, A. 2013. Secuencia vulcano-sedimentaria La Esperanza (Cretácico inferior) al norte de Guanajuato, México: Importancia en la exploración de sulfuros masivos vulcanogénicos. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 65, 511–525.
75. Metcalf, (1996) *Ingeniería de aguas residuales, tratamiento, vertido y reutilización*. Vol. 1 McGraw Hill. 234 - 250 pp.
76. Mintz, E., Bartram, J., Lochery, P., Wegelin. M, 2001. Not just a drop in the bucket: expanding access to point-of-use water treatment systems, *Am. J. Pub. Health.*, 91, 1565–1570.
77. Miranda-Ríos, M. 2005. *Estudio y evaluación del poder germicida de compuestos de plata en aguas residuales parcialmente tratada*. Tesis Maestría, UNAM, Facultad de Química. UNAM. 122 pp.
78. Miranda-Ríos, M., Luna-Pabello, V.M., Orta de Velásquez, M.T., Barrera-Godínez, J. A. 2011. Removal of *Escherichia coli* from biological effluents using natural and artificial mineral aggregates. *Water SA.* 37(2), 213 – 220.
79. Morales A. 2010. *Síntesis y evaluación de nano-fotocatalizadores soportados tipo fenton para remover parásitos (Ascaris summ) presentes en agua*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ingeniería, UNAM.
80. Moravec F. 1998. *Nematodes of vertebrates of the Neotropical Region*. Academia, Praha. 464 pp.
81. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yaca-man, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotech.*, 16, 2346–2353.
82. Mujeriego R. 1998. *Evolución y perspectivas de la reutilización de aguas en España*. En: jornadas Técnicas: La gestión del Agua Regenerada. 1-13 pp.

83. Neftafim. 2008. Multimedia en internet. Multimedia en internet. http://www.netafim.com.mx/Nuestros_Productos/Filtros/Filtros_de_Grava/, (Consultado en diciembre 2008).
84. Nelson, F.L., Cox, M.M. (2005). Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 4^{ta} ed. WH Freeman, New York, 954 pp.
85. Nestor, J., Pasamonte, L., Marinconz, R., De Marzi, M., Cajal, S., Malchiodi, E. 2000. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Medicina-Buenos Aires*, 60, 217-220.
86. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Norma Oficial Mexicana Protección ambiental. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Abril 23 de 2003, México, D. F.
87. Norma Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. DGN, México, D.F.
88. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. Norma Oficial Mexicana Protección ambiental. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. DGN, México, D. F.
89. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002. Norma Oficial Mexicana Protección ambiental. Lodos y biosólidos.-Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. DGN. México, D. F.
90. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. DGN. México, D. F.
91. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". DGN. México, D.F.
92. Northington, C.W., Chang, S.L., McCabe, L.J. 1970. *Health aspects of wastewater reuse* En: *Water quality improvement by physical and chemical processes III*. Washigton D.C. 56-98 pp
93. Organización para la cooperación y desarrollo Económico [OECD]. *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N° 208*. OECD. Publications Paris.

94. Oaks, J.A., Kayes, S.G. 1979. Artificial hatching and culture of *Toxocara canis* second stage larvae. *J. Parasitol.* 65, 969–970.
95. Ocampo, R., Salgado, R., Román, J. (1992). La omnipresencia de las helmintiasis. *Salud Pública de México*, 34, 357-360.
96. Organización mundial de la salud [WHO]. 2011. Agua saneamiento y salud. Multimedia en internet. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/es/. (Consultada en Diciembre de 2011).
97. Organización Mundial de la Salud [WHO]. 2009. Multimedia en internet. Filtros lentos. <http://www.col.ops-oms.org/saludambiente/guia-filtros.htm>, Multimedia en internet. (Consultado en septiembre del 2010).
98. Organización de las Naciones Unidas [ONU]. 2012. Ten years of international action for disposition of water source. Multimedia en Internet. <http://www.un.org/englishten/waterforlifedecade/quality.shtml> (Consultada en Enero de 2012).
99. Organización Panamericana para la Salud [FAO]. 2017. Capitulo 7 Desinfeccion <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo7.pdf> (Consultada en Enero de 2017).
100. Orta de Velásquez, M.T., Martínez, J.L., Monje-Ramírez, I., Rojas-Valencia, M.N. 2004. Destruction of helminth (*Ascaris suum*) eggs by Ozone. *Ozone Sci. Eng.*, 26, 359-366.
101. Orta, M.T., Yañez-Noguez, I., Jimenez-Cisneros, B., Luna-Pabello, V.M., 2008. Adding silver and copper to hydrogen peroxide and peracetic acid in the disinfection of an advanced primary treatment effluent, *Env Tech.*, 29, 1209-1217.
102. Programa Nacional del Instituto de Tecnologías Educativas [PNTLC]. 2012. Multimedia en Internet. En: <http://platea.pntic.mec.es/~cmarti3/CTMA/BIOSFERA/superviv.htm> (Consultada en Enero de 2012).
103. Panacek, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T.J., Zboril, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem.*, 110(33), 16248–16253.
104. Pancobro, J. Desinfección de agua mediante procedimientos electrofísicos cobre/plata. Multimedia en internet en: <http://dspace.universia.net/bitstream/2024/233/1/DESINFECCION+DEL+AGUA+ME+DIANTE+COBRE-PLATA.pdf> (Consultada en Enero de 2012).

105. Papale, J., García, M.N., Torres, M., 2008. Anemia, deficiencias de hierro y de vitamina A y helmintiasis en una población rural del estado Lara. *An. Venez. Nutr.* 21, 70–76.
106. Pham, A.L.T., Doyle, F.M., Sedlak, D.L. 2012. Kinetics and efficiency of H₂O₂ activation by iron-containing minerals and aquifer materials. *Water Research*, 46, 6454-6462.
107. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA]. 2011. Manual sobre Sistemas de Captación y Aprovechamiento del Agua de Lluvia para Uso Doméstico y Consumo Humano. Multimedia en internet. <http://www.pnuma.org/recnat/esp/documentos/cap1.pdf> (Consultada en Diciembre de 2011).
108. Quiroz, R.H. 1984. Parasitología y enfermedades de los animales domésticos. 1^o Edición. LIMUSA, México 234 pp.
109. Rodríguez, D.N. 2009. Efecto de agregados minerales sobre la viabilidad de huevos de helminto (*Toxocara canis*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Zaragoza, UNAM, 98 pp.
110. Reyna J., Limón, A.E., Nava, R. 2007. Invasión intestinal por *Toxocara canis* como diagnóstico diferencial de linfoma: informa de un caso, *Enfermedades infecciosas Residuales*, 27, 100-102.
111. Reynolds T.D., Richards P.A. 1996. *Unit Operations and Processes in Environmental Engineering*, 2da Edición, PWS Publishing Company 211-247 pp.
112. Rivera-Garza, M., Olguin, M.T., Garcia-Sosa, I., Alcantara, D., Rodríguez-Fuentes, G. 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material, *Microporous and Mewsporous Materials*, 39, 431-444.
113. Rojas-Valencia, M.N., Orta-De-Velásquez, M.T., Vaca-Mier, M., Franco, V., 2004. Ozonation by-products issued from the destruction of microorganisms present in wastewaters treated for reuse. *Water Sci. Technol.*, 50, 187–193.
114. Rojas M.N., Orta M.T., Franco, V. 2008. Comparación de mecanismos de acción de desinfectantes aplicados en aguas residuales, *Aquaforum.*, 12(49), 19-22.
115. Rojas, M.N., Orta M.T. 2009. Evaluación del efecto del ozono y de la radiación ultravioleta sobre la estructura y viabilidad de huevos de helmintos, 1-8, <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico11/ar-9.pdf> (Consultada en marzo de 2013)
116. Rojas-Valencia, M.N., 2011. *Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms*. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological*

- Advances, Microbiology Book Series-Number 3, vol. 1. FORMATEX, España,.263–271 pp.
117. Romero-Nuñez, F.M., Armienta, M.A., Gutierrez, M.E., Villa-Señor, G. 2007. Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 24, 43-54.
118. Ruparella, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.*, 4, 707–716.
119. Sánchez, J.M. 2002. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina En: Manejo sanitario y tratamiento de las enfermedades Del cerdo. Mundo ganadero. Multimedia en línea. <http://www.vet-uy.com/articulos/cerdos/050/0033/porc033.htm>. (consultado en Enero de 2012)
120. Silbergeld, E. 2012. Toxicología: Herramientas y enfoques. *Toxicologia*, 1-9.
121. Skoog, D.A. y Leary, J.J. 1994. Análisis instrumental. 4ª edición, Madrid, España, McGraw-Hill, Interamericana de España, 543 pp.
122. Sobsey, M.D. 2002. Managing water in the home: accelerated health gains from improved water supply. WHO, Geneva, Switzerland. Multimedia en internet. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/wsh0207/en/index.html (Consultado en julio de 2009)
123. Solís-López, M. 2014. Proceso de oxidación avanzada tipo fenton con escorias de cu para la desinfección de agua contaminada con huevos de parásitos (*ascaris suum*). Tesis de Doctorado en Ingeniería, Instituto de ingeniería, UNAM. 138
124. Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.*, 275, 177–182.
125. Sparks, T., Chase, G. 2012. *Filters and Filtration handbook*. BH, Scientific Collection. 6 ed. 458 pp.
126. Steel R.G.D., Torri J.H. 1981. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. Mc Graw- Hill. London 633 pp.
127. Tay, J. 1993. *Microbiología y Parasitología Médica*. Méndez editores, México D.F., 793 pp
128. Turbidex. 2010. Hyper-Filtration media. Multimedia en línea. <http://www.turbidex.com/master.pdf>. (consultado en enero de 2010)

129. Universidad de las Américas Puebla [UDLAP]. 2010. Multimedia en internet. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lic/ponce_o_e/capitulo5.pdf, (Consultado en abril 2009).
130. Universidad de Extremadura, Facultad de Ciencias, Área de Edafología y Química agrícola Multimedia en internet. [UEX]. 2009. Multimedia en internet. <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL5PFDensidad.htm>, (Consultado en abril de 2009).
131. Universidad de Málaga [UMA]. 2008. Multimedia en internet. <http://www.uma.es>, (Consultado en abril 2009).
132. Vásquez-Garibay, E.M., Romero-Velarde, E., Nápoles-Rodríguez, F., Nuño-Cosío, M.E., Trujillo-Contreras, F., Sánchez-Mercado, O. 2002. Prevalencia de deficiencia de Hierro y Yodo, y parasitosis en niños de Arandas, Jalisco, México. *Salud Pública de México*, 44, 195-200.
133. Wang, J., Huang, C.P., Pirestrani, D. 2003. Interactions of silver with wastewater constituents, *Water Research*, 37, 4444-4452.
134. Warren, K. 1990. An integrated system for the control of the major human helminth parasites. *Acta Leidensia*, 59, 433-442.
135. Wikiwater. S.A. de C.V. 2017. Multimedia en internet. Documento informativo: ¿Por qué usar desinfección? <http://www.wikiwater.fr/e18-el-tratamiento-del-agua-por.html>. (Consultado en enero de 2017).
136. Ximénez-García, R. 2010. Las parasitosis intestinales en México, 1ª ed., Cuadernos de la Fundación Mexicana para la Salud, Multimedia en internet. <http://www.funsalud.org.mx/quehacer/publicaciones/cuaderno36/cuaderno36.pdf> (Consultado en septiembre de 2010).

8 ANEXO I

Ciclos de vida

8.1 Ciclo de vida de *Toxocara canis*

El ciclo de *T. canis* es indirecto, ya que puede incluir la participación de hospederos intermediarios e inclusive de algunos que pueden funcionar como paraténicos, los cuales permiten el desarrollo parcial del helminto; siendo ésta una adaptación para garantizar la supervivencia y transmisión a sucesivas generaciones de sus hospederos intermediarios y eventualmente del definitivo.

La relación helminto-hospedero es estrecha inferida a través de la existencia de ciclos de vida acoplados, lo cual denota una alta adecuación etiológica del helminto con el hospedero. (Kennedy, 2005).

El ciclo de vida (Figura 7.1) se inicia cuando las hembras de *T. canis* depositan sus huevos en el intestino delgado del hospedero, los cuales se liberan con las heces (en forma de huevo) y que tienen una alta viabilidad, así como resistencia de inclusive años, ya sea en el ambiente o en un hospedero que le brinda condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxígeno. Así entonces se desarrollará al siguiente estadio conocido como la larva L-2 (aún dentro del huevo).

Los perros (hospedero definitivo) adquieren la toxocariasis de varias formas: por ingestión de huevos embrionados, infección intrauterina por el paso de L2 de la placenta al feto, ingestión de L2 viables en la leche materna así como de L3 contenidas en las heces de los cachorros, donde éstas últimas no requieren de la migración hepato-pulmonar para llegar a su madurez. En los cachorros menores de tres meses, las larvas pasan por vía linfática o sanguínea a los ganglios linfáticos o al hígado en donde continúan su migración al corazón y pulmones. En algunos casos las larvas pasan por los bronquios, tráquea y esófago, mientras que intestino delgado se realiza la siguiente muda dando lugar a la cuarta larva la cual crece y cópula. De cuatro a cinco semanas después se cierra el ciclo al liberar nuevamente los huevos a través de las heces (De la Fé *et al.*, 2007).

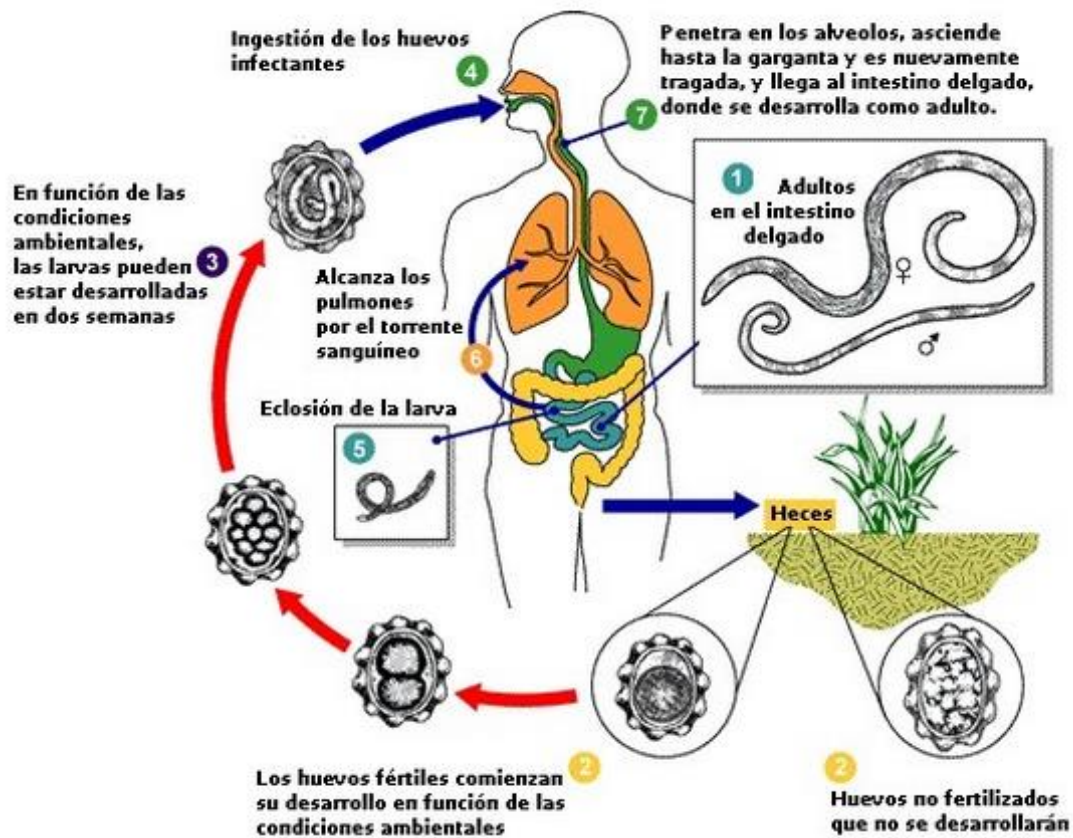
En caso de que los huevos de *T. canis* sean ingeridos por hospederos no cánidos, las larvas penetran al epitelio mucoso; pero tiempo después quedan en una fase de desarrollo



restringido en el tejido. No obstante que las larvas no muestran un desarrollo o diferenciación morfológica, son incapaces de completar su ciclo de vida y mantienen un metabolismo activo mostrando un comportamiento migratorio regularmente hacia el músculo y tejido nervioso. Sus recorridos por todo el cuerpo en esta fase y dan como resultado el estado clínico denominado “*larva migrans visceral*” o “*larva migrans ocular*”. Los gusanos adultos viven aproximadamente cuatro meses en la porción proximal del intestino delgado, donde las hembras adultas producen una cantidad de huevos por día (hasta 1.5 millones) de huevos no son embrionados los cuales no se encuentran en fase infectiva (en desarrollo). En condiciones favorables los huevos depositados en el suelo lo hacen en un período de dos a seis semanas, los cuales constituyen la forma infectiva para el perro y otros hospedadores, incluido al hombre que también la puede adquirir, donde es común encontrarlos en agua residual, alimentos mal lavados y callejeros y en parques públicos. (Reyna et al., 2007; Quiroz, 1984).

Existe otra vía, la cual es de tipo perinatal, donde los huevos ya con el embrión pasan al duodeno, eclosionan y liberan larvas de segundo estadio (L2) que atraviesan la pared duodenal y alcanzan el hígado, a través del sistema porta llegan al corazón y de ahí a los pulmones, posteriormente ascienden por el tracto respiratorio ya convertidas en larvas de tercer estadio (L3), estas son deglutidas y pasan nuevamente al intestino delgado donde sufren la cuarta y última muda que constituye el paso a la fase adulta. El macho y la hembra copulan, esta última pone huevos que salen con las heces. En los adultos este ciclo se cierra en muy pocos casos debido a que las L2 se quedan en los tejidos. (De la Fé *et al.*, 2007). Lo anterior, se ejemplifica en la Figura 8-1.

aproximadamente dos meses después del elemento infectante los huevos son expulsados con la materia fecal, donde condiciones como una adecuada presencia de oxígeno, humedad, sombra y suelos arcillosos promueven su larvado. A pesar de ello el organismo es resistente a bajas temperaturas, desecación, ácidos fuertes, formol; de hecho, en suelos sembrados se ha registrado su persistencia de hasta 12 años. La desecación del sustrato en combinación con las corrientes de viento suele fomentar su dispersión, lo cual se observa en el ciclo de vida (Figura 8-2).



Tomado de CDC, (2012)

Figura 8-2. Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*.

9 ANEXO II

Técnicas de caracterización física y fisicoquímica de los materiales empleados

Los procedimientos se efectuaron de acuerdo a las metodologías empleadas en Bazán *et al.* (2000), Buitrago *et al.* (2004) y UEX (2009).

9.1 Caracterización física

Densidad real

Se designa con este término a la relación masa/volumen existente en la fase sólida de un compuesto (UEX. 2009).

Para su cálculo se empleó la siguiente técnica:

- 1.-Se pesa un matraz aforado de 100 ml vacío.
- 2.-Se adicionan 10 g de muestra.
- 3.-Se llena hasta tener la mitad del recipiente agua destilada.
- 4.- Se agita suavemente en forma de ocho o circularmente (de manera horizontal) durante dos minutos con el objetivo de sacar todo el aire contenido en el material y el ocasionado por el mezclado.
- 5.- Dejar reposar por un tiempo aproximado de tres a cinco minutos.
- 6.- llenar el matraz hasta el aforo.
- 7.- Pesar el matraz con la muestra y el agua por separado se pesa el matraz solamente con agua.

Se calculó a partir de la ecuación siguiente:

$$\text{Densidad real} = \frac{S}{S + A - (s + a)}$$

Dónde:

S = masa de la muestra sola (g)

A = masa del agua sola (g)

s + a = masa de la muestra y agua (g)



Densidad aparente

Refleja la masa de una unidad de volumen de material seco y no perturbado que incluye tanto a la fase sólida como a la gaseosa englobada en ella (Universidad de Extremadura [UEX]. 2009). El valor obtenido es muy variable, ya que depende del volumen de los poros según sea el material. Si el material es compacto la densidad sube. Su valor nos permite establecer equivalencias entre las relaciones masa/masa y masa/superficie (UEX, 2009)

El procedimiento es el siguiente:

- 1.-Se pesa una probeta vacía del volumen requerido de acuerdo a la cantidad de material empleada.
- 2.-Agregar material al cual se le determinará la densidad hasta el límite señalado de la probeta.
- 3.- Se elimina el espacio existente entre el material por la técnica de “golpeado”, o también conocida como la 10-10; la cual consiste en golpearlo ligeramente 10 veces sobre la mesa a una distancia de 10 cm.
- 4.-Agregar lo que falte para completar los 10 o 100 ml de la muestra.
- 5.- Pesar la probeta con la muestra y proceder a calcular como sigue:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{A - B}{V}$$

Dónde:

A= masa de la probeta más el agregado (g)

B= masa de la probeta vacía (g)

V= volumen (mL)

Porcentaje de porosidad

Se utiliza su valor para dar una idea de la estructura general del medio, ya que refleja el dominio natural de las fases líquida y gaseosa del suelo, donde la primera limita el espacio ocupado por la segunda. Depende de la textura, estructura y a lo largo del tiempo se verá modificada de la actividad biológica que pueda desarrollarse en ella. Se encuentra dada por el porcentaje de huecos existentes en el mismo frente al volumen total (UEX, 2009).

Con los resultados obtenidos de la densidad aparente y la densidad real, se calcula el porcentaje de espacio poroso existente en la muestra, calculándose como sigue:

$$\% \text{ de Porosidad} = 100 \left[1 - \frac{\text{Densidad aparente}}{\text{Densidad real}} \right]$$

Permeabilidad

Para su determinación se llevó a cabo el ensayo de Lefranc modificado, el cual se emplea para medios permeables o semipermeables de tipo granular. El valor obtenido refleja la capacidad de un material para captar una cantidad de líquido, ya sea con carga constante o variable partiendo de un material seco a través de su nivel de admisión (permeabilidad máxima) de acuerdo a tiempos y caudales expuestos. El aire expulsado se regula en el medio de soporte, estabilizándose a lo largo del tiempo (nivel y velocidad de descenso), lo cual indica que ya se ha logrado un régimen permanente (permeabilidad promedio). (UEX, 2009). A continuación se menciona el procedimiento seguido:

- 1.- Se pesa una cantidad de material 10 g y de manera paralela se vacía 50 mL a una probeta.
- 2.- Se pesan ambos por separado peso seco.
- 3.- Se pone en contacto al material con el agua (hasta que quedé cubierto completamente) y registrar la cantidad de agua.
- 4.- Se deja por un periodo de 30 segundos y se extrae todo el líquido con una pipeta de punta fina.
- 5.- Se pesa la muestra. Por diferencia de pesos se obtiene la permeabilidad del material.
- 6.- La primera obtenida será la permeabilidad máxima.
- 7.- Debido a que cada material es diferente se debe llevar a cabo las repeticiones correspondientes hasta observar una estabilización.
- 8.- El promedio existente entre las mediciones corresponde a la permeabilidad promedio (+desviación estándar).
- 9.- Se el valor final con respecto al tiempo corresponde al porcentaje de permeabilidad. Calculándose como sigue:

$$\text{Permeabilidad Máxima} = \frac{\text{Peso seco} \times 100}{\text{Peso húmedo}_{(\text{máximo})}}$$

$$\text{Permeabilidad Promedio} = \frac{\text{Peso seco} \times 100}{\text{Peso húmedo}_{(\text{promedio})}}$$

Dónde:

Peso seco = (g)

Peso húmedo = (g)

Permeabilidad promedio = %

Retención

Con los resultados obtenidos de la de la permeabilidad, se calcula el porcentaje de de retención existente en la muestra como se señala en el inciso anterior. Dicho fenómeno se puede analizar con carga constante como el caudal que se necesita para mantener constante el nivel o medir la velocidad y el tiempo de descenso del nivel de agua. Dicha propiedad se fundamente en la capacidad de un material para retener un líquido con respecto al tiempo (UEX, 2009) y se calculó como sigue:

$$\text{Retención} = \frac{(P_{\text{prom}} \times 100)}{P_{(\text{max})}} - 100$$

Dónde:

P_{prom} = Permeabilidad promedio en %

P_{max} = Permeabilidad máxima en %

Conductividad hidráulica

Consiste en la velocidad en que el agua que fluye en un medio poroso, la cual es directamente proporcional al gradiente hidráulico causado por el flujo (ley de Darcy) (Quezada, 2010). Se evaluó como:

$$Q = K \times A \times h L^{-1}$$

Dónde:

Q = caudal ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$)

K = conductividad hidráulica (m d^{-1})

A = área (m^2)

h = altura de agua (m)

L = largo de la muestra de suelo (m)

El procedimiento se señala a continuación:

- 1.- Se coloca un volumen de material en el permeámetro de carga constante
- 2.- Se adiciona un gasto (Q) constante a la entrada
- 3.- Se coloca una probeta de 1 L y se mide el Q a la entrada del sistema, en el desvío y a la salida (balance de masa).
- 4.- Se registran los tiempos requeridos en llenar el volumen de la probeta.

9.2 Caracterización fisicoquímica

Difracción de rayos X

Es un método analítico empleado para la identificación cualitativa de compuestos cristalinos presentes en un sólido, (Universidad de Málaga [UMA], 2008; Skoog y Leary, 1994)

El equipo empleado fue un Siemens D5000 con tubo de Cu, radiación $\text{Cu } \alpha \lambda=1.5046$ y filtro de Ni, en el intervalo angular de $0-90^\circ$ en condiciones de operación de 35 KV y 30 mA

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Emplea electrones en lugar de luz para formar una imagen y permite la visualización y análisis morfológico de muestras biológicas y minerales con volumen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. Es una técnica llevada a cabo al vacío, por lo cual no es posible introducir el agregado metálico en polvo, se compactará (formado de pastillas), con un aglutinante y un recubrimiento de una película de carbono. (Skoog y Leary, 1994).

Análisis multielemental

A partir de los análisis llevados a cabo con ayuda de la MEB con difracción de Rayos X se integró una tabla con el contenido cuantitativo (%) de los elementos químicos que componen al AM.

Flotación por aireación

La flotación se emplea para separar partículas de una fase líquida. El proceso consiste en la introducción de aire en el medio líquido. Las burbujas se adhieren a los sólidos, y la fuerza ascensión que experimentan en conjunto la partícula y burbuja de aire hace que migren a la superficie. La formación de una capa espumosa permite retirar el sólido por medio de un rascado superficial.

El procedimiento se señala a continuación:

- 1.- El material fue triturado y molido para recuperar los diámetros de malla correspondiente a -200 mallas +450 mallas

- 2.- A partir de una muestra de 2000 g y 1976.5 g provenientes de los AM (1 y 2), respectivamente.
- 3.- El material fue introducido en un equipo de flotación marca Denver con celda de 7 L de capacidad y operada en condiciones de agitación de 2000 rpm.
- 4.- Las muestras se suspendieron para completar un volumen de pulpa (sólidos + agua del grifo) de 6 L.
- 5.- Las muestras se acondicionaron con xantato amílico de potasio a 1 mg kg^{-1} de sólido por un periodo de 5 minutos en ausencia de burbujeo de aire.
- 6.- Se adicionó espumante a base de aceite de pino a razón de 1500 g m^{-3} de pulpa.
- 7.- Se burbujeó aire a razón de 10 L min^{-1} , con formación de burbujas de aproximadamente 2 mm de diámetro durante un periodo de 10 min, hasta no recuperar partículas en la espuma.

10 ANEXO III

10.1 Técnicas helmintológicas empleadas

Aclaramiento

Se efectuó el procedimiento señalado en Caspeta (2005), consistente en la exposición a soluciones graduales de glicerina con agua, la cual se señala a continuación: Se colocó y extendió al helminto en un portaobjetos, con una pipeta Pasteur se introdujo la mezcla de glicerina 1:20 y se depositó nuevamente sobre una plancha caliente hasta evaporar la mezcla, en seguida se llevó a cabo la introducción de la mezcla con la misma relación hasta la evaporación. Posteriormente se introdujo por las orillas del cubreobjetos la solución 1:15, hasta la evaporación y con su respectiva repetición. Se continúa así las siguientes concentraciones 1:10, 1:5, 1:2 y 1:1; todas ellas con dos cambios de glicerina por paso, o en su defecto se realiza el paso una sola vez de acuerdo al grado de aclaramiento.

Ésta técnica fue utilizada con el objeto de poder apreciar con claridad algunas estructuras importantes para la identificación taxonómica precisa, por ejemplo: estructuras en los huevos, filamentos o las estructuras de la boca del organismo. En la Figura 10-1 se observa al ejemplar adulto empleado para la identificación taxonómica.

El estudio taxonómico de los helmintos, se realizó con base en las claves taxonómicas y literatura especializada; Moravec (1998) y Caspeta (2005) respectivamente.

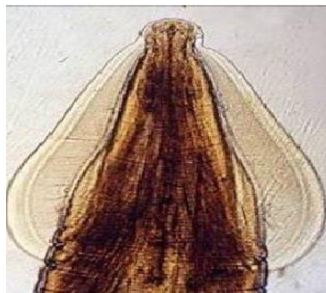


Figura 10-1. Parte dorso-ventral-anterior de hembra adulta de *T. canis* (aclaramiento) visto al Microscopio estereoscópico (3x)

11 ANEXO IV

Caracterización de los AM

11.1 Caracterización fisicoquímica de los AM

Tabla 11-1. Prueba de disolución de los AM 1 y 2 a tres horas (ICP-Ms)

Elemento (ppm)	AM ₁ N		AM ₁ A		AM ₁ B		AM ₂ N		AM ₂ A		Am ₂ B	
	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
Al	ND	-	5397.77	526.56	370.72	486.42	ND	-	2748.87	1234.3	160.60	23.70
Si	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
V	2.07	0.13	181.55	42.14	20.96	17.02	0.60	0.60	ND	-	46.20	0.32
Ti	2.33	0.06	32.23	6.25	17.88	8.09	0.75	0.75	0.97	0.79	13.16	2.59
Mn	61.33	16.84	11984.55	3112.32	897.43	1542.85	18.48	18.48	18221.93	5456.57	7.50	6.00
Cr	2.55	0.07	27.03	4.09	4.36	2.31	0.00	-	9.24	7.76	3.05	0.14
Co	0.92	0.21	76.74	16.76	14.96	24.27	ND	-	40.36	13.10	0.47	0.15
Pb	ND	-	16844.66	1301.57	249.80	425.27	17.04	17.04	10471.60	12638.42	54.57	10.83
Ag	0.06	0.06	104.05	25.79	0.86	1.50	ND	-	28.90	15.15	4.97	1.03
As	16.03	8.64	242.55	21.79	65.44	10.03	7.63	7.63	54.87	22.50	31.78	27.55
Zn	31.65	0.48	47256.18	3051.38	8387.77	14472.15	38.91	38.91	13856.88	3334.26	43.39	4.04
Cu	11.89	3.22	1334.02	181.55	433.12	704.50	1.48	1.48	714.00	803.39	36.01	7.91
Ni	4.37	1.60	307.57	86.73	37.57	63.23	5.61	5.61	152.58	54.34	1.84	0.76
Au	ND	-	0.58	0.91	0.68	0.48	ND	-	0.53	0.92	0.64	0.45
Y	47.16	12.88	41.55	31.44	30.86	19.84	43.48	43.48	72.35	9.77	190.03	83.62
Zr	ND	0.00	1.23	0.18	1.19	0.04	0.89	0.89	0.84	0.73	1.49	0.03
Hg	0.46	0.62	1.56	1.41	9.88	6.09	ND	-	0.42	0.72	3.06	2.55
Nd	0.00	-	13658.33	2621.54	1143.22	1941.25	18.18	18.18	16971.02	719.45	185.19	95.46

AMN= Agregado mineral en solución neutra; AMA = Agregado mineral en solución ácida; AMB = Agregado mineral en solución básica

Tabla de elaboración propia

Continúa Tabla 11-1. Prueba de disolución de los AM 1 y 2 a tres horas (ICP-Ms)

Na	23.69	8.55	18.80	6.72	235.65	33.32	22.30	7.96	27.25	10.83	70.21	55.13
Mg	10.44	2.46	333.44	64.81	10.36	2.82	23.82	19.52	468.05	35.31	9.85	2.49
K	8.95	3.97	12.43	2.76	5.54	1.51	15.18	2.66	22.62	8.93	2.84	0.86
Ca	14.77	2.94	1259.86	137.78	11.56	0.91	32.90	24.09	978.23	113.79	14.11	12.23
Sr	ND	-	0.20	0.17	ND	-	ND	-	1.06	0.43	ND	-
Ba	0.21	0.04	0.84	0.12	0.23	0.04	0.20	0.01	0.76	0.21	0.46	0.20

AMN= Agregado mineral en solución neutra; AMA = Agregado mineral en solución ácida; AMB = Agregado mineral en solución básica

Tabla de elaboración propia

Tabla 11-2. Prueba de disolución de los AM 1 y 2 a tres meses (ICP-Ms)

Elementos	AM1N		AM1A		AM1B		AM2N		AM2A		AM2B	
Al	1.78	0.87	14314.41	17697.19	115.11	63.34	5.05	8.75	6.3	2.76	120.1	44.93
Si	29.14	50.47	224.87	206.17	340.47	117.42	ND	-	0	0	251.49	420.73
V	4.37	2.23	227.76	382.13	36.14	21.4	2.62	2.93	18.99	11.85	40.66	31.39
Ti	29.23	8.39	62.83	47.4	76.8	37.23	9.82	5.02	13.33	14.39	40.95	59.07
Mn	21.87	19.76	14052.95	5757.4	112.92	115.46	15044.85	25863.16	22603.37	3324.34	6.73	1.48
Cr	1.84	0.15	243.97	206.97	6.26	2.61	1.82	0.42	7.08	1.09	4.01	1.92
Co	0.99	0.56	194.26	73.45	1.05	0.64	50.46	83.73	110.65	18.4	0.09	0.16
Pb	0	0	47074.83	49836.12	100.47	27.41	213.01	296.77	547.65	796.15	143.97	52.85
Ag	1.48	0.89	86.08	56.45	81.58	37.31	1.66	1.89	16.73	9.24	84.63	63.49
As	12.48	10.32	49.11	33.36	349.21	72.56	6.12	8.44	22.07	30.58	154.88	185.1
Zn	136.78	130.49	47005.08	29264.79	97.92	37.57	8713.48	15076.06	2529.06	2796.67	48.48	33.28
Cu	8.06	5.4	1490.68	2556.92	54.69	7.57	4.13	4.05	16.57	1.08	115.11	111.68
Ni	44.87	52.52	851.96	55.46	0.87	0.39	187.99	268.8	906.33	67.78	5.08	3.53
Au	33.33	11.55	40	26.46	60	84.85	23.33	20.82	53.33	75.72	100	88.88
Y	23.41	34.63	304.36	130.43	45.14	19.72	108.16	31.92	136.24	98.73	73.41	13.23
Zr	0.28	0.49	ND	-	0	0	33.33	5.77	3.34	5.77	26.69	43.74
Hg	0	0	ND	-	0	0	0	0	1.94	3.36	17.57	8.25
Nd	36.13	62.24	313.43	264.03	5.23	3.91	12.06	19.34	19.75	29.35	40.96	36.79
Na	ND	-	344.65	112.4	304.29	7.83	ND	-	20.97	4.88	181.64	24.48
Mg	ND	-	6.39	0.12	11.87	10.36	ND	-	565.69	73.19	4.48	2.26
K	ND	-	5.28	0.6	9.28	0.5	ND	-	17.52	5.08	5.7	4.74
Ca	ND	-	20.22	1.89	14.02	3.83	ND	-	1240.19	195.64	6.14	3.4
Sr	ND	-	0	ND	0	0	ND	-	1.5	0.87	0	0
Ba	ND	-	0.18	0.06	0.19	0.02	ND	-	0.67	0.08	0.13	0.22

AMN= Agregado mineral en solución neutra; AMA = Agregado mineral en solución ácida; AMB = Agregado mineral en solución básica

Tabla de elaboración propia

Tabla 11-3 Normatividad mexicana aplicable al AM (ensayos en medio ácido a tres horas)

	NOM-001-SEMARNAT-1996						NOM-002-SEMARNAT-1997		NOM-003-SEMARNAT-1997		NOM-127-SSA1-1994		NOM-052-SEMARNAT-1993		AM1	AM2	Conclusión
	Ríos		Embalses naturales y artificiales				Alcantarillado		Embalses naturales y artificiales								
	Uso en riego Agrícola	Uso público urbano	Protección vida acuática		Uso en riego Agrícola	Uso público urbano	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.					
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.					
Ag	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5	104.05	28.9	Restringido	
Al	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.20	NE	5397.77	2748.87	Restringido	
As	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.5	0.75	0.4	0.05	5	242.55	58.47	Si supera	
Au	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.58	0.53	No Especificado	
Ca	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1259.86	978.23	No Especificado	
Co	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	76.74	70.36	No Especificado	
Cr	1	1.5	0.5	1	0.5	1	1.5	0.5	0.5	0.75	1.5	0.05	NE	27.03	9.24	Si supera	
Cu	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	10	15	0.4	2	NE	1334.02	714	Restringido	
Hg	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.015	NE	NE	0.46	1.56	0.42	No Especificado	
K	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	12.43	22.62	No Especificado	
Mg	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	333.44	468.05	No Especificado	
Mn	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.30	NE	11984.55	18221.93	Restringido	
Nd	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	13658.33	16971.02	No Especificado	
Na	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	200	NE	18.8	27.25	No Especificado	
Ni	2	4	2	4	2	4	2	4	4	6	2	NE	NE	307.57	152.58	Si supera	
Pb	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	1	1.5	0.5	0.025	5	16844.66	10471.6	Si supera	
Sr	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.2	1.06	No Especificado	
Ti	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	32.23	0.97	No Especificado	

Continúa.- Tabla 11-3 Normatividad mexicana aplicable al AM (ensayos en medio ácido a tres horas)

Y	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	41.55	72.35	No Especificado
Zn	10	20	10	20	10	20	10	20	6	9	10	5	NE	47256.18	13856.88	Si supera	
Zr	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.23	0.84	No Especificado	

En todos los casos concentración expresada en (mg/L⁻¹) y las cifras significativas contenidas en norma; NE= No especificada; ND=No determinada; PM=Promedio mensual;
 Tabla de elaboración propia

Tabla 11-4 Normatividad mexicana AM en medio básico a tres horas

	NOM-001-SEMARNAT-1996								NOM-002-SEMARNAT-1997		NOM-003-SEMARNAT-1997		NOM-127-SSA1-1994	NOM-052-SEMARNAT-1993	AM1	AM2	Conclusión
	Ríos				Embalses naturales y artificiales				Alcantarillado		Embalses naturales y artificiales						
	Uso en riego Agrícola		Uso público urbano		Protección vida acuática		Uso en riego Agrícola		Uso público urbano								
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.							
Ag	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5	0.86	4.97	No Especificado
Al	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.20	NE	370.72	160.6	No Especificado
As	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.5	0.75	0.4	0.05	5	65.44	31.78	Si supera	
Au	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.68	0.64	No Especificado	
Ba	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE			No Especificado	
Co	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	14.96	0.47	No Especificado	
Cr	1	1.5	0.5	1	0.5	1	1.5	0.5	0.5	0.75	1.5	0.05	NE	4.36	3.05	Si supera	
Cu	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	10	15	0.4	2	NE	433.12	36.01	Restringido	
Hg	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.015	NE	NE	0.46	9.88	3.06	No Especificado	
K	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5.54	2.84	No Especificado	
Mg	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	10.36	9.85	No Especificado	
Mn	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.30	NE	897.43	7.5	No Especificado	
Nd	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1143.22	165.35	No Especificado	
Na	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	200	NE	235.65	70.21	No Especificado	
Ni	2	4	2	4	2	4	2	4	4	6	2	NE	NE	37.57	1.84	Restringido	
Pb	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	1	1.5	0.5	0.025	5	249.9	54.57	Restringido	
Ti	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	17.89	13.6	No Especificado	

Tabla de elaboración propia

Continúa Tabla 11-4 Normatividad mexicana AM en medio básico a tres horas

V	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	20.96	46.2	No Especificado
Y	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	30.86	190.03	No Señalado
Zn	10	20	10	20	10	20	10	20	6	9	10	5	NE	8387.77	43.39	Si supera	
Zr	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.19	1.49	No Señalado	

En todos los casos concentración expresada en (mg L⁻¹) y las cifras significativas contenidas en norma; NE= No especificada; ND=No determinada; PM=Promedio mensual

Tabla de elaboración propia

Tabla 11-5. Memoria del ICP-MS

Elementos	Referencia (NaOH)	σ	Referencia (H ₂ SO ₄)	σ	Sol neutra	σ
Al	271.26	7.12	71.90	66.90	2.2	1.3
Au	286.66	5.77	105	57.66	40	0.02
Y	97.10	2.58	21.04	26.59	63.19	14.56
Ti	21.23	0.85	8.99	4.49	12.8	0.15
Cu	4.20	1.89	16.32	3.27	9.31	2.65
As	3.49	0.28	2181.82	2176.97	10.64	2.15
Mn	3.15	2.73	6.11	8.90	19.46	4.81
V	1.95	1.31	7.43	11.40	2.86	0.6
Cr	1.75	1.25	9.56	2.08	1.97	1
Nd	1.18	1.02	2.27	2.27	1.08	0.09
Ag	0.66	0.07	8.48	4.67	1.34	0.12
Ni	0.023	0.04	0.01	0.02	19.4	9.56
Co	0	0	0.15	0.27	1.62	1.45
Hg	0	0	0	0	0	0
Pb	0	0	61.82	80.04	0	0
Si	0	0	0	0	0	0
Zn	0	0	47.35	20.95	39.79	8.47
Zr	0	0	0	0	0	0

Tabla de elaboración propia

12 ANEXO V

12.1 Memoria fotográfica de *Toxocara canis*


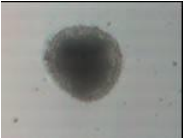
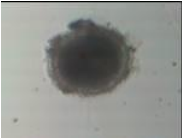

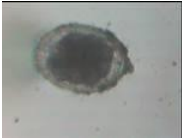
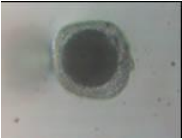
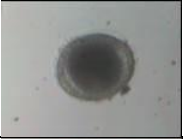








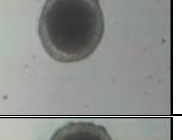



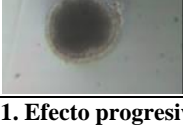




g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30						
60						
90						
120						

Figura 12-1. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Ag⁰ (MO) 40X y 10X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.10	0.50	1.00	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-2. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con AgNO₃ (MO) 40X y 10X

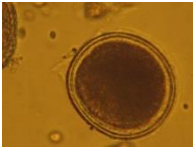
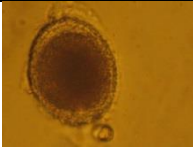
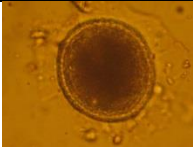
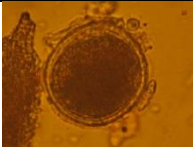
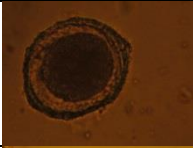
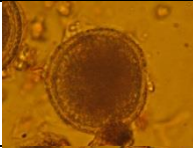
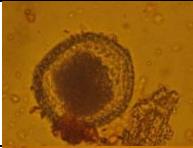
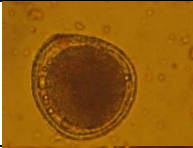
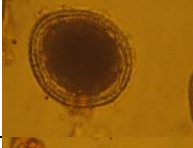
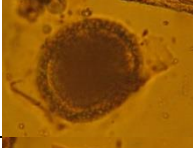
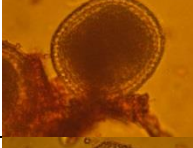
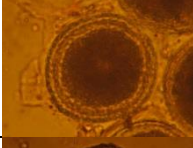
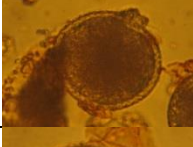
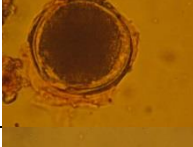
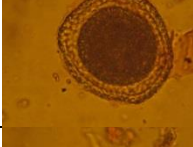
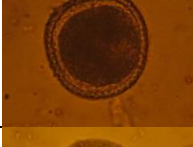
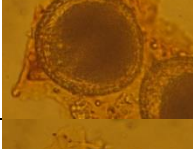
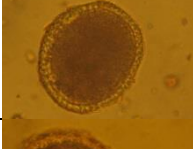
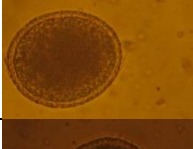
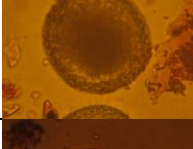
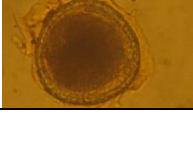

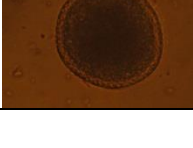
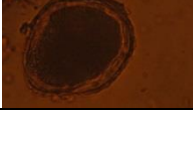
g mL ⁻¹	3 gotas L ⁻¹	7 gotas L ⁻¹	20 gotas L ⁻¹	Inmersión en la solución de plata coloidal
30 min				
60 min				
90 min				
120 min				
150 min				
180 min				

Figura 12-3. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con plata coloidal Ag¹⁺ y Ag⁰ (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-4. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con plata coloidal Ag₂O (MO) 40X y 10X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-5. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Cu (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-6. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con CuSO₄ (MO) 40X y 10X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-7. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con CuO (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-8. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Cu₂O (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-9. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Fe (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-10. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con Fe₂O₃ (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-11. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con FeSO₄ (MO) 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-12. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *T. canis* con FeS₂ (MO) 40X y 10X

12.2 Memoria fotográfica de *Ascaris lumbricoides*

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-13. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Ag por Microscopía Óptica 40X y 10X

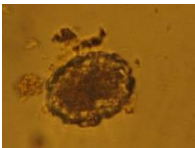
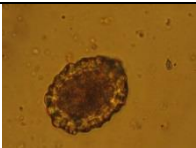
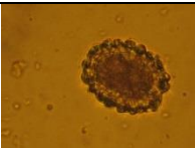
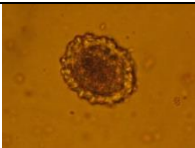
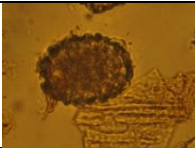
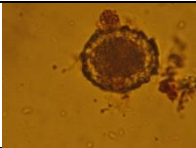
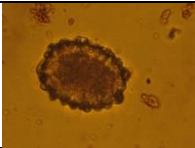
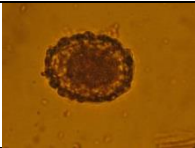
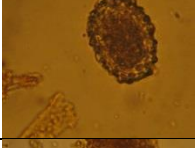
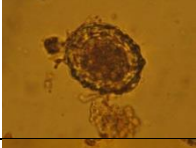
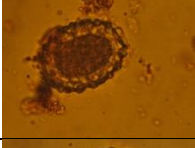
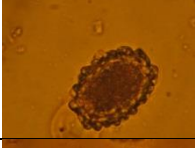
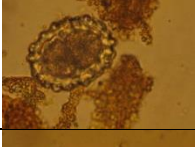

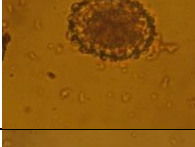
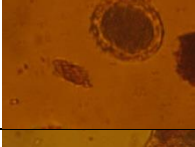
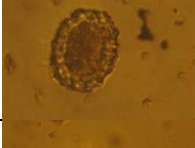
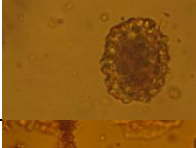
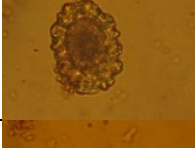
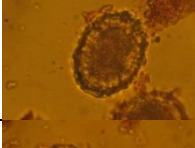
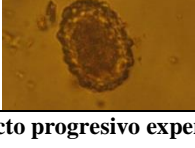

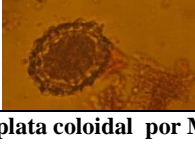
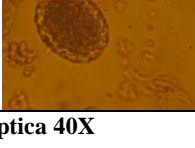
g mL ⁻¹	3 gotas L ⁻¹	7 gotas L ⁻¹	20 gotas L ⁻¹	Inmersión en la solución de plata coloidal
30 min				
60 min				
90 min				
120 min				
150 min				
180 min				

Figura 12-14. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con plata coloidal por Microscopía Óptica 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-15. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Ag₂O por Microscopía Óptica 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.10	0.50	1.00	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-16. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con AgNO₃ por Microscopía Óptica. 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-17. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Cu por Microscopía Óptica 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-18. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con CuSO₄ por Microscopía Óptica. 40X

g/L	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120 min						
150 min						
180 min						

Figura 12-19. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Cu_2O por MO 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30 min						
60 min						
90 min						
120						
150						
180						

Figura 12-20. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con CuO por MO 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30						
60						
90						
120						
150						
180						

Figura 12-21. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Fe por Microscopía Óptica 40X

g mL ⁻¹	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
30						
60						
90						
120						
150						
180						

Figura 12-22. Efecto progresivo experimentado en los huevos de *A. lumbricoides* con Fe₂O₃ por Microscopía Óptica 40X

	AM ₁ -HAL-SA	AM ₁ -HAL-CA	AM ₂ -HAL-SA	AM ₂ -HAL-CA	SiO ₂ -HAL-SA	SiO ₂ -HAL-CA
30						
60						
90						
120						
150						
180						

HAL=Huevo de *Ascaris lumbricoides*; HTC=Huevo de *Toxocara canis*; SA= Sin Agitación; CA= Con Agitación;

Figura 12-23 Ensayos de medios pétreos en condiciones SA y CA para HAL

	AM ₁ -HTC-SA	AM ₁ -HTC-CA	AM ₂ -HTC-SA	AM ₂ -HTC-CA	SiO ₂ -HTC-SA	SiO ₂ -HTC-CA
30						
60						
90						
120						
150						
180						

HAL=Huevo de *Ascaris lumbricoides*; HTC=Huevo de *Toxocara canis*; SA= Sin Agitación; CA= Con Agitación;

Figura 12-24 Ensayos de medios pétreos en condiciones SA y CA para HTC

13 ANEXO VI

Caracterización cualitativa y cuantitativa de los AM

13.1 Determinaciones cualitativas y cuantitativas del AM

Difractometría de Rayos X (DFRX)

A continuación se muestran los difractogramas obtenidos para los dos AM examinados que contribuyeron a determinar la composición mineralógica cualitativa de los agregados empleados en el presente trabajo. El equipo empleado fue un Equipo Siemens D5000 con tubo de Cu, radiación $\text{Cu } \alpha \lambda = 1.5046$ y filtro de Ni, en el intervalo angular de $0-90^\circ$ en condiciones de operación de 35 KV y 30 mA.

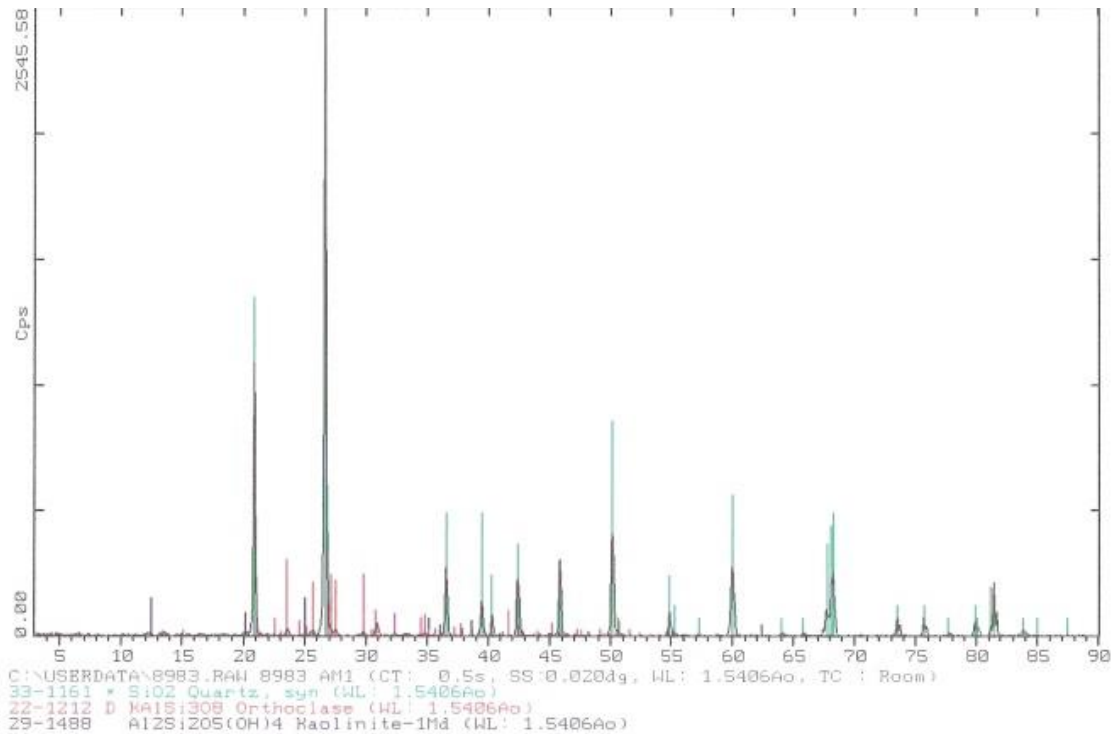


Figura 13-1. Difractograma del AM₁ (de $1-90^\circ$)

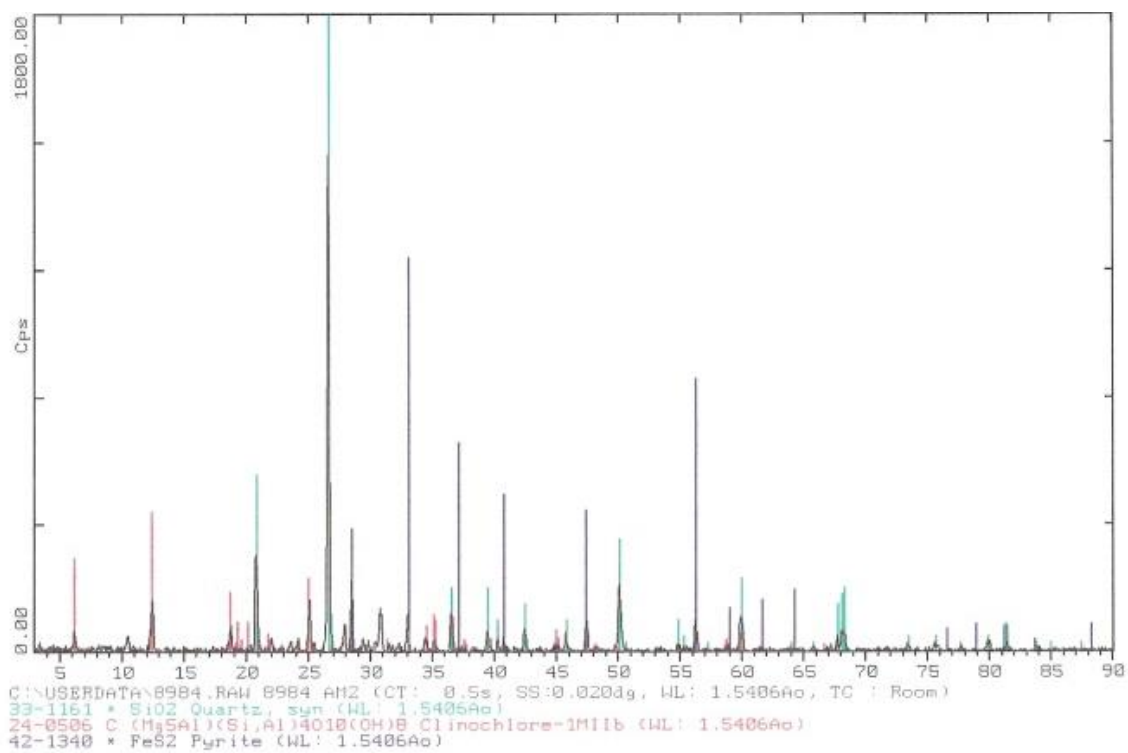


Figura 13-2. Difactograma perteneciente al AM₂ (de 1-90°)



FACULTAD DE QUÍMICA - UNAM
UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN
LAB. DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X



U.S.A.I.

Resultados de Análisis por Fluorescencia de Rayos X:

Responsable: Dr. Víctor Manuel Luna
 No. de muestras analizadas: 2
 Solicitudes: 9283, 9284
 Fecha de análisis: 28 de junio de 2011
 Equipo: Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X SRS3000
 Método de preparación de la muestra: Perla preparada con una mezcla 67:33 de Tetraborato de litio/Metaborato de litio al 50%
 Tipo de análisis desarrollado: Cuantitativo
 Programa analítico: USAIM07

Muestra	%SiO ₂	%TiO ₂	%Al ₂ O ₃	%Fe ₂ O ₃	%MnO	%MgO	%CaO	%Na ₂ O	%K ₂ O	%P ₂ O ₅	Suma	PXC
AM1	91.694	0.142	3.027	2.491	0.049	0.695	0.961	-0.238	1.126	0.018	99.96	1.29%
AM2	63.412	0.548	9.186	12.957	0.186	5.938	5.190	1.294	1.185	0.074	99.97	6.75%

Nota: La muestra se llevó a base calcinada como tratamiento previo a la preparación de la perla. En la tabla se reportan anexos los datos de cada muestra correspondiente a la pérdida por calcinación (PXC).

Realizó: Víctor Hugo Lemus Neri / M. en C. Nayeli López Balbaur

Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Circuito Escolar, Facultad de Química Edif. "B"
 Tel.: Lab. 56.23.25.23, Ofna. 56.23.25.21 y Fax 56.23.25.22

Figura 13-3 Caracterización del AM1 por medio de AFRX



FACULTAD DE QUÍMICA - UNAM
UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN
LAB. DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X



U.S.A.I.

Resultados de Análisis por Fluorescencia de Rayos X:

Responsable: Dr. Víctor Manuel Luna
 No. de muestras analizadas: 2
 Solicitudes: 9283, 9284
 Fecha de análisis: 27 de junio de 2011
 Equipo: Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X SRS3000
 Método de preparación de la muestra: Tableta prensada con 10% de Cera
 Tipo de Análisis desarrollado: Cuantitativo
 Programa analítico: Traza04

Muestra	Rb	Sr	Ba	Y	Zr	Nb	V	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Th	Pb
AM1	41	12	237	4	18	-1	56	-716	11	25	123	1438	-141	562
AM2	32	106	151	8	139	0	153	-2142	30	64	320	9078	-156	850

Nota 1: Los resultados se muestran en ppm. Nota 2: Las muestras fueron llevadas a base seca como tratamiento previo a la lectura de las muestras.

Realizó: QFB. Víctor Hugo Lemus Neri / M. en C. Nayeli López Balbiana

Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Circuito Escolar, Facultad de Química Edif. "B"
 Tel.: Lab. 56.23.25.23, Ofna. 56.23.25.21 y Fax 56.23.25.22

Figura 13-4 Caracterización del AM2 por medio de AFRX

14 ANEXO VII

14.1 Ensayos de larvado de HTC y HAL para agentes metálicos

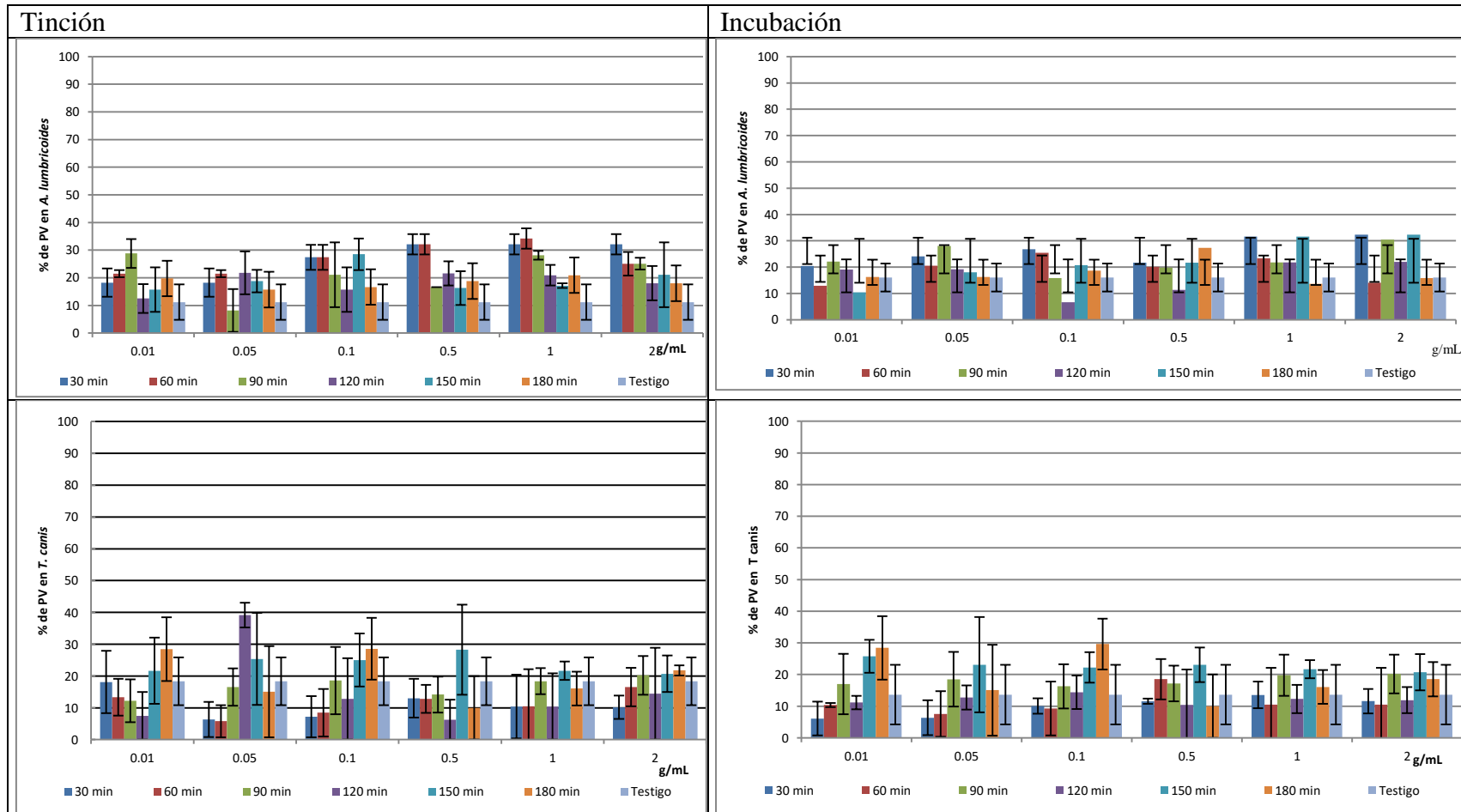


Figura 14-1 Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a plata coloidal.

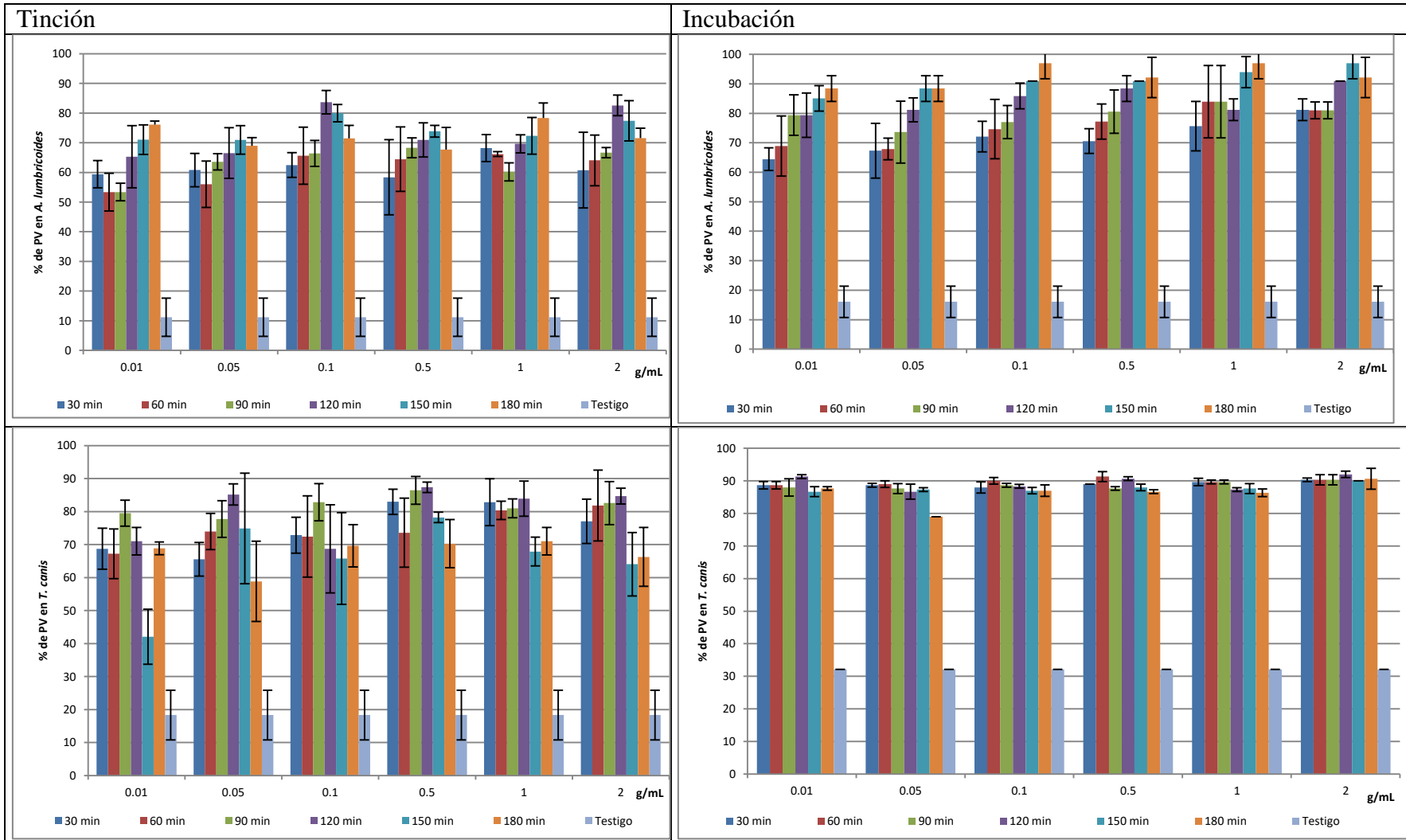


Figura 14-2. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Ag₂O

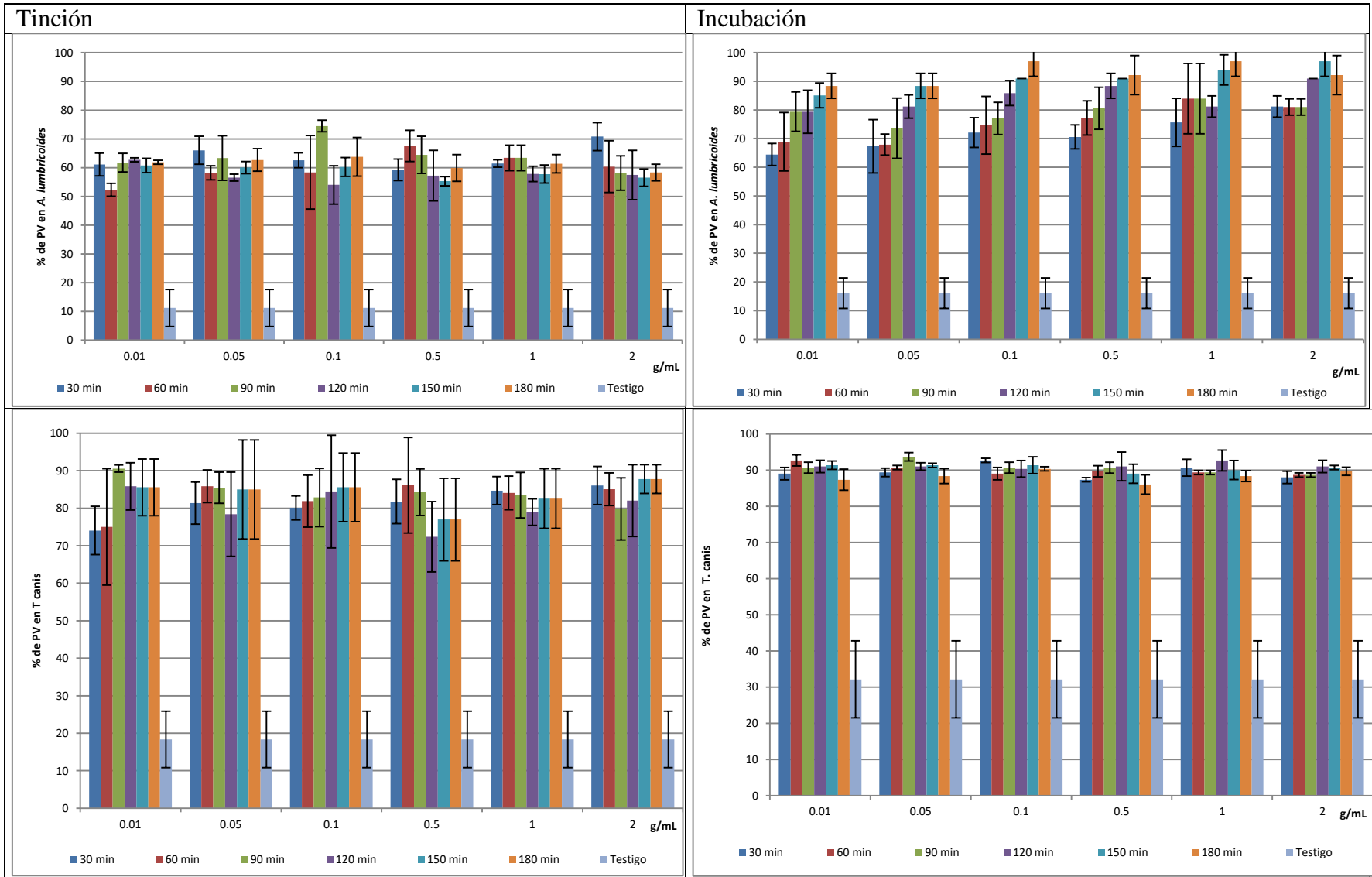


Figura 14-3. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a $AgNO_3$

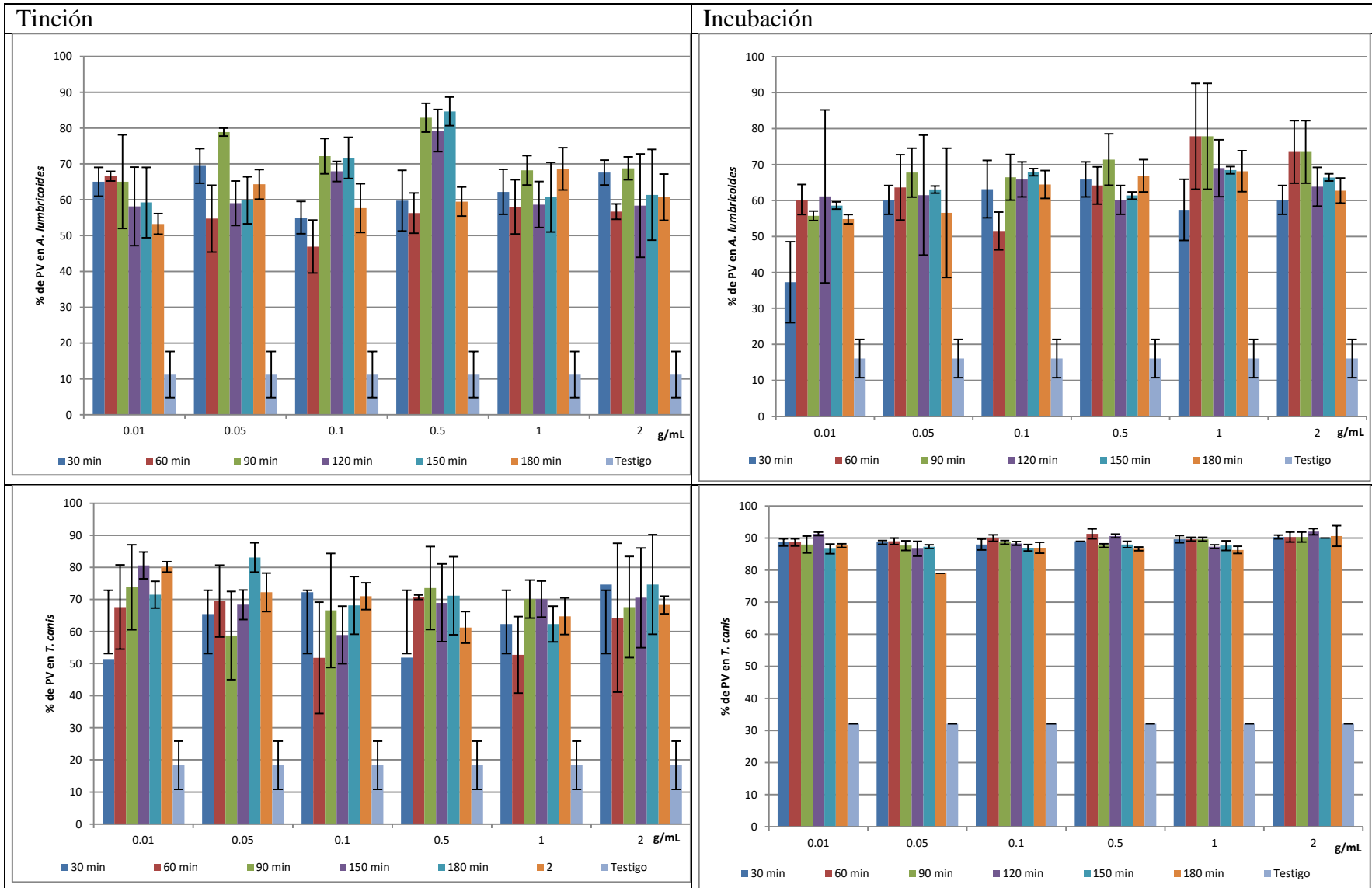


Figura 14-4. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe

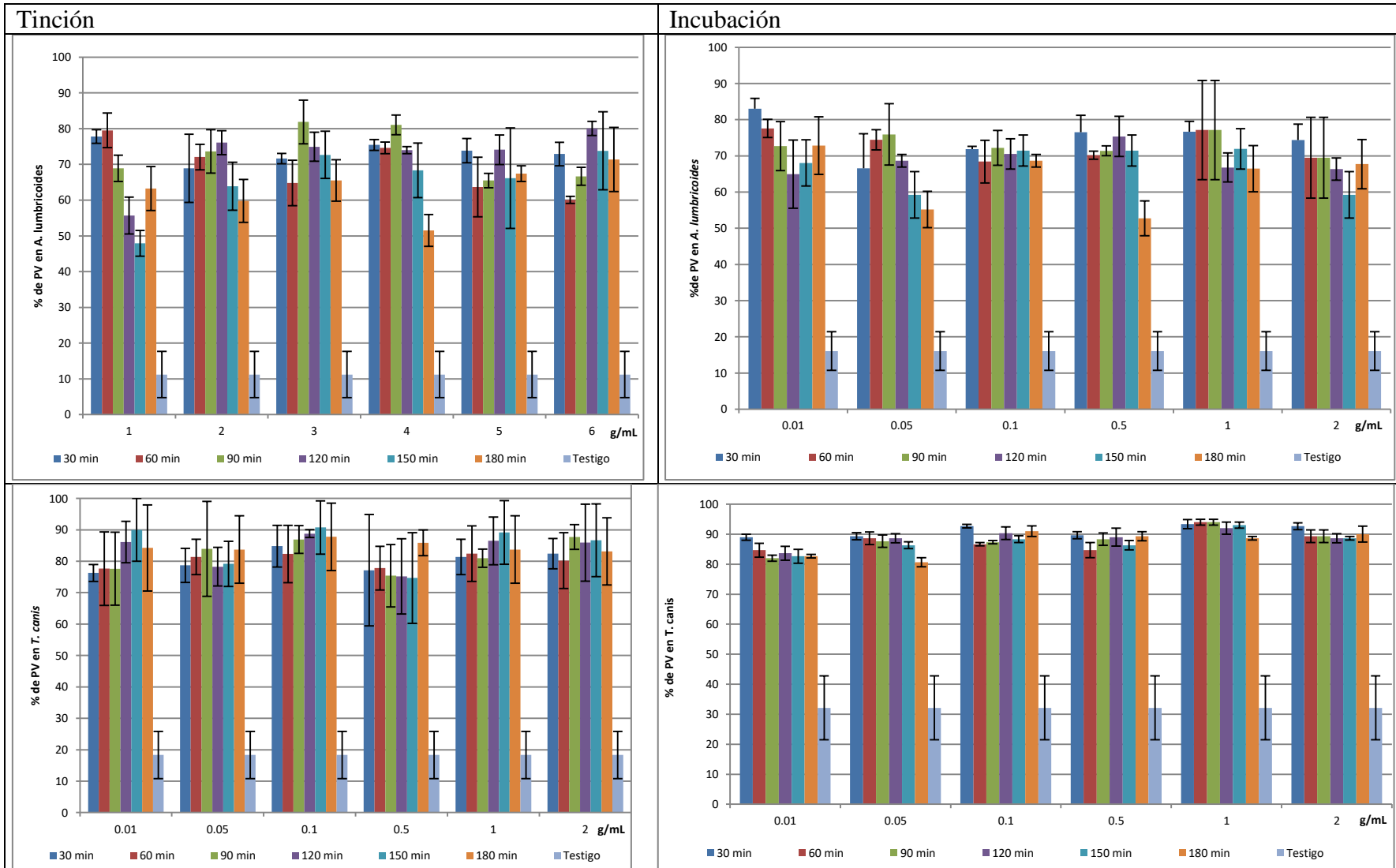


Figura 14-5. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe₂S₃

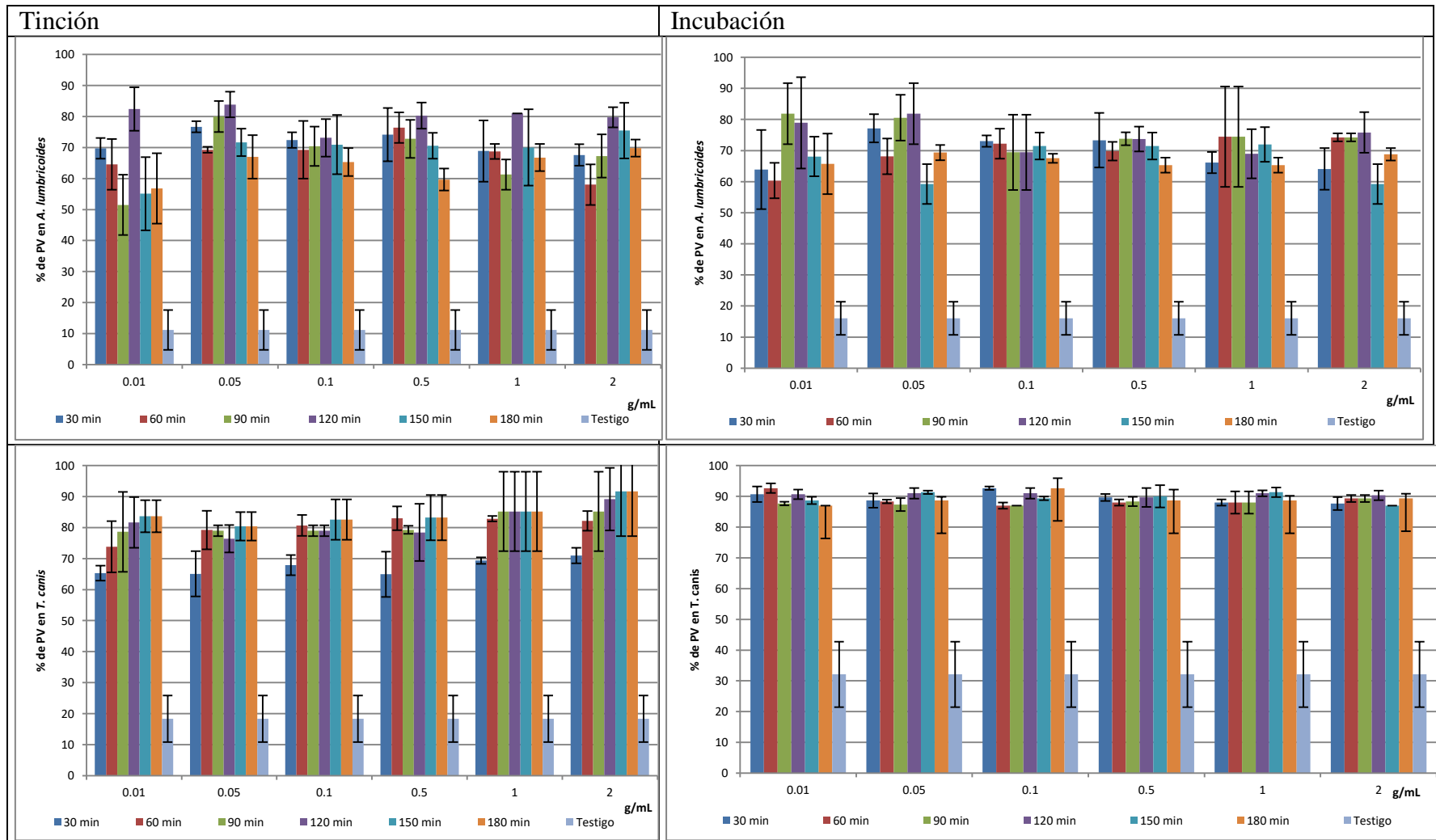


Figura 14-6. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe_2O_3

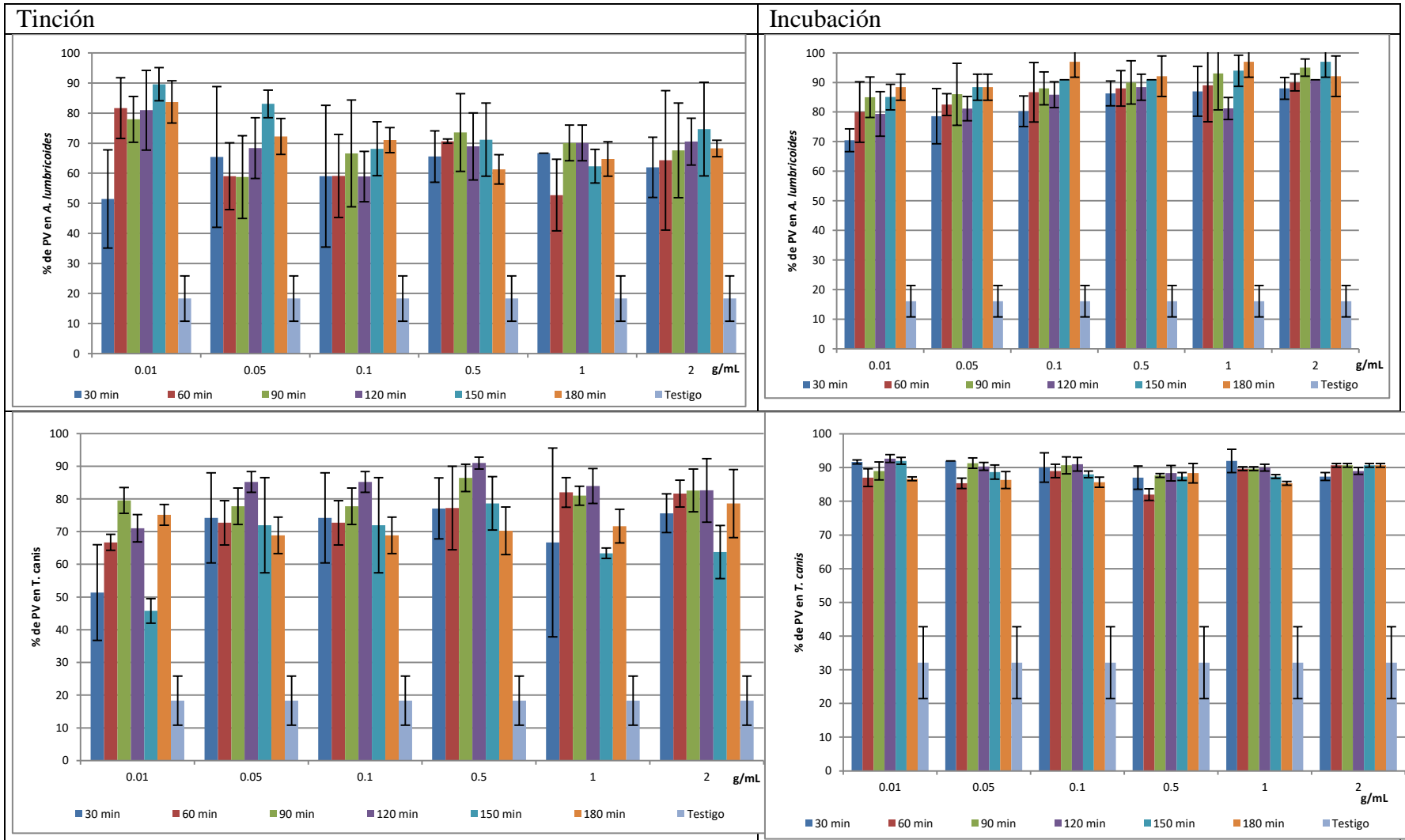


Figura 14-7. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Fe_2SO_4

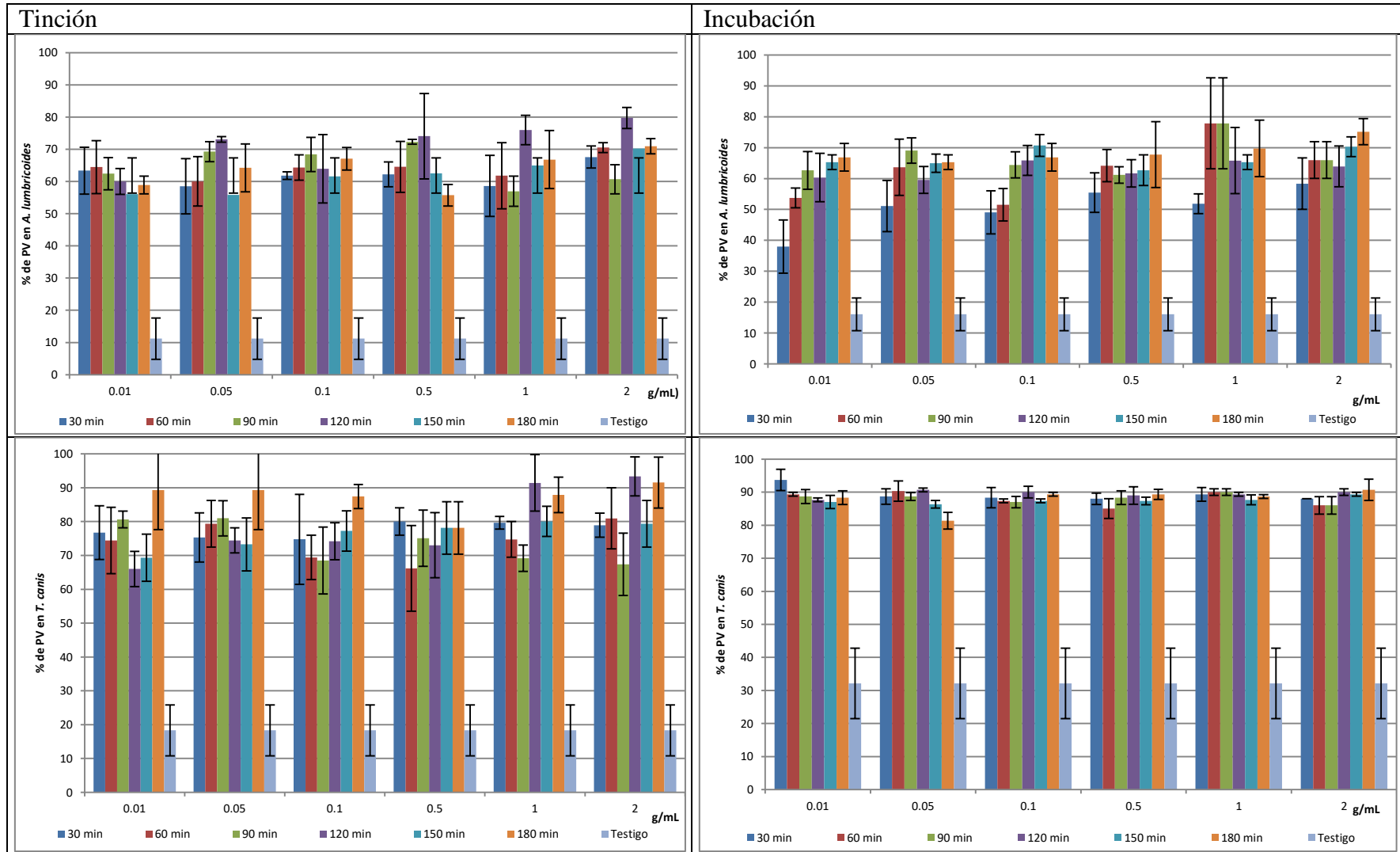


Figura 14-8. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu

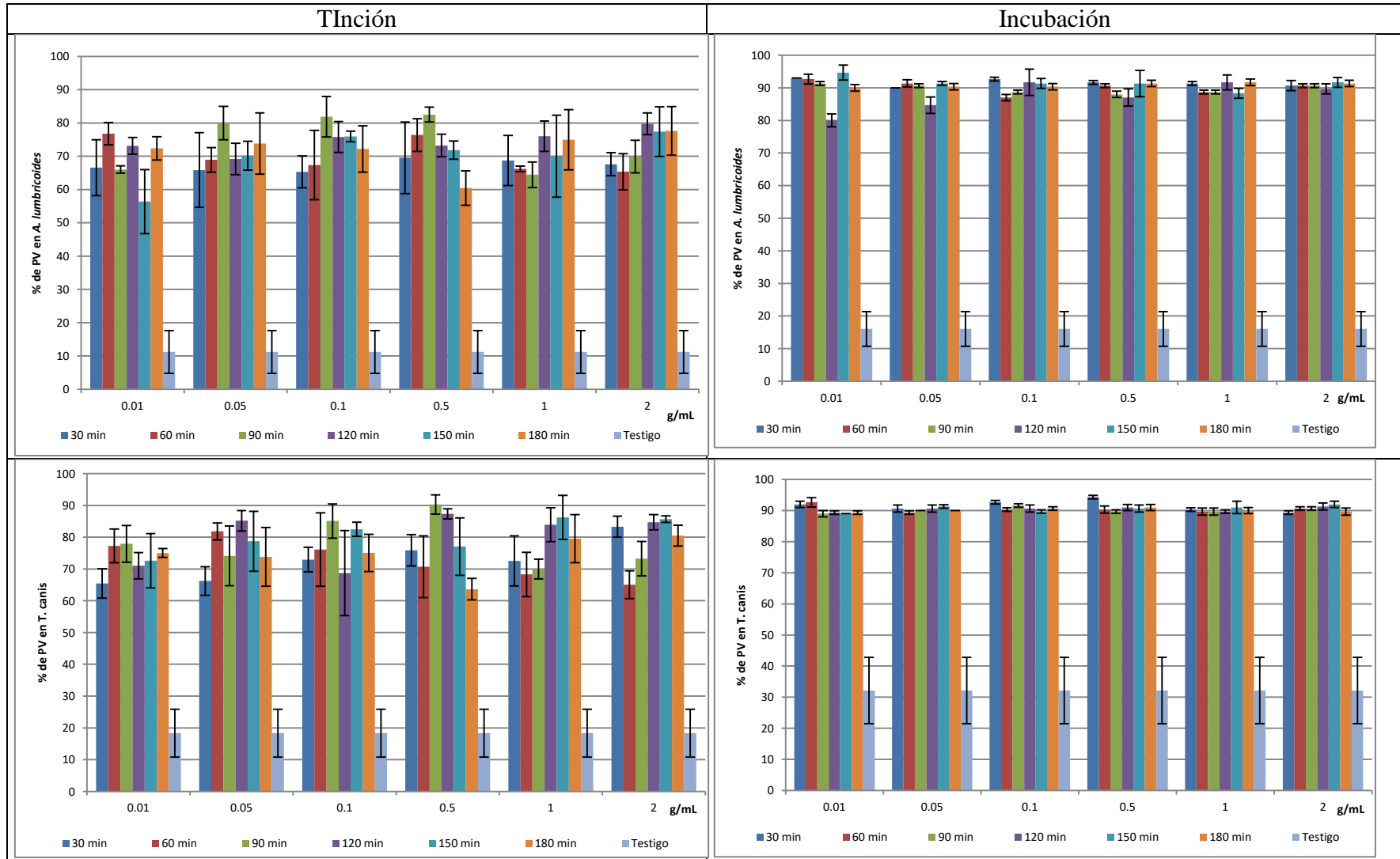


Figura 14-9. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu_2O

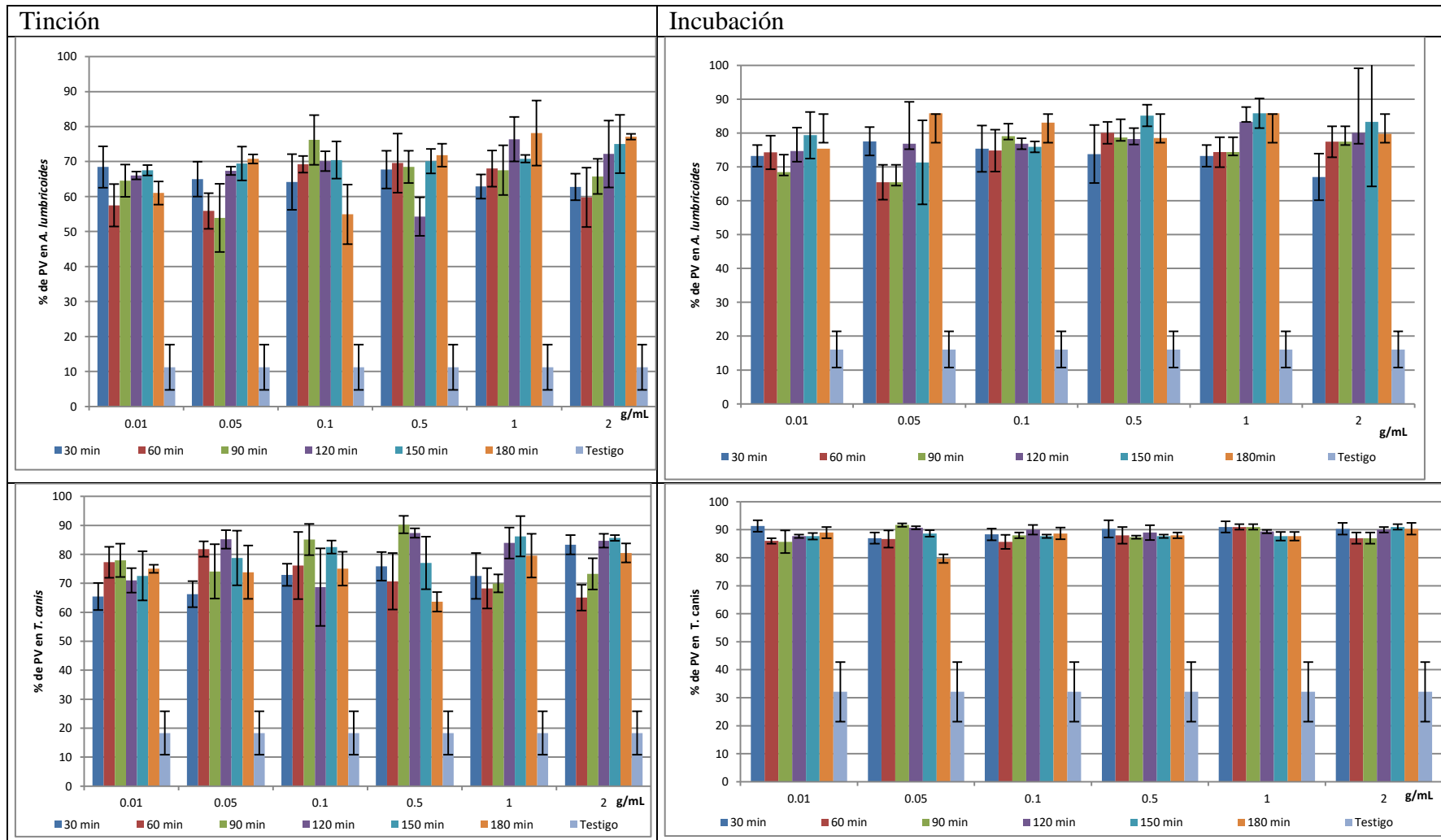


Figura 14-10. Inactivación de HTC y HAL ante la exposición a Cu_2SO_4

15 ANEXO VIII

15.1 Memoria de cálculo del filtro

PROPIEDADES DEL AM1

$$\rho_{ap} [kg/m^3] = 1120$$

$$\rho_{real} [kg/m^3] = 1670$$

$$Porosidad (\%) = 32.86$$

$$Permeabilidad promedio (\%) = 13.85$$

$$Factor\ de\ esfericidad = 0.83$$

$$Conductividad\ hidráulica\ k \left[\frac{m^3 m^2}{d} \right] = 15.4$$

El diseño corresponde a lo puntualizado en 5.5.1, donde se busca de acuerdo a lo señalado en 5.5.1 un tiempo de residencia de 120 minutos y que a su vez no supere los 2 m de altura.

Cálculo Teórico del filtro 2 m (d = 2.00 mm)

$$D = 1/2 \text{ in}$$

$$r = 0.635 \text{ cm}$$

Volúmen disponible en la tubería libre

$$Vol.\ disponible = \pi * r^2 * L$$

$$[m^3] = [] * [m] * [m] * [m]$$

$$[m^3] = \pi * (0.00635 \text{ m})(0.00635 \text{ m}) * 2 \text{ m}$$

$$Vol.\ disponible = 0.0002533 \text{ m}^3$$

$$Vol.\ disponible = 253 \text{ cm}^3$$

$$Vol.\ disponible = 2.53 * \times 10^{-4} \text{ m}^3$$

Masa de AM contenida en el filtro

$$masa\ obtenida\ en\ el\ filtro = (\rho_{real})(vol\ disponible\ sin\ material)$$

$$[kg] = \left[\frac{kg}{m^3} \right] * [m^3]$$

$$[kg] = \left(1670 \frac{kg}{m^3} \right) * (2.533 * \times 10^{-4} \text{ m}^3)$$

$$masa\ contenida\ en\ el\ filtro = 0.4230 \text{ kg}$$

Capacidad de contención de agua para el filtro (experimental en saturación)

$$Vol.\ libre\ para\ el\ agua = 83.23 \text{ mL}$$

Volúmen libre para el agua

Vol. libre para el agua = 83.23 mL

Gasto sugerido (Q)

Q = volumen disponible para rellenar el filtro / tiempo de residencia necesario
"90 min"

$$[mL/seg] = [mL]/[seg]$$

$$[mL/seg] = (83.234 \text{ mL}) / (5400 \text{ seg})$$

$$\therefore Q \text{ sugerida} = 1.54 \times 10^{-2} \text{ mL/seg}$$

Tiempo de residencia hidráulico θ

Tiempo de residencia hidráulico = Tiempo de residencia del agua/60

$$[seg] = [seg]/[min/seg]$$

$$[seg] = [5400 \text{ seg}] / [60 \text{ min/seg}]$$

Tiempo de residencia hidráulico = 90 min

Características finales del filtro y operación

Tipo de flujo = continuo

$$Q = 1.54 \times 10^{-2} \text{ mL/seg}$$

Diámetro = 1.27 cm

Longitud = 200 cm

Capacidad de tratamiento por condiciones de operación

Capacidad de tratamiento de operación =

$$1.54 \times 10^{-2} \text{ mL/seg} * \text{factor de conversión}$$

$$[mL/seg] = [seg/min] * [min/h] * [h/d] * [L/mL]$$

Capacidad de tratamiento de operación =

$$1.54 \times 10^{-2} \text{ mL/seg} * \text{factor de conversión} * (60 \text{ seg/1 min}) * (60 \text{ min/1 h}) * (24 \text{ h/d}) * (1 \text{ L/1000 mL})$$

$$\text{Capacidad de tratamiento de operación} = 1.33 \text{ L/d}$$

Materia retenida

Materia retenida = peso de HH ss / d

$$[kg/m^3] = \frac{g}{L} * \frac{L}{d}$$

$$\text{Materia retenida} = 8.1 \times 10^{-6} \text{ g} * 19.97 \frac{h}{d}$$

$$\text{Materia retenida} = 1.6 \times 10^{-4} \text{ g/d}$$

Cinética de degradación esperada

$$\text{Cinética de de degradación} = K_{20^\circ}(1.06)(T_{\text{exp prom}} - 20)$$

$$K_{20^\circ} = 1.104/d \quad (\text{Obtenido de tablas})$$

$$\text{Cinética de degradación} = (1.104)(1.6 \times 10^{-4} \text{ mg})(30 - 20)$$

$$\text{Cinética de degradación} = 0.001806 \text{ mg/d}$$

$$\text{Cinética de degradación} = 1.8 \times 10^{-3} \text{ mg/d}$$

Tiempo mínimo de saturación con sol experimental hh

$$\text{Tiempo de visa por saturación} = \text{volúmen libre disponible} / \text{masa total}$$

$$\text{degradación supuesta} = 0\%$$

$$\text{Tiempo de saturación} = [83.23 \text{ g} * 1000] / [1.20 \times 10^{-4} \frac{\text{mg}}{\text{d}}]$$

$$\text{Tiempo de saturación} = 514429.81 \text{ d}$$

$$\begin{aligned} \text{Tiempo de saturación del sistema experimental (hh + agua destilada)} \\ = 139.46 \text{ años} \end{aligned}$$

Nota: El diseño del filtro solo consideró la interacción de agua destilada con los huevos de helminto. No obstante, los resultados obtenidos en la memoria de cálculo pueden modificarse en función de las condiciones físicas, químicas y biológicas del influente.

Sólidos totales retenidos hh hasta saturación teórica del medio

$$\text{Sólidos totales retenidos} = (\text{Masa en tiempo de saturación}) * (\text{t de saturación})$$

$$\text{Sólidos totales retenidos} = \frac{\text{mg}}{\text{d}} \left(\frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ mg}} \right) * 50903.18 \text{ g/d}$$

$$\text{Sólidos totales retenidos} = 83276.02 \text{ g de hh}$$

hh retenidos hasta saturación teórica del medio

$$\begin{aligned} \text{hh retenidos hasta saturación} &= 1.16 \times 10^{-3} \text{ g de hh} \\ &= (\text{hh por día}) * (\text{t de saturación}) \end{aligned}$$

$$\text{hh retenidos hasta saturación} = 19.97 \text{ hh} * 50903.18 \text{ d}$$



$$hh \text{ retenidos hasta saturación} = 10162394$$

Capacidad de tratamiento (litros) calidad experimental

$$\text{Capacidad de tratamiento} = \frac{HH \text{ retenidos hasta saturación}}{HH \text{ contenidos en un litro}}$$

$$\text{Capacidad de tratamiento} = 1016239497 \text{ hh}/15\text{h/L}$$

$$\text{apacidad de tratamiento} = 677492 \text{ L}$$

Tiempo de agotamiento del filtro en función de la plata

Concentración total de plata contenida en el filtro (2 m)

$$\begin{aligned} \text{Concentración total de plata contenida en el filtro} \\ = \text{Peso del filtro} * \text{concentración de plata} \end{aligned}$$

$$\text{Concentración total de plata contenida en el filtro} = 0.423 \text{ kg} * \frac{123\text{mg}}{\text{kg}}$$

$$\text{Concentración total de plata contenida en el filtro} = 60.76 \text{ mg de Ag}$$

Tiempo de agotamiento del filtro en función de la plata

$$\text{Ecuación obtenida } Y = 0.0007 x + 26.642$$

$$M = R^2 \frac{b}{m}$$

$$M = 0.9988 \frac{26.642}{-0.0007}$$

$$M = 0.9988 * (26.642 / -0.0007)$$

$$M = -38012.90$$

K = constante de langmuir

$$\frac{1}{M} = -2.63 \times 10^{-5}$$

$$k = \frac{1}{(1/M) + M}$$

$$k = \frac{1}{-2.63 \times 10^{-5} + (-38014.32)}$$

$$k = -2.63 \times 10^{-5} / d$$

$$\text{masa} = 0.423 \text{ g}$$

$$C_0 = 26.67 \text{ mg de Ag/kg}$$

$$X = ((0.1 \text{ L}) \left(\frac{26.67 \text{ mg}}{\text{kg}} - \frac{26.61 \text{ mg}}{\text{kg}} \right)) / (0.423 \text{ kg} * 1000 * 1000)$$

$$X = 1.418 \times 10^{-5}$$

$$\text{Tiempo de agotamiento} = TA$$

$$TA = 1585 \text{ d}$$

$$TA = 4.34 \text{ años}$$

Operación Máxima (Capacidad máxima de tratamiento por diseño)

Se evaluó con la apertura completa de las válvulas reguladoras (flujo máximo).

Gasto máximo de tratamiento por diseño

$$Q \text{ medido (máximo)} = 1960 \text{ ml}/38.011 \text{ min}$$

$$Q \text{ medido (máximo)} = 51.3 \frac{\text{ml}}{\text{min}} * \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ seg}}$$

$$Q \text{ medido (máximo)} = 0.855 \text{ mL/seg}$$

Capacidad máxima de tratamiento por diseño

$$= \left(0.855 \frac{\text{mL}}{\text{seg}} \right) * \frac{\text{seg} * \text{min} * \text{hora} * L}{\text{min} * \text{hora} * d * \text{mL}}$$

$$\text{Capacidad máxima de tratamiento por diseño} = 73.872 \text{ L/d}$$

Masa esperada teórica (sin degradación)

$$\rho \text{ (hh)} = \frac{1.07 \text{ mg}}{\text{L}}$$

$$\text{Masa de hh} = \rho \text{ (hh)} * \text{Vol}$$

$$\text{Masa esperada} = 1.07 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 73.872 \text{ L/d}$$

$$\text{Masa esperada} = \frac{\text{mg}}{\text{L}} * L / d$$

$$\text{Masa esperada} = 79.04 \text{ mg/d}$$

Tiempo de saturación a capacidad máxima de operación teórica (sin degradación)

$$\text{Espacio disponible} = 2.53 \times 10^{-4} \text{ m}^3$$

$$\text{Tiempo de saturación} = (mg)/(79.04 \frac{mg}{d})$$

$$\text{Tiempo de saturación} = 2301.5 d$$

$$\text{Tiempo de saturación} = 6.30 \text{ años}$$

Cinética de de degradación esperada

$$\text{Cinética de de degradación} = K20^{\circ}(1.06)(T_{exp \text{ prom}} - 20)$$

$$K20^{\circ} = 1.104/\text{día} \quad (\text{obtenido de tablas})$$

$$\text{Cinética de degradación} = (1.104)(284.259mg)(30 - 20)$$

$$\text{Cinética de degradación} = 3138.22 \text{ mg/d}$$

Tiempo de agotamiento a capacidad máxima de operación

$$C_o = 0.123 \text{ mg de Ag/kg}$$

$$\text{masa} = 0.494 \text{ g}$$

$$C_o = 0.0016 \text{ mg de Ag/kg}$$

$$X = ((40.608 L) \left(\frac{0.123mg}{kg} - \frac{0.0016mg}{kg} \right)) / (0.494g * 1000)$$

$$X = 0.009979$$

$$\text{Tiempo de agotamiento} = TA$$

$$TA = ((0.009979)(15.3977)) / ((0.4363 * \left(0.06 \frac{mg}{L} - \frac{0.0016 mg}{2 L} \right)))$$

$$TA = (1110.04)(365 d)$$

$$\text{Tiempo de agotamiento} = 3.04 \text{ años}$$

Costo de construcción filtro

El material por sí solo no tiene un costo, ni tampoco ningún uso posterior, por ello dentro de la mina es retirado, acumulado, apilado y abandonado. Todo ello, debido a que el contenido metálico solo contiene trazas de plata y el costo de explotación es mayor a la cantidad de plata contenida.

El material se me obsequió, pero en caso de requerirla para algún uso se manejó un precio tentativo a negociar partiendo de \$250/ton por lo tanto:

$$1.80 \text{ m de tubería de PVC hidraulico de } \frac{1}{2} \text{ in comercial (mayoreo)} = \$7.56$$

$$\text{Material de empaque} = \$0.123$$

Malla de retención = \$0.10

Cinturón plástico = \$ 0.004

Costo total del filtro= \$7.78

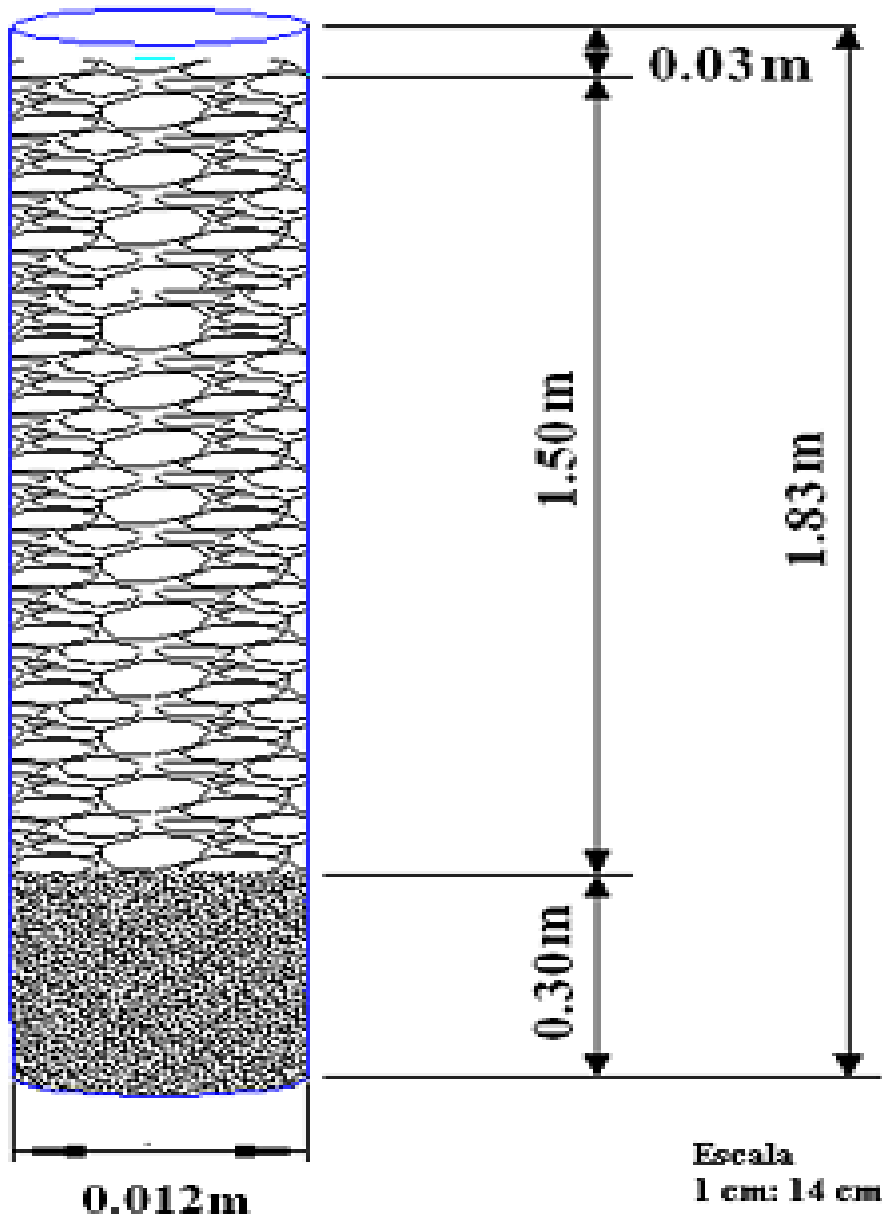
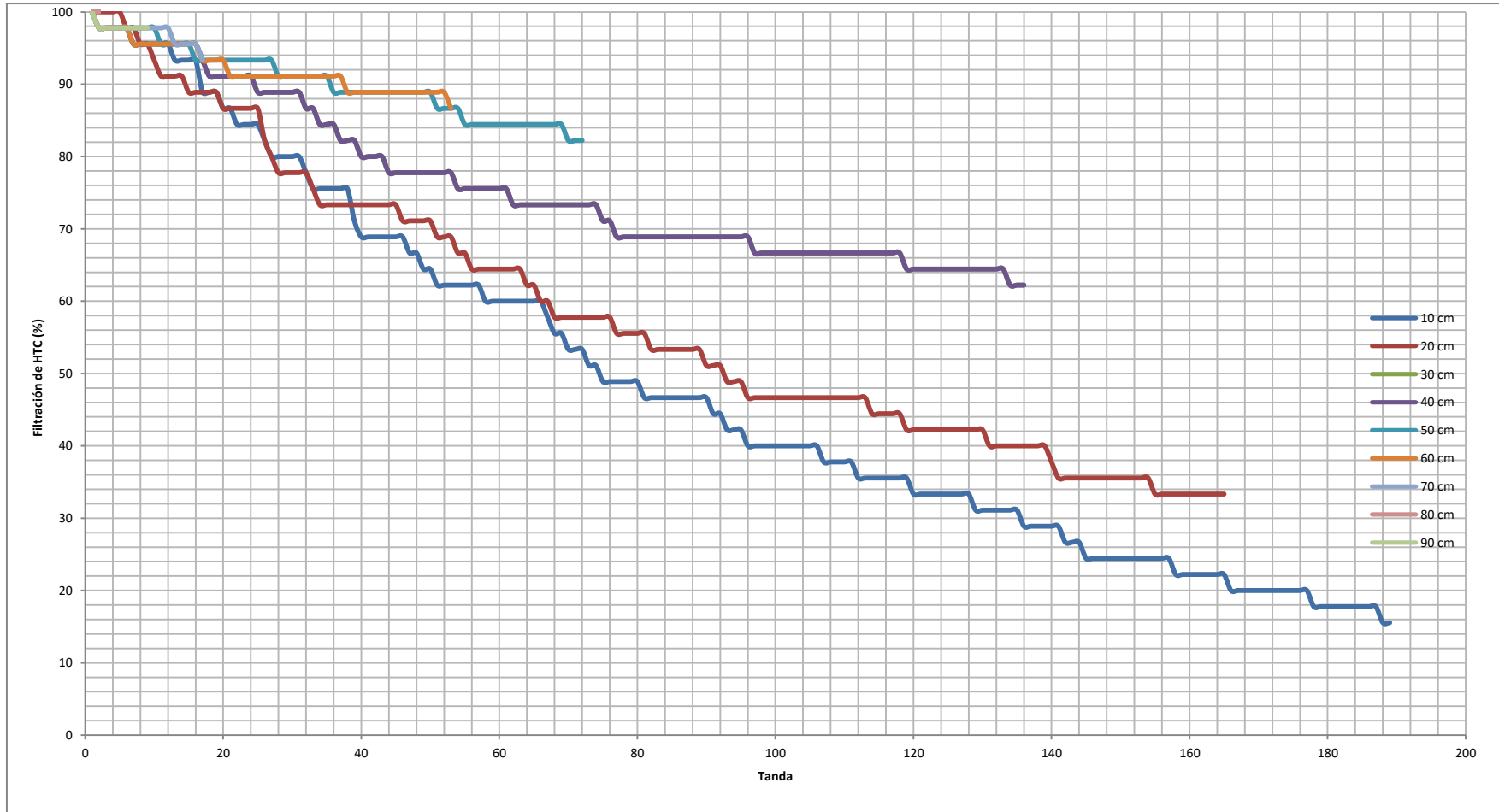


Figura 15-1 Esquema de vista y dimensiones a emplearse en el filtro desinfectante

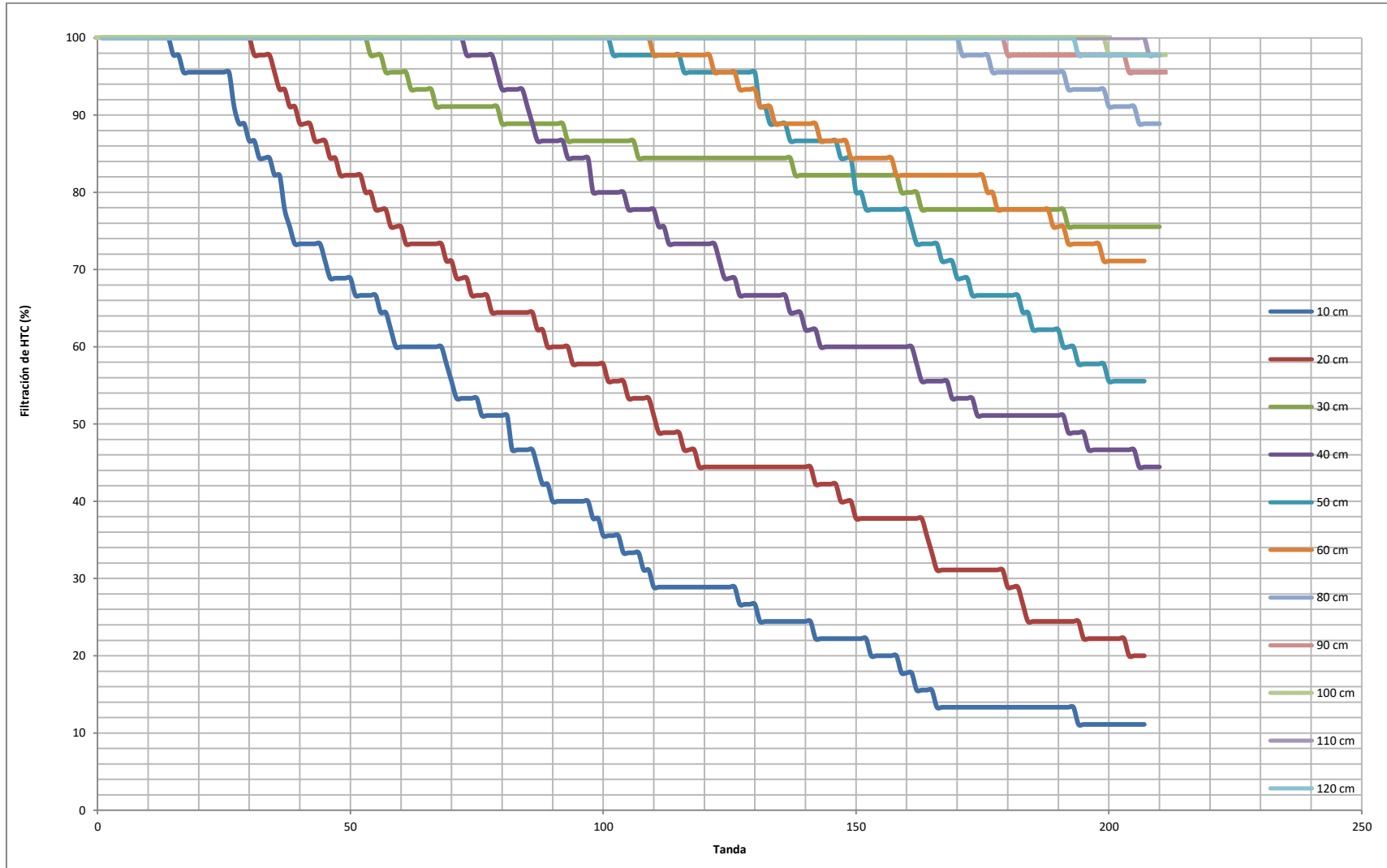
16 ANEXO IX

16.1 Tablas y nomogramas



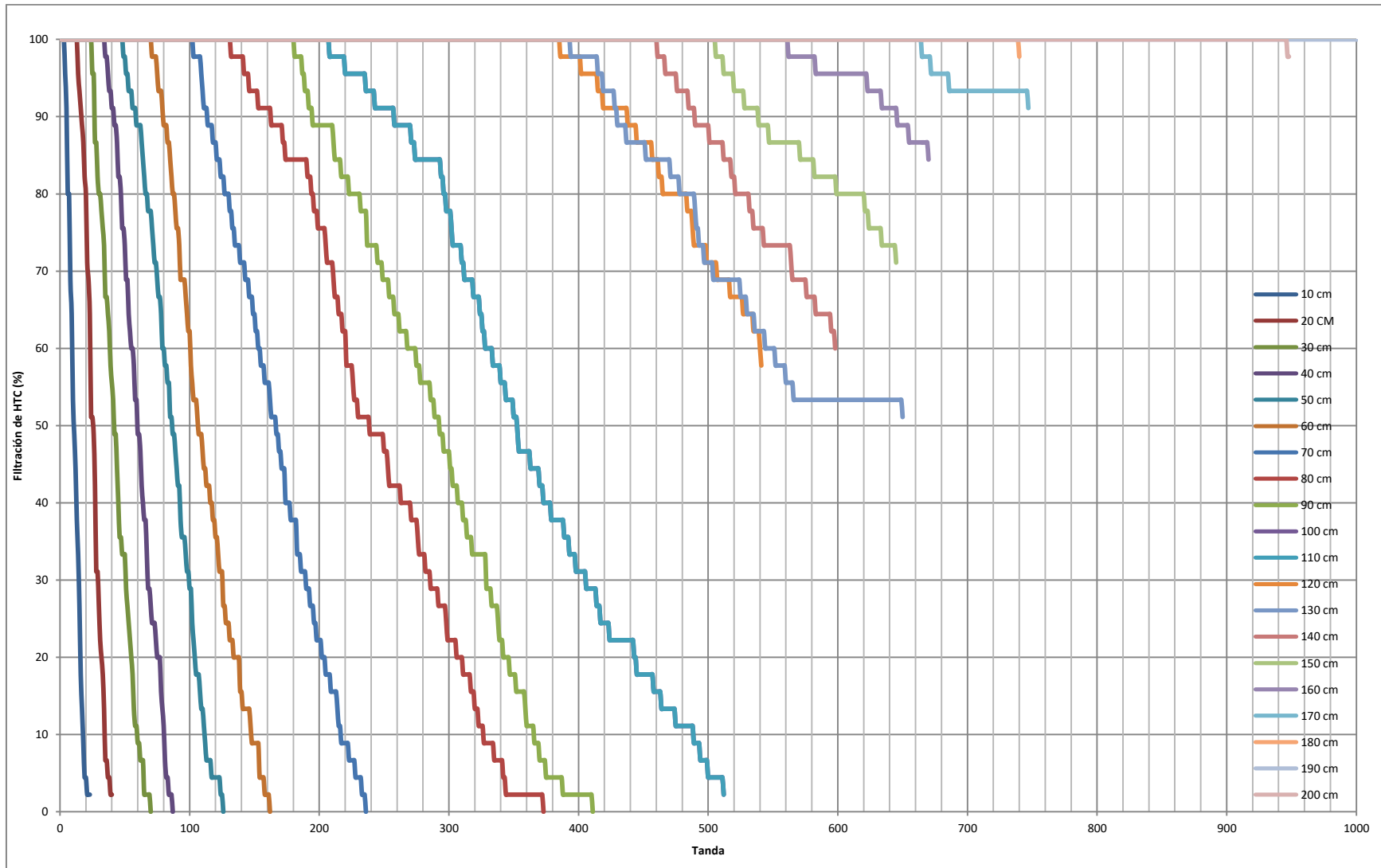
Tiempo = 15 d; $Q = 1.33 \text{ L d}^{-1}$; $t = 25.5 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_{\text{atm}} = 587 \text{ mm Hg}$; $dP = 2 \text{ mm}$

Figura 16-1 Perfil de filtrado con respecto a la operación AM₁ OD



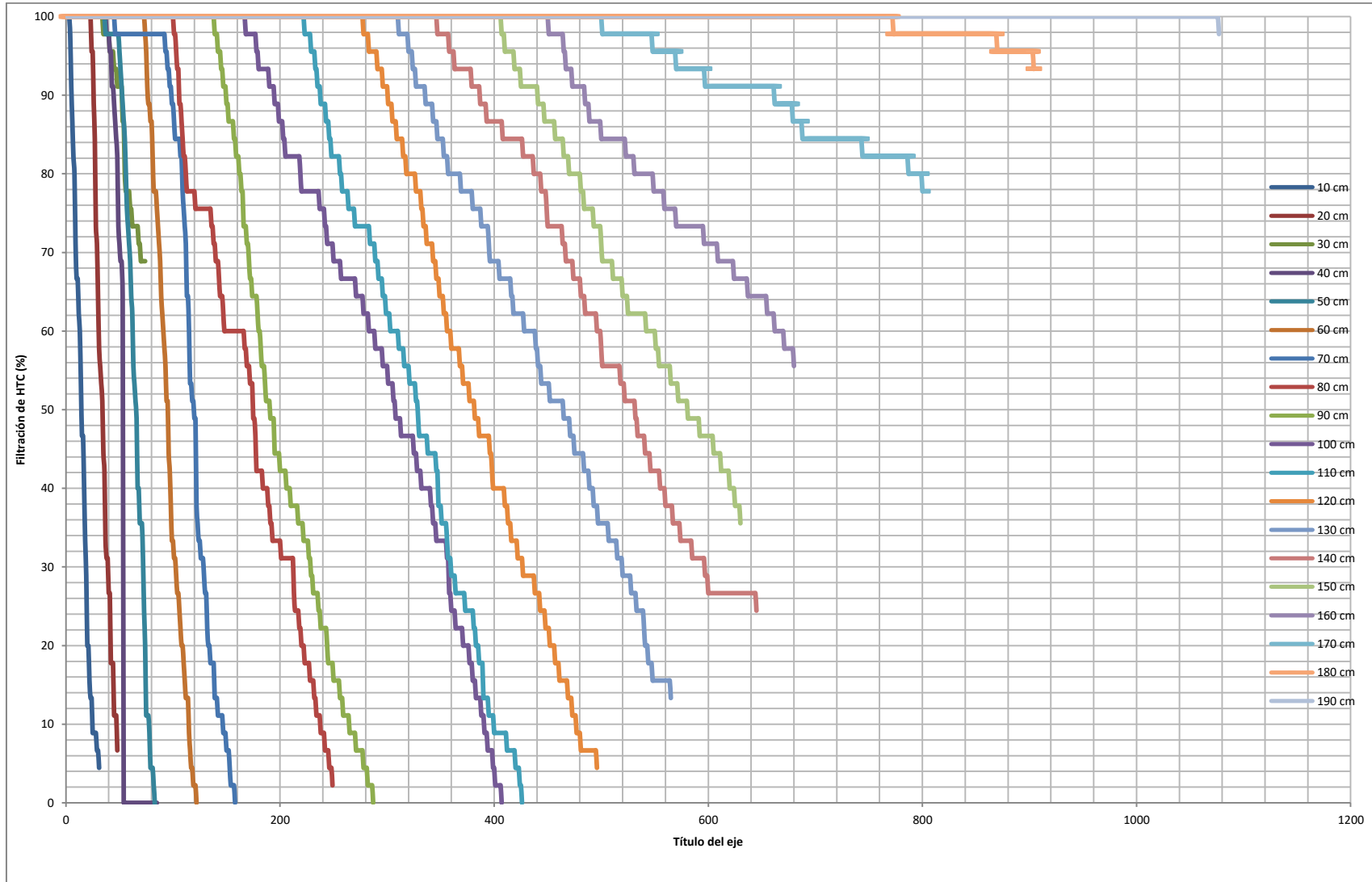
Tiempo = 15 d; $Q=1.755 \text{ L d}^{-1}$; $t=25 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_{atm}=587 \text{ mm Hg}$; $dP=2 \text{ mm}$

Figura 16-2 Perfil de filtrado con respecto a la operación del AM₂ OD



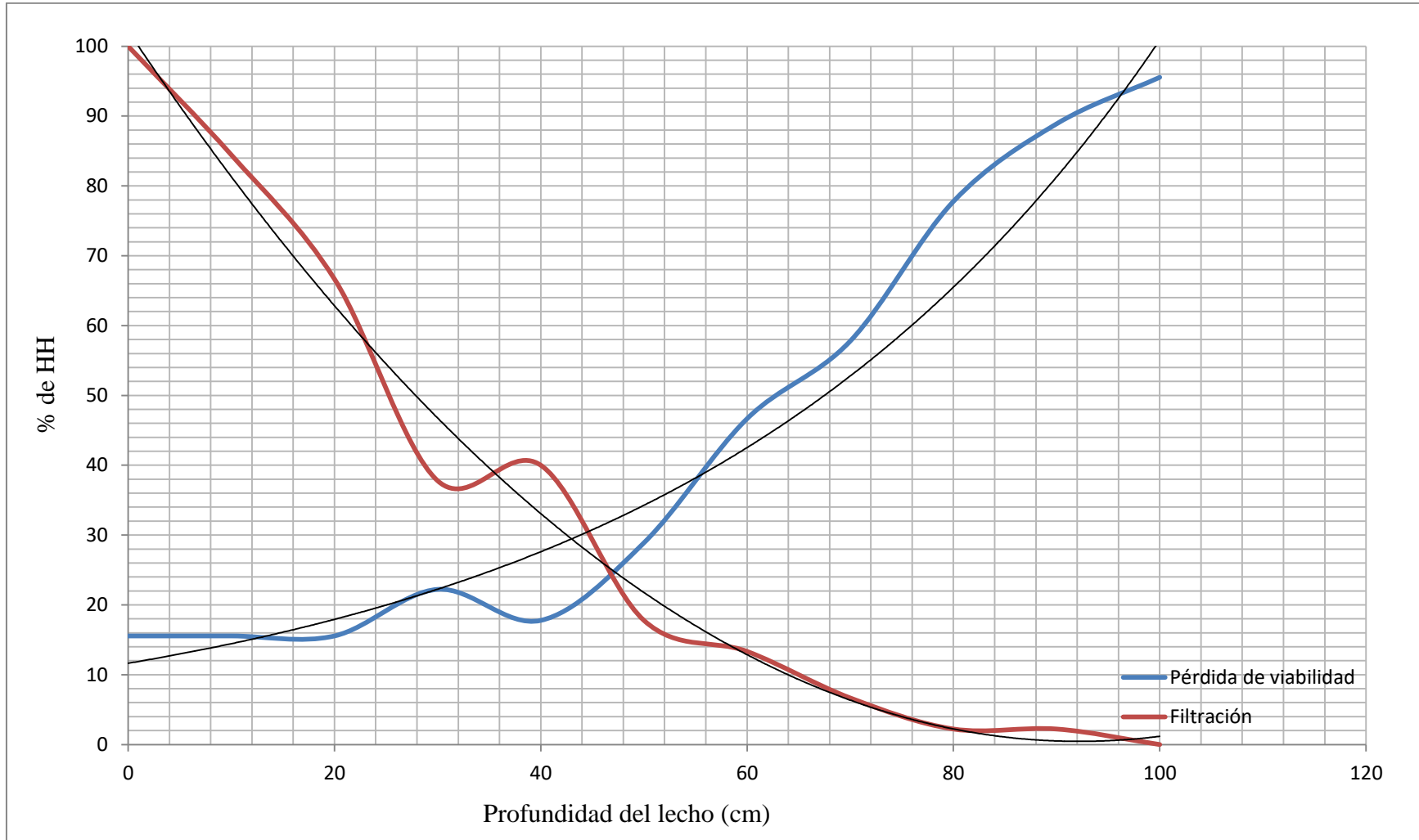
Tiempo = 3 d $Q=60.048 \text{ L d}^{-1}$; $t=25.5 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_{atm}=587 \text{ mm Hg}$; $dP=2 \text{ mm}$

Figura 16-3 Perfil de filtrado con respecto a la operación AM₁ OM

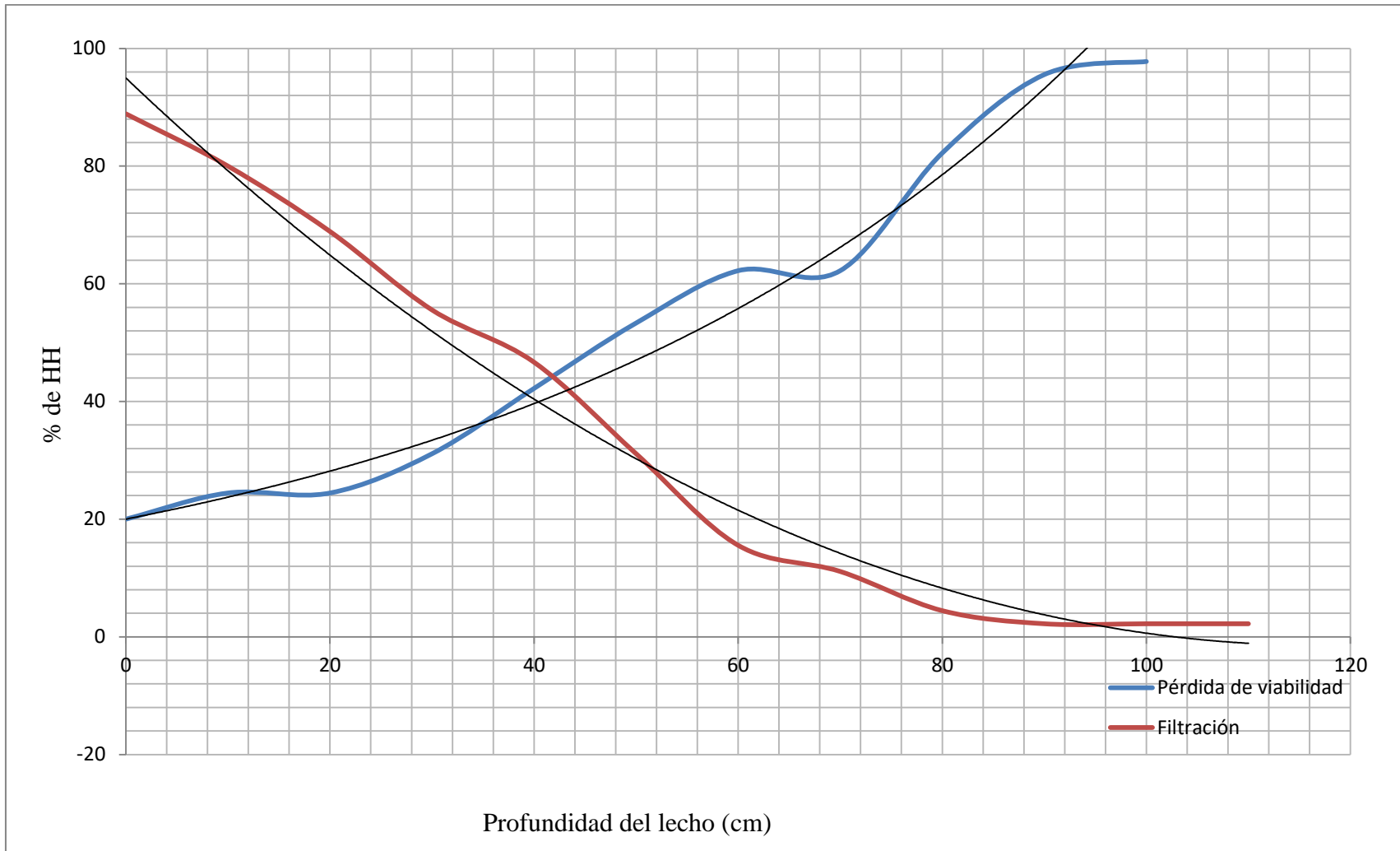


Tiempo = 3 d; $Q = 60.048 \text{ L d}^{-1}$; $t = 25.5 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_{\text{atm}} = 587 \text{ mm Hg}$; $dP = 2 \text{ mm}$

Figura 16-4 Perfil de filtrado con respecto a la operación $\text{AM}_2 \text{ OM}$



AM₁ Tiempo = 15 d; Q= 1.33 L d⁻¹; t=25 5 °C; Patm=587 mm Hg; dP=2 mm
 Ecuación de ajuste para Filtración: $y = 0.012x^2 - 2.2067x + 102.19$ $R^2 = 0.9859$
 Ecuación de ajuste para Pérdida de viabilidad: $y = 11.64e^{0.0216x}$ $R^2 = 0.9294$
Figura 16-5 Curva de operación para AM₁ en OD



AM₂ Tiempo = 15 d; Q=1.755 L d⁻¹; t=25.5 °C; Patm=587 mm Hg; dP=2 mm

Ecuación de ajuste para Filtración:

$$y = 0.007x^2 - 1.645x + 94.969$$

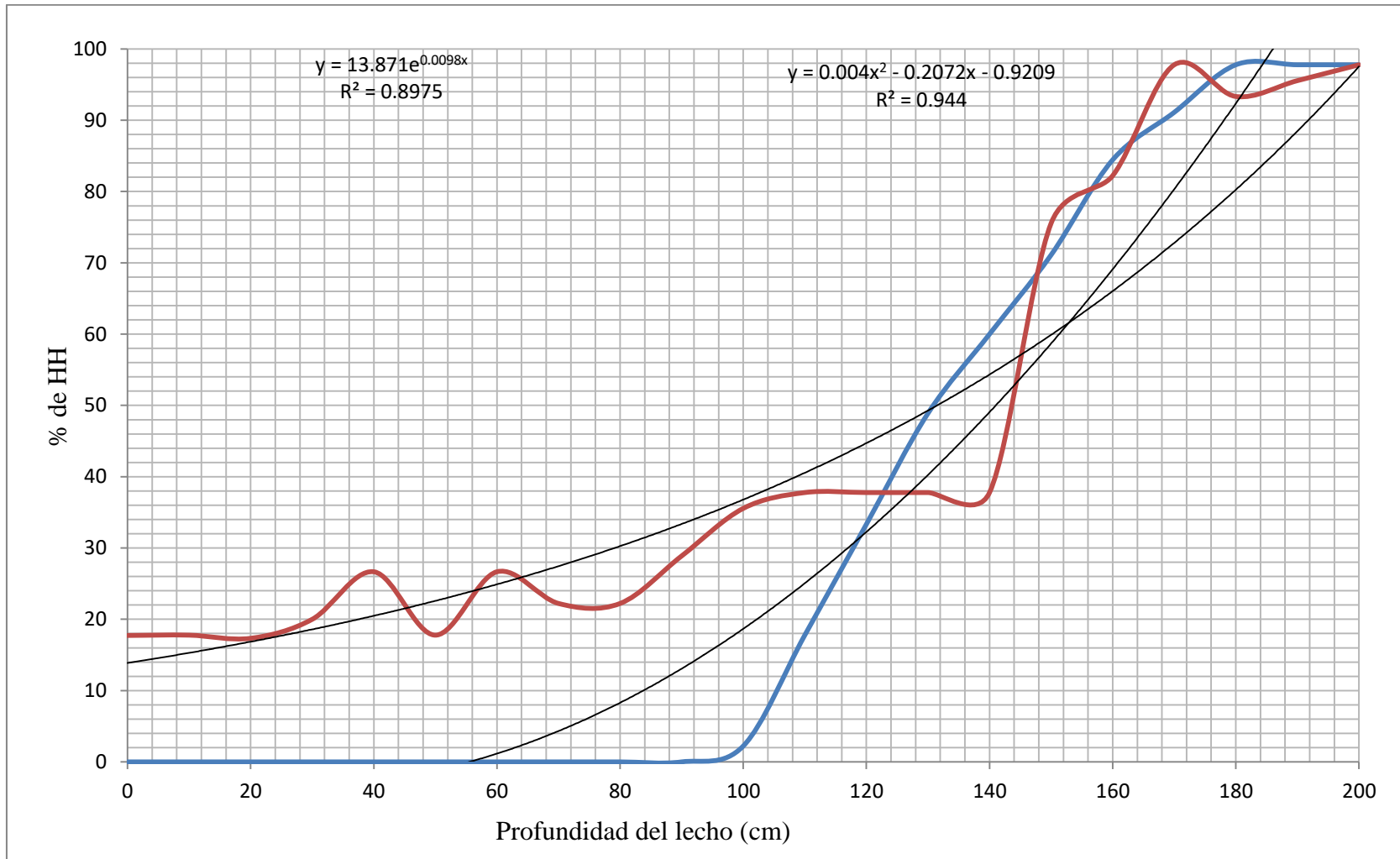
R² = 0.9845

Ecuación de ajuste para Pérdida de viabilidad:

$$y = 20.01e^{0.0171x}$$

R² = 0.9759

Figura 16-6 Curva de operación para AM₂ en OD

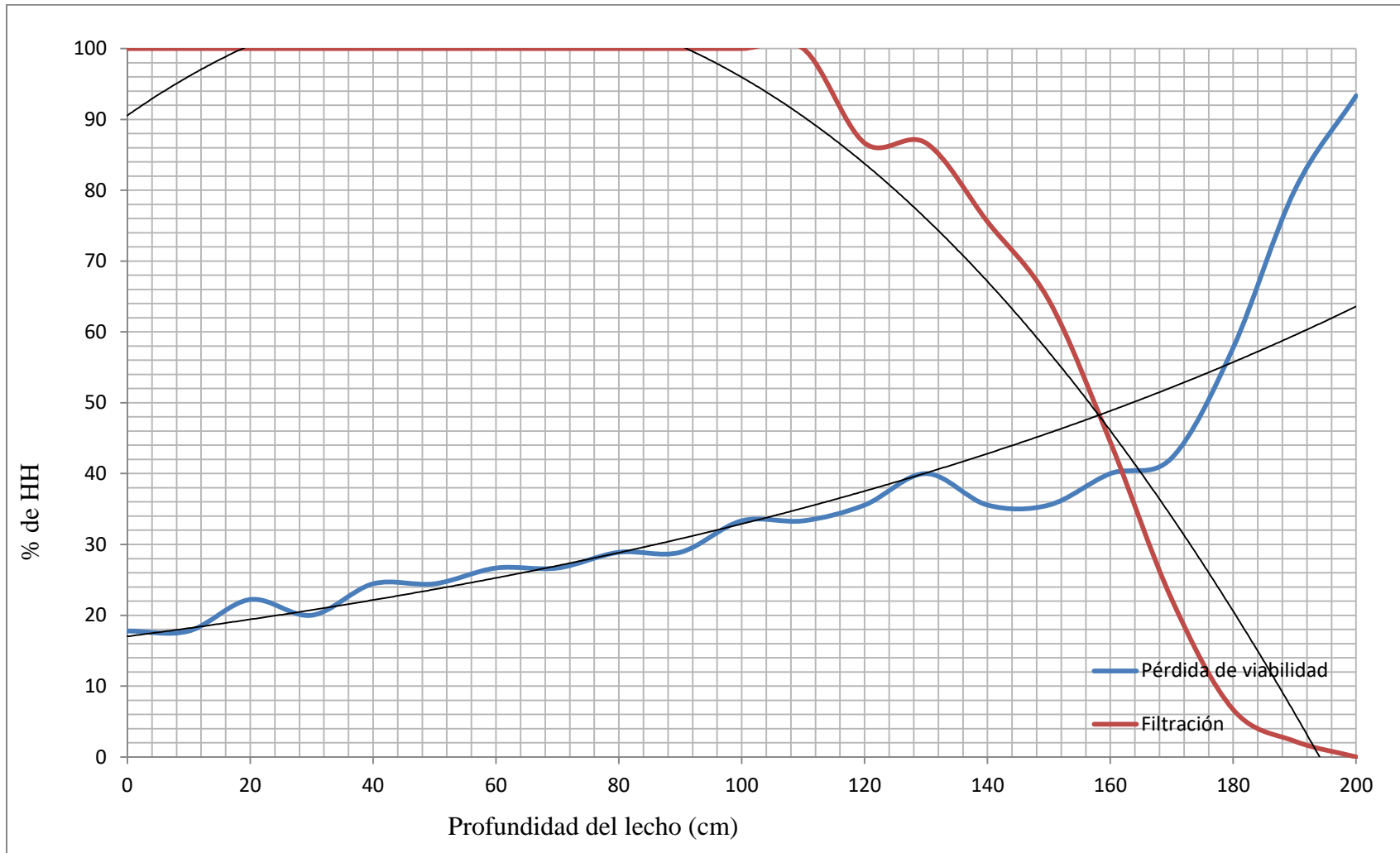


AM₁ Tiempo = 3 d Q=60.048 L d⁻¹; t=25.5 °C; Patm=587 mm Hg; dP=2 mm

Ecuación de ajuste para Filtración: $y = -0.0041x^2 + 0.2134x + 100.8$ $R^2 = 0.9454$

Ecuación de ajuste para Pérdida de viabilidad: $y = 13.871e^{0.0098x}$ $R^2 = 0.8975$

Figura 16-7 Curva de operación para AM₁ en OM



AM₂ Tiempo = 3 d; Q= 60.048 L d⁻¹; t=25.5 °C; Patm=587 mm Hg;dP=2 mm

Ecuación de ajuste para Filtración: $y = -0.0055x^2 + 0.6075x + 90.562$ $R^2 = 0.9597$

Ecuación de ajuste para Pérdida de viabilidad: $y = 17.019e^{0.0066x}$ $R^2 = 0.8781$

Figura 16-8 Curva de operación para AM₂ en OM

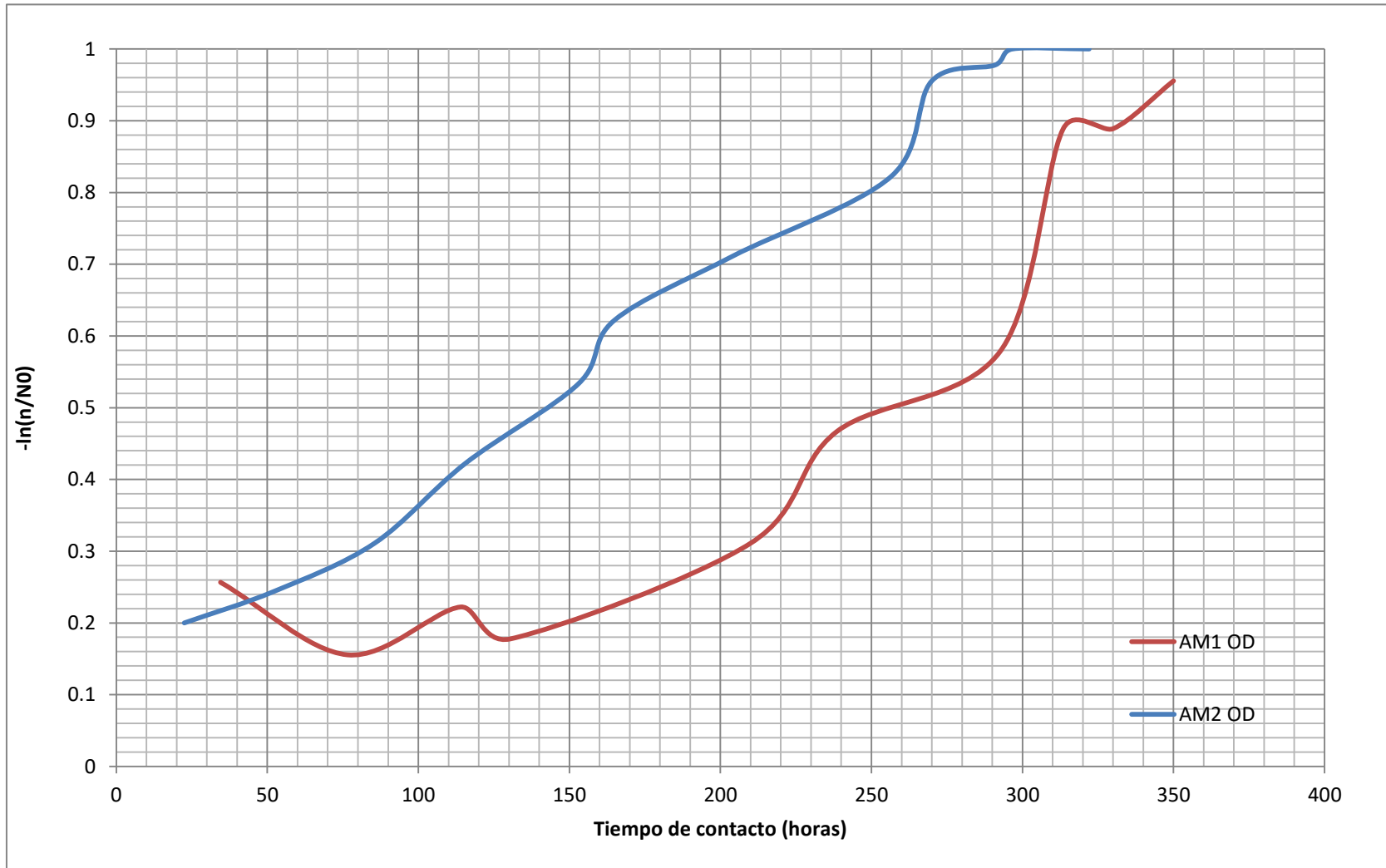


Figura 16-9 Nomograma de inactivación de HTC en Operación de Diseño (OD) AM₁

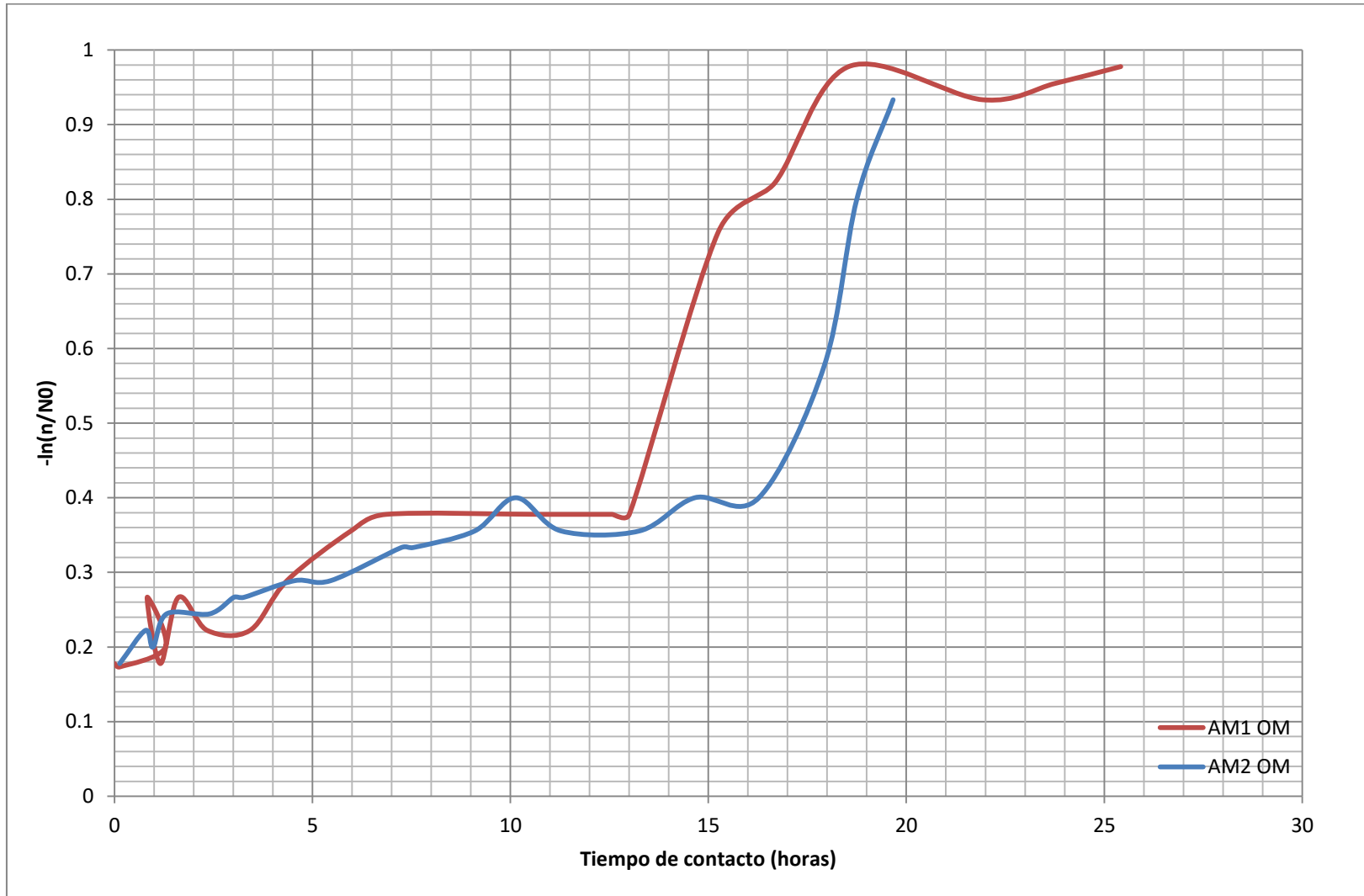


Figura 16-10 Nomograma de inactivación de HTC en Operación Máxima (OM) AM₂

Tabla 16-1 Eficiencia del filtro empacado con AM₁ en OD para HTC

Profundidad	Relación β	Eficiencia
10	1.18	15.55
20	1.5	33.33
30	1.95	48.88
40	2.5	60
50	5.62	82.22
60	7.5	86.66
70	15	93.33
80	45	97.77
90	45	97.77
100	-	100

Tabla de elaboración propia
-=-Indefinido

Tabla 16-2 Eficiencia del filtro empacado con AM₁ en OM para HTC

Profundidad	Relación β	Eficiencia
10	1.00	0
20	1.02	0
30	1.00	0
40	1.00	0
50	1.00	0
60	1.00	0
70	1.00	0
80	1.00	0
90	1.00	0
100	1.02	0.03
110	1.21	2.56
120	1.50	4.76
130	1.95	13.04
140	2.50	24.24
150	3.46	35.48
160	6.42	55.55
170	11.25	77.77
180	45	93.33
190	45	97.77
200	-	100

Tabla de elaboración propia
-=-Indefinido

Tabla 16-3 Eficiencia del filtro empacado con AM₂ en OD para HTC

Profundidad	Relación β	Eficiencia
10	1.12	11.11
20	1.25	20.00
30	1.45	31.11
40	1.8	44.44
50	2.14	53.33
60	3.21	68.89
70	6.42	84.44
80	9	88.89
90	22.50	95.56
100	45	97.78
110	45	97.78
120	45	97.78
130	-	100

Tabla de elaboración propia
 -=Indefinido

Tabla 16-4 Eficiencia del filtro empacado con AM₂ en OM para HTC

Profundidad	Relación β	Eficiencia
10	1.00	0
20	1.00	0
30	1.00	0
40	1.00	0
50	1.00	0
60	1.00	0
70	1.00	0
80	1.00	0
90	1.00	0
100	1.00	0
110	1.00	0
120	1.05	4.44
130	1.15	13.33
140	1.32	24.44
150	1.55	35.56
160	2.25	55.56
170	4.50	77.78
180	15.00	93.33
190	45.00	97.78
200	-	100

Tabla de elaboración propia
 -=Indefinido

Parámetros cinéticos correspondientes al modelo de Chick-Watson para *A. lumbricoides*

Cu			
Concentración (g mL ⁻¹)	K (particular)	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1279	y = -0.0917x + 0.1389 R ² = 0.9513	-0.1800
0.05	0.1258		
0.1	0.1597		
0.5	0.078		
1	0.0491		
2	-0.0431		

Cu₂O			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.2292	y = -0.0937x + 0.2409 R ² = 0.99	-0.2142
0.05	0.2348		
0.1	0.2436		
0.5	0.1938		
1	0.1488		
2	0.0522		

CuSO₄			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1683	y = -2E-17x + 0.1683 R ² = 0.9789	-0.1640
0.05	0.1725		
0.1	0.1862		
0.5	0.1698		
1	0.1582		
2	0.1423		

Ag₂O			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.306	y = -0.0645x + 0.3713 R ² = 0.3804	-0.0859
0.05	0.3183		
0.1	0.4649		
0.5	0.3268		
1	0.3612		
2	0.2148		

AgNO₃			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.2439	y = -0.1129x + 0.2161 R ² = 0.8845	-0.1845
0.05	0.189		
0.1	0.2312		
0.5	0.1064		
1	0.1168		
2	-0.0042		

Fe			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1145	y = -0.0741x + 0.1029 R ² = 0.9616	-0.2384
0.05	0.0874		
0.1	-0.1075		
0.5	0.0522		
1	0.0248		
2	-0.0402		

Fe₂O₃			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.145	y = -0.1091x + 0.1206 R ² = 0.9739	-0.3318
0.05	0.1003		
0.1	0.1023		
0.5	0.0599		
1	0.0128		
2	-0.0961		

FeS₂			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.00744	y = -0.1091x + 0.1206 R ² = 0.9739	-1.1554
0.05	0.0592		
0.1	0.115		
0.5	0.0197		
1	-0.0166		
2	-0.1297		

Ag coloidal			
Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.0121	$y = -0.1034x + 0.0182$	$R^2 = 1.3841$
0.05	0.0076	0.9645	
0.1	-0.0023		
0.5	-0.0023		
1	-0.0921		
2	-0.1923		

Parámetros cinéticos correspondientes al modelo de Chick-Watson para *T. canis*

Concentración (g mL-1)	K (particular)	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1726	$y = -0.06x + 0.157$	-0.2615
0.05	0.1184		
0.1	0.0163		
0.5	0.3264		
1	0.0912		
2	-0.0024		

Cu₂O

Concentración (g mL-1)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.04546	$y = -0.1031x + 0.0837$ $R^2 = 0.4572$	-0.1406
0.05	0.0572		
0.1	0.0159		
0.5	0.2085		
1	-0.0586		
2	-0.1432		

CuSO₄

Concentración (g mL-1)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1725	$y = -2E-17x + 0.1683$ $R^2 = 0.9853$	-0.1786
0.05	0.1652		
0.1	0.1525		
0.5	0.1427		
1	0.1411		
2	0.1124		

Ag₂O

Concentración (g mL-1)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.167	$y = -0.1357x + 0.1944$ $R^2 = 0.8705$	-0.0907
0.05	0.1735		
0.1	0.1605		
0.5	0.2085		
1	0.054		
2	-0.0936		

AgNO₃

Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1308	$y = 0.0002x + 0.1126$	-0.3041
0.05	0.14	$R^2 = 0.049$	
0.1	0.1677		
0.5	0.0589		
1	-0.001		
2	0.1798		

Fe

Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.2062	$y = -0.1328x + 0.1628$	-0.1689
0.05	0.1184	0.881	
0.1	0.1597		
0.5	0.1093		
1	-0.0243		
2	-0.0788		

Fe₂O₃

Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.1068	$y = -0.0883x + 0.168$	-0.1061
0.05	0.1948	$R^2 = 0.818$	
0.1	0.1716		
0.5	0.1416		
1	0.0885		
2	-0.0186		

FeS₂

Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	0.134	$y = -0.1092x + 0.1336$	-0.2241
0.05	0.1003	$R^2 = 0.9604$	
0.1	0.1455		
0.5	0.0762		
1	0.0366		
2	-0.0907		

Ag coloidal

Concentración (g mL ⁻¹)	K	Ecuación de ajuste para K	n
0.01	-0.0142	$y = -0.0949x + 0.0057$	1.2701
0.05	-0.0085	$R^2 = 0.9268$	
0.1	-0.0045		
0.5	-0.0014		
1	-0.0921		
2	-0.1923		

17 ANEXO X

17.1 Anexo estadístico

Pruebas interactivas de germinación

Las pruebas efectuadas muestran los resultados obtenidos para las mezclas de 0-100% de manera progresiva en porciones de 20 % en cada tanto del sustrato a prueba con su parte complementaria de tierra negra, es decir: (0% AM y 100% TN; 20% AM y 80% TN; 40% AM y 60% TN; 60% AM y 40% TN; 20% AM y 80% TN; 0% AM y 100% TN).

			Conclusión																																																																										
AM ₁	<p>Least Squares Means Table</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Jitomate</td> <td>59.253333</td> <td>8.8042502</td> <td>59.2533</td> </tr> <tr> <td>Lechuga</td> <td>49.995000</td> <td>8.8042502</td> <td>49.9950</td> </tr> <tr> <td>Trebol</td> <td>14.813333</td> <td>8.8042502</td> <td>14.8133</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Sq Mean	Std Error	Mean	Jitomate	59.253333	8.8042502	59.2533	Lechuga	49.995000	8.8042502	49.9950	Trebol	14.813333	8.8042502	14.8133	<p>P=0.0019 RSq=0.22 RMSE=37.353</p> <p>Summary of Fit</p> <table border="1"> <tbody> <tr><td>RSquare</td><td>0.217598</td></tr> <tr><td>RSquare Adj</td><td>0.186915</td></tr> <tr><td>Root Mean Square Error</td><td>37.35327</td></tr> <tr><td>Mean of Response</td><td>41.35389</td></tr> <tr><td>Observations (or Sum Wgts)</td><td>54</td></tr> </tbody> </table> <p>Analysis of Variance</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>19790.280</td> <td>9895.14</td> <td>7.0919</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>51</td> <td>71158.606</td> <td>1395.27</td> <td></td> <td>0.0019*</td> </tr> <tr> <td>C. Total</td> <td>53</td> <td>90948.886</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Parameter Estimates</p> <p>Effect Tests</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>Nparm</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Plantas</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>19790.280</td> <td>7.0919</td> <td>0.0019*</td> </tr> </tbody> </table>	RSquare	0.217598	RSquare Adj	0.186915	Root Mean Square Error	37.35327	Mean of Response	41.35389	Observations (or Sum Wgts)	54	Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F	Model	2	19790.280	9895.14	7.0919		Error	51	71158.606	1395.27		0.0019*	C. Total	53	90948.886				Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F	Plantas	2	2	19790.280	7.0919	0.0019*	Se rechaza H ₁												
Level	Sq Mean	Std Error	Mean																																																																										
Jitomate	59.253333	8.8042502	59.2533																																																																										
Lechuga	49.995000	8.8042502	49.9950																																																																										
Trebol	14.813333	8.8042502	14.8133																																																																										
RSquare	0.217598																																																																												
RSquare Adj	0.186915																																																																												
Root Mean Square Error	37.35327																																																																												
Mean of Response	41.35389																																																																												
Observations (or Sum Wgts)	54																																																																												
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F																																																																								
Model	2	19790.280	9895.14	7.0919																																																																									
Error	51	71158.606	1395.27		0.0019*																																																																								
C. Total	53	90948.886																																																																											
Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F																																																																								
Plantas	2	2	19790.280	7.0919	0.0019*																																																																								
AM ₂	<p>Least Squares Means Table</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Jitomate</td> <td>59.253333</td> <td>8.8042502</td> <td>59.2533</td> </tr> <tr> <td>Lechuga</td> <td>49.995000</td> <td>8.8042502</td> <td>49.9950</td> </tr> <tr> <td>Trebol</td> <td>14.813333</td> <td>8.8042502</td> <td>14.8133</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Sq Mean	Std Error	Mean	Jitomate	59.253333	8.8042502	59.2533	Lechuga	49.995000	8.8042502	49.9950	Trebol	14.813333	8.8042502	14.8133	<p>Summary of Fit</p> <table border="1"> <tbody> <tr><td>RSquare</td><td>0.217598</td></tr> <tr><td>RSquare Adj</td><td>0.186915</td></tr> <tr><td>Root Mean Square Error</td><td>37.35327</td></tr> <tr><td>Mean of Response</td><td>41.35389</td></tr> <tr><td>Observations (or Sum Wgts)</td><td>54</td></tr> </tbody> </table> <p>Analysis of Variance</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>19790.280</td> <td>9895.14</td> <td>7.0919</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>51</td> <td>71158.606</td> <td>1395.27</td> <td></td> <td>0.0019*</td> </tr> <tr> <td>C. Total</td> <td>53</td> <td>90948.886</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Parameter Estimates</p> <p>Effect Tests</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>Nparm</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Plantas</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>19790.280</td> <td>7.0919</td> <td>0.0019*</td> </tr> </tbody> </table>	RSquare	0.217598	RSquare Adj	0.186915	Root Mean Square Error	37.35327	Mean of Response	41.35389	Observations (or Sum Wgts)	54	Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F	Model	2	19790.280	9895.14	7.0919		Error	51	71158.606	1395.27		0.0019*	C. Total	53	90948.886				Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F	Plantas	2	2	19790.280	7.0919	0.0019*	Se rechaza H ₁												
Level	Sq Mean	Std Error	Mean																																																																										
Jitomate	59.253333	8.8042502	59.2533																																																																										
Lechuga	49.995000	8.8042502	49.9950																																																																										
Trebol	14.813333	8.8042502	14.8133																																																																										
RSquare	0.217598																																																																												
RSquare Adj	0.186915																																																																												
Root Mean Square Error	37.35327																																																																												
Mean of Response	41.35389																																																																												
Observations (or Sum Wgts)	54																																																																												
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F																																																																								
Model	2	19790.280	9895.14	7.0919																																																																									
Error	51	71158.606	1395.27		0.0019*																																																																								
C. Total	53	90948.886																																																																											
Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F																																																																								
Plantas	2	2	19790.280	7.0919	0.0019*																																																																								
SiO ₂	<p>Least Squares Means Table</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Jitomate</td> <td>59.253333</td> <td>4.7809828</td> <td>59.2533</td> </tr> <tr> <td>Lechuga</td> <td>49.995000</td> <td>4.7809828</td> <td>49.9950</td> </tr> <tr> <td>Trebol</td> <td>14.813333</td> <td>4.7809828</td> <td>14.8133</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Sq Mean	Std Error	Mean	Jitomate	59.253333	4.7809828	59.2533	Lechuga	49.995000	4.7809828	49.9950	Trebol	14.813333	4.7809828	14.8133	<p>P<.0001 RSq=0.84 RMSE=20.284</p> <p>Summary of Fit</p> <table border="1"> <tbody> <tr><td>RSquare</td><td>0.837141</td></tr> <tr><td>RSquare Adj</td><td>0.760235</td></tr> <tr><td>Root Mean Square Error</td><td>20.28399</td></tr> <tr><td>Mean of Response</td><td>41.35389</td></tr> <tr><td>Observations (or Sum Wgts)</td><td>54</td></tr> </tbody> </table> <p>Analysis of Variance</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>17</td> <td>76137.034</td> <td>4478.65</td> <td>10.8853</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>36</td> <td>14811.852</td> <td>411.44</td> <td></td> <td><.0001*</td> </tr> <tr> <td>C. Total</td> <td>53</td> <td>90948.886</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Parameter Estimates</p> <p>Effect Tests</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>Nparm</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PP</td> <td>5</td> <td>5</td> <td>32935.799</td> <td>16.0100</td> <td><.0001*</td> </tr> <tr> <td>Plantas</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>19790.280</td> <td>24.0500</td> <td><.0001*</td> </tr> <tr> <td>Plantas*PP</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>23410.955</td> <td>5.6900</td> <td><.0001*</td> </tr> </tbody> </table>	RSquare	0.837141	RSquare Adj	0.760235	Root Mean Square Error	20.28399	Mean of Response	41.35389	Observations (or Sum Wgts)	54	Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F	Model	17	76137.034	4478.65	10.8853		Error	36	14811.852	411.44		<.0001*	C. Total	53	90948.886				Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F	PP	5	5	32935.799	16.0100	<.0001*	Plantas	2	2	19790.280	24.0500	<.0001*	Plantas*PP	10	10	23410.955	5.6900	<.0001*	Se rechaza H ₁
Level	Sq Mean	Std Error	Mean																																																																										
Jitomate	59.253333	4.7809828	59.2533																																																																										
Lechuga	49.995000	4.7809828	49.9950																																																																										
Trebol	14.813333	4.7809828	14.8133																																																																										
RSquare	0.837141																																																																												
RSquare Adj	0.760235																																																																												
Root Mean Square Error	20.28399																																																																												
Mean of Response	41.35389																																																																												
Observations (or Sum Wgts)	54																																																																												
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F																																																																								
Model	17	76137.034	4478.65	10.8853																																																																									
Error	36	14811.852	411.44		<.0001*																																																																								
C. Total	53	90948.886																																																																											
Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F																																																																								
PP	5	5	32935.799	16.0100	<.0001*																																																																								
Plantas	2	2	19790.280	24.0500	<.0001*																																																																								
Plantas*PP	10	10	23410.955	5.6900	<.0001*																																																																								

PP	<p>▼ Least Squares Means Table</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Jitomate</td> <td>59.253333</td> <td>4.7809828</td> <td>59.2533</td> </tr> <tr> <td>Lechuga</td> <td>49.995000</td> <td>4.7809828</td> <td>49.9950</td> </tr> <tr> <td>Trebol</td> <td>14.813333</td> <td>4.7809828</td> <td>14.8133</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Sq Mean	Std Error	Mean	Jitomate	59.253333	4.7809828	59.2533	Lechuga	49.995000	4.7809828	49.9950	Trebol	14.813333	4.7809828	14.8133	<p>▼ Summary of Fit</p> <table border="1"> <tbody> <tr><td>RSquare</td><td>0.837141</td></tr> <tr><td>RSquare Adj</td><td>0.760235</td></tr> <tr><td>Root Mean Square Error</td><td>20.28399</td></tr> <tr><td>Mean of Response</td><td>41.35389</td></tr> <tr><td>Observations (or Sum Wgts)</td><td>54</td></tr> </tbody> </table> <p>▼ Analysis of Variance</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Model</td><td>17</td><td>78137.034</td><td>4478.65</td><td>10.8853</td><td></td></tr> <tr><td>Error</td><td>36</td><td>14811.852</td><td>411.44</td><td></td><td>Prob > F</td></tr> <tr><td>C. Total</td><td>53</td><td>90948.886</td><td></td><td></td><td><.0001*</td></tr> </tbody> </table> <p>▼ Parameter Estimates</p> <p>▼ Effect Tests</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>Nparm</th> <th>DF</th> <th>Squares</th> <th>F Ratio</th> <th>Prob > F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>PP</td><td>5</td><td>5</td><td>32935.799</td><td>16.0100</td><td><.0001*</td></tr> <tr><td>Plantas</td><td>2</td><td>2</td><td>19790.280</td><td>24.0500</td><td><.0001*</td></tr> <tr><td>Plantas*PP</td><td>10</td><td>10</td><td>23410.955</td><td>5.6900</td><td><.0001*</td></tr> </tbody> </table>	RSquare	0.837141	RSquare Adj	0.760235	Root Mean Square Error	20.28399	Mean of Response	41.35389	Observations (or Sum Wgts)	54	Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F	Model	17	78137.034	4478.65	10.8853		Error	36	14811.852	411.44		Prob > F	C. Total	53	90948.886			<.0001*	Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F	PP	5	5	32935.799	16.0100	<.0001*	Plantas	2	2	19790.280	24.0500	<.0001*	Plantas*PP	10	10	23410.955	5.6900	<.0001*	Se rechaza H_1
Level	Sq Mean	Std Error	Mean																																																																										
Jitomate	59.253333	4.7809828	59.2533																																																																										
Lechuga	49.995000	4.7809828	49.9950																																																																										
Trebol	14.813333	4.7809828	14.8133																																																																										
RSquare	0.837141																																																																												
RSquare Adj	0.760235																																																																												
Root Mean Square Error	20.28399																																																																												
Mean of Response	41.35389																																																																												
Observations (or Sum Wgts)	54																																																																												
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F																																																																								
Model	17	78137.034	4478.65	10.8853																																																																									
Error	36	14811.852	411.44		Prob > F																																																																								
C. Total	53	90948.886			<.0001*																																																																								
Source	Nparm	DF	Squares	F Ratio	Prob > F																																																																								
PP	5	5	32935.799	16.0100	<.0001*																																																																								
Plantas	2	2	19790.280	24.0500	<.0001*																																																																								
Plantas*PP	10	10	23410.955	5.6900	<.0001*																																																																								

Figura 17-1 Ensayos de interactividad con los medios de soporte

PRODUCTOS DERIVADOS DEL PRESENTE TRABAJO

Magaña-López, R., y Luna-Pabello, V.M., Barrera-Godínez, J.A., Orta de Velásquez, M.T. y Fernández-Villagómez, G., 2016. Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs, *Ecol. Eng.* 90:125-134.

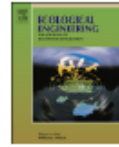
Ecological Engineering 90 (2016) 125–134



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoleng



Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs



R. Magaña-López^a, V.M. Luna-Pabello^{a,*}, J.A. Barrera-Godínez^b, M.T. Orta de Velásquez^c, G. Fernández-Villagómez^d

^a Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. Coyoacán 04510, Mexico

^b Departamento de Ingeniería Metalúrgica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. Coyoacán 04510, Mexico

^c Coordinación de Ingeniería Ambiental, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. Coyoacán 04510, Mexico

^d Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. Coyoacán 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2015
Received in revised form
17 December 2015
Accepted 26 January 2016

Keywords:

Mineral aggregate
Morphological damage
Helminth egg
Viability loss
Metal
Toxocara canis

ABSTRACT

This work shows the effects on morphology and inactivation or viability loss on *Toxocara canis* eggs (TCE) as a result of their direct exposure to mineral aggregates (MA). Contact assays were performed on TCE-MA in flasks using 15 TCE per sample, and MA (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, and 2 g mL⁻¹) for exposure times of 30, 60, 90, and 120 min, under shaking (US), and no shaking (NS) conditions. The MA characterization was performed by X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRD), Mass Absorption Spectroscopy with Graphite Furnace (MASGF), Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), and X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF). MA are composed of hematite, sandinite, montmorillonite, calcite, quartz, nimite, and jordanite. The composition of the residue on ignition (mg kg⁻¹) was: CaO (91,746.0 ± 1913.7), Zr (2542.8 ± 131.2), Al₂O₃ (1683.0 ± 209.3), SiO₂ (1138.0 ± 123.5), as well as Fe₂O₃ (212.0 ± 23.1), Cu (0.2 ± 0.4), TiO₂ (36.4 ± 6.1), and Ag (128.0 ± 1.4). In order to identify the morphological alterations associated with the TCE viability loss in the contact assays, photo-micrographs were taken by an optical microscope (OM) and a scanning electron microscope (SEM). These experiments showed structural damage on the external and internal layers (nucleus and hyaline solution) of the TCE, indicating a direct relationship with the viability loss or inactivation; the observed values were in the range of 35% (0.01 g of 2 mm MA; 30 min; NS) up to 92% (2.00 g of 0.6 mm MA; 120 min; US). The viability loss increases as the MA particle size decreases, and as the MA concentration increases, the effect of the time of contact and the shaking condition also affect the viability loss. The external morphological damage observed on TCE includes impairment, thinning, and fracture of the external layers. On the internal structures, heterogeneity of the hyaline solution and release of the nuclear material were observed. Consequently, the TCE viability loss can be attributed to the structural damage caused by the mechanical stress produced by direct contact with the MA surface. This damage is synergistic with the interaction caused by the chemical stress between the TCE biomass and the MA. Certain compounds of the MA, containing Ag, Cu, Fe, Al, Ti and Zn, have been reported as having biocidal ability.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Morbidity associated with helminthiasis is a global public health problem, emphasized in developing countries due to poverty,

causing an estimate of three and a half million deaths per year (Papale et al., 2008). The precarious conditions on urbanistic infrastructure and the use of untreated wastewater to irrigate crops that are later eaten uncooked are contributing factors to the prevalence of these conditions (Maya et al., 2012; Jimenez-Cisneros and Maya-Rendon, 2007; De Victorica and Galván, 2003).

Municipal wastewater in developing countries has been reported with a range of 70–3000 HE L⁻¹. In Mexico, 6–98 HE L⁻¹ in metropolitan areas, up to 330 HE L⁻¹ in rural and peri-urban areas (Jimenez-Cisneros and Maya-Rendon, 2007; Jimenez and Wang, 2006), while France and USA reported less than 10 HE L⁻¹

* Corresponding author.

E-mail addresses: burropaplanchar@yahoo.com (R. Magaña-López), lpvictor@unam.mx (V.M. Luna-Pabello), barrerag@unam.mx (J.A. Barrera-Godínez), mortal@ingen.unam.mx (M.T. Orta de Velásquez), georginafernandez@ingenieria.unam.mx (G. Fernández-Villagómez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.071>
0925-8574/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Jimenez-Cisneros, 2008). WHO recommends a criterion of $\leq 1 \text{ HE L}^{-1}$ for irrigation wastewater for crops intended for fresh consumption. However, epidemiological studies in Central Mexico indicate that the restriction of $\leq 1 \text{ HE L}^{-1}$ may not be sufficiently protective in situations where conditions favor egg survival (WHO, 2006).

Commonly used methods for wastewater disinfection as chlorine and ultraviolet radiation have not been effective to eliminate certain microorganisms nor highly resistant structures of propagation, such as helminth eggs (HE) (Mun et al., 2009). This is relevant issue to health due to the long survival times (several months) that largely exceed the time periods reported for other organisms, and also due to their higher resistance to inactivation. Aladawi et al. (2006) state that applying ultraviolet (UV) radiation at $0.0085\text{--}15.37 \text{ J cm}^{-2}$ doses to *Ascaris lumbricoides* eggs shows no lethal effect, on the contrary, it stimulates the embryonic period (transformation into the infectious form), and accelerates the larval stages (intermediary development stages between egg and adult). On the other hand, Guadagnini et al. (2013) claim that the UV radiation has an inactivation capacity of 82% on HE. However, the combination of UV radiation (0.0070 J cm^{-2}) and H_2O_2 (30 mg L^{-1}) leads to 81% inactivation. Therefore, there is a need of further research on the effects that other agents produce on non-larval eggs, and the embryonic process. On the other hand, ozone has shown to produce up to 95% impairment of HE viability when used for a time period of 45–180 min (Gadomska et al., 1991) and 94% impairment when used in $4.6 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ for 60 min (Rojas-Valencia et al., 2004). However, ozone being non-selective is needed at high dosage in raw wastewater and/or a pre-treatment is needed to remove organic matter (Orta de Velásquez et al., 2004). In this sense, Sobsey (2002) states that HE have structures that are more resistant compared to the structures commonly present in certain bacteria, viruses, and protozoa.

Particularly, *Toxocara canis* eggs (TCE) are around $85 \mu\text{m}$, have a subglobose form with an irregular envelope, and the protoplasm has a granular appearance (Rodríguez et al., 2006). TCE have five layers, one or two more than the eggs of *Hymenolepis nana*, *Taenia saginata*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma* spp., *A. lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura* (Jimenez-Cisneros, 2008; Jimenez-Cisneros and Maya-Rendon, 2007; Habluetzel et al., 2003; Ayçiçek et al., 2001). The five-layered arrangement is as follows, from the most outer to the most inner layer: (1) a thin uterine membrane with small bulges; (2) a vitelline layer represented by a thin membrane that follows the contour of the crests and ridges of an underlying layer; (3) a thick homogeneous chitinous layer (up to $6.3 \mu\text{m}$); (4) a granular electron-dense layer with an average thickness of $0.35 \mu\text{m}$; and (5) a laminar zone formed by the superposition of four or five fibrous layers with an average thickness of $0.6 \mu\text{m}$ (Ayçiçek et al., 2001). This conformation confers the TCE a high structural resistance to unfavorable environmental and chemical conditions.

TCE were selected as a representative model of the experimental behavior of HE for the present work in view of their higher number of layers, their presence in municipal wastewater and for representing less human infection risk than other species. Also, the study of TCE acquires more relevance since it has been established that they are the agent that cause the conditions referred to as ocular and visceral larva migrans (Rodríguez et al., 2006). The presence of TCE has been reported on wastewater, feces, sewage in rural and urban areas, and represent a public health issue due to their prevalence and morbidity in humans (Maya et al., 2012; Dubná et al., 2007; Kozan et al., 2005; Habluetzel et al., 2003). With the aim of promoting the inactivation or viability loss of HE, other studies have addressed the use of solar and gamma radiation, as well as the addition of acid and cationic compounds. Also, different types of processes have been used to eliminate these

reproductive structures, such as, aerobic, anaerobic and thermal processes, pH changes, fine filtration through membranes and zeolites, showing percentages of inactivation effectiveness ranging from 30% to 100% (Maya et al., 2012; Bandala et al., 2011; De Souza et al., 2011; Mun et al., 2009; Pecson et al., 2007; Vinnerås et al., 2003; Rivera-Garza et al., 2000). Similarly, assays have been performed on TCE using iodine, glutaraldehyde, benzalkonium chloride, potassium permanganate, ethyl alcohol, potassium hydroxide, phenolic solutions and a dihydroxybenzol and hydrogen peroxide solution resulting in partially favorable results (Shalaby et al., 2011; Ayçiçek et al., 2001). On the other hand, the use of metallic elements such as Ag, Fe, Cu, among others, either separately or combined, has also been applied showing a biocidal ability ranging from 50% to 90% on viruses, bacteria and fungi (Miranda-Rios et al., 2011; Ruparelia et al., 2008; Dubas et al., 2006; Panacek et al., 2006; Morones et al., 2005; Sondi and Salopek-Sondi, 2004). However, there are no references regarding the effect of these elements on HE or TCE.

Mineral aggregates (MA) contain compounds with biocidal ability, such as Ag, Cu, Fe, Al, Ti and Zn. The use of MA may represent an alternative to induce viability reduction on HE. Additionally, the present work aims to explore the effect of the MA structure and metal contents upon their interaction with TCE. For this reason, in this work, special attention will be paid to the possible structural and physiological damage promoted by mechanical stress and the chemical interaction attributable to the presence of MA.

2. Materials and methods

The tested variables where the effect on morphology and on TCE viability loss derived from the contact with MA at different concentrations and exposure times. The *T. canis* eggs used during the assay were recovered by dissection of an adult female gravid uterus.

2.1. Physicochemical characterization of the MA

The MA used in this study were obtained from a mine located in Zacatecas, Mexico. These materials are considered inert rocks with no commercial value since they only contain traces of metallic elements. MA samples having a particle diameter (pd) of approximately 2.5 cm , were crushed with a Zenith-Shanghai $\text{JC}250 \times 1200$ crushing equipment, and subsequently separated using sieves. There were two size fractions recovered; corresponding to $0.60 \pm 0.05 \text{ mm}$ and $2.00 \pm 0.05 \text{ mm}$. Afterwards, the fractions were washed with running water to remove excess dust and dried on an oven at 250°C in order to remove the remaining moisture. A sample of the recovered fractions was physicochemically characterized as follows: (a) Crystallography by X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRDs) using a Siemens D5000 Diffractometer with a Cu tube, $k_\alpha = 1.0546$, and a Ni filter in an angular interval of $0\text{--}90^\circ$ at 35 kV and 30 mA ; (b) Mass Absorption Spectroscopy with Graphite Furnace (MASGF) according to ASTM E1613-94 (ASTM, 1997); (c) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) using a ICP-Mass equipment, Bruker brand, Model Aurora M90 with coupled autosampler and computer, following the technical procedure PT-USAI-FQ-AA-001; and (d) X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) using a SRS3000 spectrometer, where the determination of major elements was performed preparing a bead containing 67:33% of Lithium Tetraborate/Lithium Metaborate using the analytic program USAIM07. For minor elements, determination was made via a pressed sample with 10% wax, applying the analytical program Traza04 of the equipment itself.

2.2. Characteristics of the TCE

T. canis eggs (TCE) used in this work were provided by the Helminthology Department of the National School of Biological

Sciences of the National Polytechnic Institute (Mexico City). The suspension contained approximately $15,000 \text{ TCE mL}^{-1}$, and was preserved in 2.5% formaldehyde at 4°C until use. The viability of test batch was determined in vitro according to the procedure described by Oaks and Kayes (1979), resulting in $83 \pm 4.5\%$ larval organisms, which render the batch technically acceptable for use.

2.3. Dissolution test of MA

In order to identify and quantify the metals released from the MA in aqueous suspension, as well as the solid remnants derived from the MA contact with water, assays were performed (in triplicate), according to the following procedure. In 250-mL Erlenmeyer flasks, 10 g of the MA were added along with 20 mL of distilled water, under constant shaking at $100 \pm 20 \text{ rpm}$ for 3 h, and also for a continuous period of three months. At the end of each period, samples were taken and analyzed by Atomic Absorption (AA), X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF), and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS).

2.4. Contact tests between TCE and MA

Contact tests between TCE and MA were conducted by placing 15 TCE/sample on circular plastic 5 mL-containers. TCE were directly exposed to MA in concentrations of 0.01, 0.05, 0.10, 0.5, 1.00, and 2.00 g mL^{-1} , for independent periods of time of 30, 60, 90, and 120 min. The tests were performed in two different conditions: no shaking (NS) and under mechanical shaking (US). The shaking condition was at $60 \pm 5 \text{ rpm}$ using a Vortex-Genie G560 shaker, Scientific Industry, during the corresponding time period for each test. In each test, 0.8 mL of distilled water was added in order to cover the sample. An experimental control was prepared for both, the NS and US conditions, consisting of 15 TCE per sample, and a 0.1 N H_2SO_4 solution as incubation media (Oaks and Kayes, 1979). All tests were performed in triplicate.

Once the contact time had elapsed for each test, the TCE were placed on a Doncaster camera and recovered by means of suction using plastic pipettes since adhesion of the TCE to the glass material was observed during the experiment. With the objective of identifying the morphological changes in the internal and external structures of the organism, some specimens were randomly separated in order to be micro-photographed with a IROSCOPE Mg-11T optical microscope, and a scanning electron microscope model JEOL 5900-LV equipped with micro analysis by energy dispersive X-Ray Spectroscopy. The rest of the TCE from each test were incubated separately at a constant temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$, for 28 days in 0.1 N H_2SO_4 solution under gentle shaking and the absence of light (Oaks and Kayes, 1979).

For this study, those TCE that were capable of developing and become infectious were considered viable, which was determined by the presence of larval stages. Therefore, the absence of larval stages after incubation was considered for quantifying the inactivation percentage or viability loss of TCE, using the following equation:

$$\text{Percentage of viability loss or inactivation (\%)} = \left[\frac{(N - n)}{N} \right] \times 100$$

where N is the number of TCE in contact with the MA; n the number of TCE not in the larval stages.

2.5. Statistical analysis

The effects on viability were determined by an ANOVA test using the SPSS software, with $\alpha = 0.1$ to identify the statistical differences between the test and control flasks.

Table 1
Qualitative characterization of MA.

Hematite	Fe_2O_3
Sandine	$(\text{K, Na})(\text{Si}_2\text{Al})\text{O}_6$
Montmorillonite	$\text{Na}_x(\text{Al, Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Calcite	CaCO_3
Nymite	$(\text{Ni, Mg, Al})_2(\text{SiAl})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2(\text{NiMgFe})_2 \text{ Al}(\text{AlSi}_3)\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
Jordanite	$\text{Pb}_{24}(\text{As, Sb})_6\text{S}_{22}$
Quartz	SiO_2

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the MA

Table 1 shows the MA qualitative characteristics obtained by XRD. The analysis shows that MA mainly consists of: quartz, hematite, sandine, montmorillonite, calcite, nymite, and jordanite. Mengelle-López et al. (2013) report the existence of different mineral species in the MA extraction zone. The quantitative analysis obtained by MASGF allowed us to determine an Ag content equivalent to $128 \pm 14 \text{ ppm}$. Also, by XRF analysis, we were able to quantify the MA chemical composition, reported in mg kg^{-1} , as: CaO ($91,746 \pm 19,13$), Zn ($34 \pm 1,22$), Al_2O_3 ($1683,00 \pm 209,00$), SiO_2 ($1138,00 \pm 123,00$), as well as Fe_2O_3 ($212,00 \pm 23,06$), Cu ($0,20 \pm 0,44$), TiO_2 ($36,40 \pm 6,06$), Ag ($152,00 \pm 32,00$), among others (Table 2).

It is worth mentioning that in other studies performed in bacteria, algae and HE, either independently or in combination, the use of concentrations lower than 100 mg L^{-1} of ZnO, TiO_2 , CuO, Cu_2O , Fe_2O_3 , Ag_2 , Ag_2O , and Al_2O_3 has accomplished up to 99% mortality (Solís-López et al., 2014; Miranda-Ríos et al., 2011; Dubas et al., 2006), therefore, the exposure of TCE to MA could induce their viability loss. Table 4 shows the effect of different experimental conditions on HE viability. In most cases, to achieve a total inactivation of HE, the contact time tends to be longer, i.e. up to 120 min. The best results (100% of inactivation of fertilized TCE) were obtained by using 6.25 mg mL^{-1} of benzalkonium-ion intercalated aluminum triphosphate during 30 min.

3.2. Dissolution of MA

Table 3 shows the results of the MA dissolution tests for 3-h and three-month periods. The results are expressed as mean \pm SD, and

Table 2
Quantitative characterization of MA.

Element or compound	Mean \pm SD (mg kg^{-1})
CaO	$91,746.0 \pm 19,13.7$
Zr	2542.8 ± 131.2
Al_2O_3	1683 ± 209.3
SiO_2	1138.0 ± 123.5
MgO	693.2 ± 33.2
Na ₂ O	375.2 ± 56.8
Nb	250.2 ± 1.6
Fe_2O_3	212.0 ± 23.1
K_2O	42.8 ± 16.2
P_2O_5	41.6 ± 7.4
TiO_2	36.4 ± 6.1
Rb	34.0 ± 1.2
MnO	16.0 ± 1.4
Y	12.0 ± 1.2
V	7.8 ± 0.4
Ag	128.0 ± 14.0
Sr	3.8 ± 1.9
Ba	1.7 ± 0.2
Co	0.7 ± 0.0
Cr	0.4 ± 0.1
Cu	0.2 ± 0.0
Ni	0.2 ± 0.4
Zn	0.2 ± 0.4

SD, standard deviation.

Table 3
Quantitative characterization of MA dissolution (3 h and 3 months assays).

Element or compound	3 h (mean ± SD) (mg kg ⁻¹)	3 months (mean ± SD) (mg kg ⁻¹)
Nb	ND	ND
Fe ₂ O ₃	ND	ND
P ₂ O ₅	ND	ND
Rb	ND	ND
Zn	830.69 ± 413.21	1009.57 ± 662.95
Y	247.88 ± 287.31	37.10 ± 33.03
SiO ₂	94.24 ± 163.23	ND
Cu	47.31 ± 26.39	15.80 ± 20.68
Na ₂ O	30.02 ± 8.32	21.67 ± 9.16
CaO	21.39 ± 2.03	68.42 ± 33.23
Au	13.65 ± 22.82	23.66 ± 8.96
MgO	11.89 ± 3.12	13.93 ± 8.72
Nd	11.86 ± 11.14	4.23 ± 0.24
Al ₂ O ₃	10.42 ± 17.39	5.80 ± 1.10
Ni	10.33 ± 4.43	53.11 ± 28.01
K ₂ O	7.11 ± 2.45	4.59 ± 0.24
Pb	5.75 ± 6.40	0.79 ± 1.00
MnO	4.04 ± 1.86	1.97 ± 1.20
Cr	2.79 ± 0.94	1.47 ± 1.82
V	2.03 ± 1.76	5.09 ± 5.71
TiO ₂	1.15 ± 1.33	2.36 ± 1.70
As	0.84 ± 0.84	1.21 ± 1.03
Zr	0.73 ± 0.63	ND
Ag	0.54 ± 0.48	1.20 ± 0.45
Co	0.44 ± 0.37	4.41 ± 1.31
Hg	0.31 ± 0.53	0.22 ± 0.08
Ba	0.20 ± 0.01	ND
Sr	ND	ND

SD, standard deviation; ND, not determined by the analytical technique.

the concentrations were obtained by ICP-MS and AA, a total of 24 elements were detected in the following concentrations (mg L⁻¹): Zn (830.69 ± 413.20), Y (247.88 ± 287.31), SiO₂ (94.24 ± 163.23), Cu (47.31 ± 26.39). Additionally, elements with biocidal ability were characterized, such as: Al₂O₃ (10.42 ± 17.39), Pb (5.75 ± 6.04), Cr

(2.79 ± 0.94), Ti (1.15 ± 1.33), As (0.84 ± 0.84), Ag (0.54 ± 0.48), and Hg (0.31 ± 0.53) (Solís-López et al., 2014; Miranda-Ríos et al., 2011; Wang et al., 2009; Dubas et al., 2006; Elechiguerra et al., 2005). Fe₂O₃ content (37.16 ± 14.25) was obtained by mass differences using XRF.

The three-month period proved the presence of the same elements, and quantitative contents similar to that obtained for the 3-h period. However, the concentration of elements with biocidal ability was higher in the case of Zn (121.53%), TiO₂ (205.17%), As (144.04%) and Ag (222.22%). In contrast, for Cu, Al₂O₃, Pb and Hg the contents was maintained between 13.73% and 70.96%, which corresponds to the average concentrations and standard deviation obtained for the 3-h shaking tests. As will be shown later, the difference in the medium contents and higher concentration of metallic elements in the samples of the three-month tests, facilitates transporting these elements into the TCE, which in turn induces a higher viability loss.

Dissolved metals have demonstrated microbicidal capacity. For example, silver and titanium compounds promote oxidation and inhibition of respiratory-related enzymatic processes in bacteria, and break the electron transference chain and disrupt DNA and RNA (Liu et al., 2012; Miranda-Ríos et al., 2011). Similar processes may be occurring in the inactivation of HE. It is known that the chemical composition and the morphology of HE from various species reported in wastewater are similar, the main variation being the amino acid contents in the various layers (Rojas-Valencia, 2011).

3.3. MA effect on the viability of the TCE

Fig. 1 shows the MA-TCE contact test results. Said results show progressive viability losses for all the tested conditions ranging from 35% to 92%; except in the control conditions, where an average of 13% was maintained. The highest viability loss percentages were found at an exposure time (ET) of 120 min in the MA size

Table 4
Inactivation of HE at different experimental conditions.

Disinfectant	Concentration	Contact time (minutes)	Inactivation	Reference
Peracetic acid	550 mg L ⁻¹	10	2–3 log	Rojas-Valencia (2011)
H ₂ O ₂ /Fe(II)	280 mmol L ⁻¹ /10 mmol L ⁻¹	120	84%	Bandala et al. (2012)
Fe(II)	10 mmol L ⁻¹	120	30%	Bandala et al. (2012)
NaClO ₄	150 mg min L ⁻¹ free chlorine	120	20–30%	Bandala et al. (2012)
H ₂ O ₂	3–10 HELL ⁻¹ and when it is possible to reduce it to <20 mg TSSL ⁻¹ the HE content will be ≤1 HELL ⁻¹	2280	Reduction 47% Inactivation 37%	Guadagnini et al. (2013)
H ₂ O ₂ /solar radiation	Until 280 mmol L ⁻¹	120	70%	Bandala et al. (2012)
H ₂ O ₂ /UV radiation	30 mg L ⁻¹ /70 mJ cm ⁻²	2280	Reduction 67% Inactivation 11%	Guadagnini et al. (2013)
O ₃	8.3 mg O ₃ /L	45, 90 and 180	80–96%	Gadomska et al. (1991)
O ₃	4.6 mg O ₃ /L	60	94%	Rojas-Valencia et al. (2004)
UV radiation	70–400 mJ cm ⁻²	>60	Reduction 62% Inactivation 10%	Guadagnini et al. (2013)
UV radiation	15,370 mJ cm ⁻²	60	Inactivation 93%	Aladawi et al. (2006)
Gamma radiation	⁶⁰ Co 5 kGy	47.73	100%	De Souza et al. (2011)
Iodophorous solution	4%	120	95%	Avramova et al. (1985)
Performic acid	6%	240	95%	Avramova et al. (1985)
Perhydrol	6%	240	95%	Avramova et al. (1985)
Benzalkonium-ion intercalated aluminum triphosphate	6.25 g L ⁻¹	30	100%	Akao et al. (1995)
Iodine	10%	40	100% (no motility observed)	Ayçiçek et al. (2001)
Glutaraldehyde	2%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Benzalkonium chloride	10%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Sodium hypochloride	7%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Potassium permanganate	1%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Ethyl alcohol	70%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Potassium hydroxide	10%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)
Phenol	3%	10	100%	Ayçiçek et al. (2001)

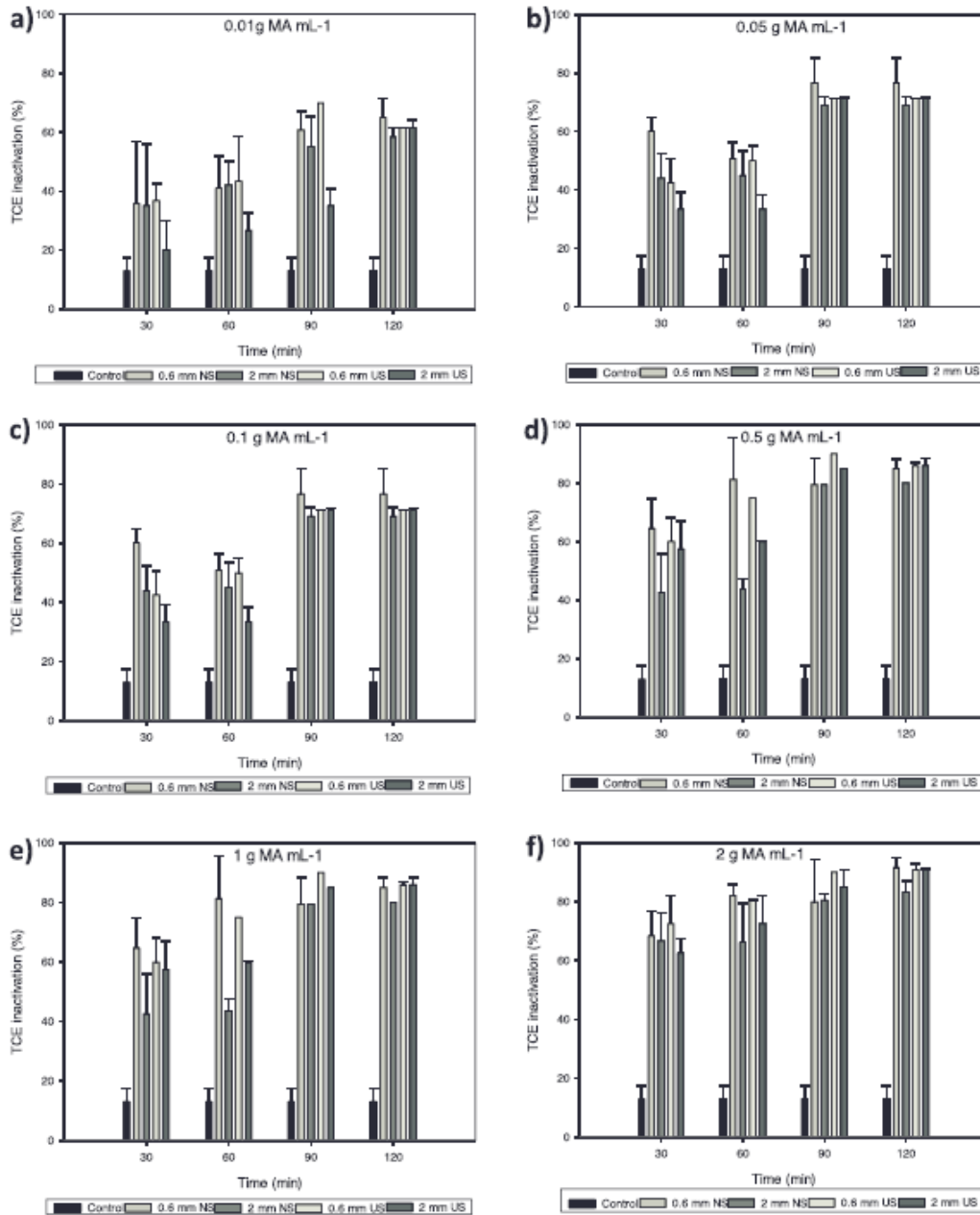


Fig. 1. Viability loss percentage of *T. canis* eggs caused by contact with natural mineral aggregate (MA) at six different concentrations under different testing conditions: (a) 0.01 g MA mL⁻¹; (b) 0.05 g MA mL⁻¹; (c) 0.1 g MA mL⁻¹; (d) 0.5 g MA mL⁻¹; (e) 1 g MA mL⁻¹; and (f) 2 g MA mL⁻¹. NS, no shaking; US, under shaking.

fractions of 0.6 mm (90.9%) and 2 mm (90.9%), refer to Fig. 1f. In fact, the tests performed on the smallest particle size (0.6 mm) showed values higher than 90% starting at an ET of 90 min (Fig. 1e and f).

The viability loss increases at higher ET, stirring (US), and MA concentrations, and is particularly accentuated for smaller particle sizes (0.6 mm), and US (up to 32%) tests. It should be noted that the increase in those variables confers better contact between the MA and the TCE surface, as well as better contact with the dissolved metals. In the US tests a superior effect was observed (up to 20%) even for the lower concentrations (0.01 g mL^{-1} of MA and 0.05 g mL^{-1} of MA) at the ETs of 30 min and 60 min (Fig. 1a and b, respectively), which suggest a chemical stress created by the MA. In NS tests, higher viability losses were observed for concentrations above 0.1 g mL^{-1} of MA and for contact times of 60 min or higher (Fig. 1c–f). This provides evidence that the mechanical stress is a major factor on the viability loss (Fig. 2), and that it increases with greater metal concentration and longer contact time, as well as with smaller particle size. The statistical significance of these

observations was assessed by the ANOVA test ($\alpha=0.1$), comparing the control against all the different study conditions. These results show significant differences for all the tested conditions.

In order to identify the effects resulting from the contact between TCE and MA, micro-photographs were taken by OM and SEM (see Figs. 2 and 3, respectively). As shown in Fig. 2a, the control test shows a TCE with untouched structures (layers, nucleus and hyaline solution), observing a clear delimitation, homogeneity, and differentiation in each one. The NS contact tests (Fig. 2b and d) were characterized by differences in the initial ovoid geometry, structural heterogeneity, and thickness variation of the external constituents. These structural alterations can be attributed to the chemical stress caused by the MA content. On the other hand, US tests show a notorious mechanical stress evidenced by the presence of ruptures, rips, and significant decrease in the thickness of the external and internal envelopes, and by the nuclear material segregation (Fig. 2c and e). It is worth noticing that in the NS tests there is only contact between the MA and the most superficial layer of the TCE. However, particles could interact in the TCE interior, since,

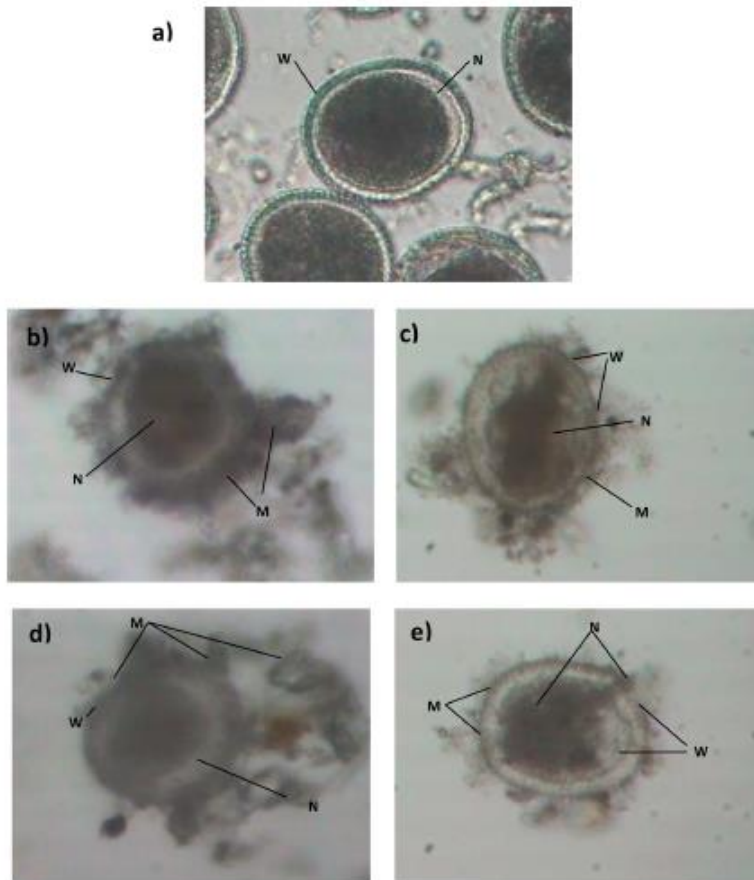


Fig. 2. OM images (20 \times) of *T. cantus* eggs exposed to MA for 120 min, no shaking (NS) and under shaking (US). (a) Control; (b) TCE ruptured and damaged by MA; (c) MA 2 mm NS; (d) MA 2 mm US; (e) MA 0.6 mm NS; and (f) MA 0.6 mm US. M = MA; N = nucleus; W = layer.

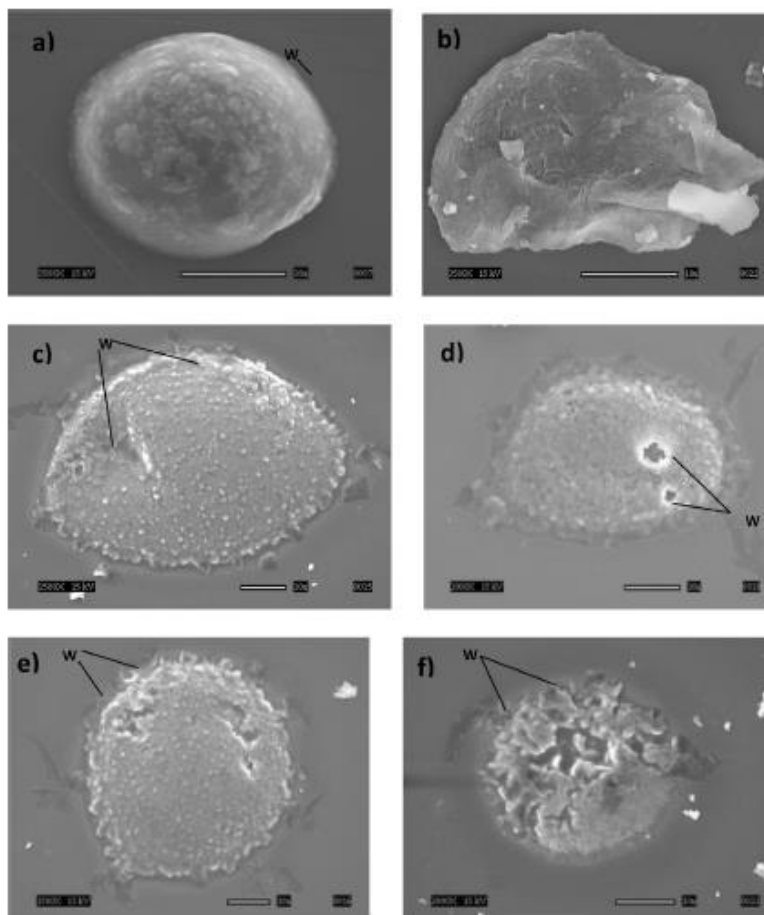


Fig. 3. SEM images of *T. cantis* eggs exposed to natural MA for 120 min, no shaking (NS) and under shaking (US). (a) Control; (b) MA 2 mm NS; (c) MA 2 mm US; (d) MA 0.6 mm NS; and (e) MA 0.6 mm US. W = layers.

as mentioned by Aguilar et al. (2006), HE have naturally occurring fissures that allow them to perform activities like osmoregulation. US tests promote a close interaction of the TCE surface with the MA particles due to the fact that shaking induces collisions and friction. Consequently, the observed effects on the TCE can be attributed to a combination of mechanical stress and chemical interaction, caused by the particle shapes and the metallic content of the MA, as well as by the contact time.

On the micro-photographs taken by SEM of a TCE specimen with no larva, from the control test, with no contact at all with the MA (Fig. 3a), its typical characteristics can be observed (ovoid and smooth). In contrast, Fig. 3b–e confirms the nature of the structural damage, previously identified by OM with respect to particle size and shaking conditions.

In the case of the specimens from the NS tests (Fig. 3b and d), punctures and thinning of the external layer can be observed, which indicates the presence of phenomena causing viability loss derived from the contact between MA and TCE. US tests (Fig. 3c and e) show

similar effects but in greater magnitude on the TCE morphology and viability.

3.4. TCE viability loss mechanism induced by MA

Based on the tests performed in the present work, a mechanism of mechanical–chemical stress is proposed for the TCE viability loss (Fig. 4). Such mechanism consists in both a mechanical effect and a chemical effect. In the case of the mechanical effect, the surface of the MA particles interacts with the TCE surface resulting in the generation of damages and rupture of the external layers. The damage caused to the external layers induces a partial viability loss of the affected TCE. When this damage is severe, leaking of the hyaline solution and even of the nuclear material occurs, which is lethal to the TCE. On the other hand, based on the US tests, it is possible to attribute TCE inactivation to the existence of chemical stress. Such effect could be the consequence of the metals contained in the MA, such as Ag, Cu, Zn, Ti, Fe, Al, among others, that have

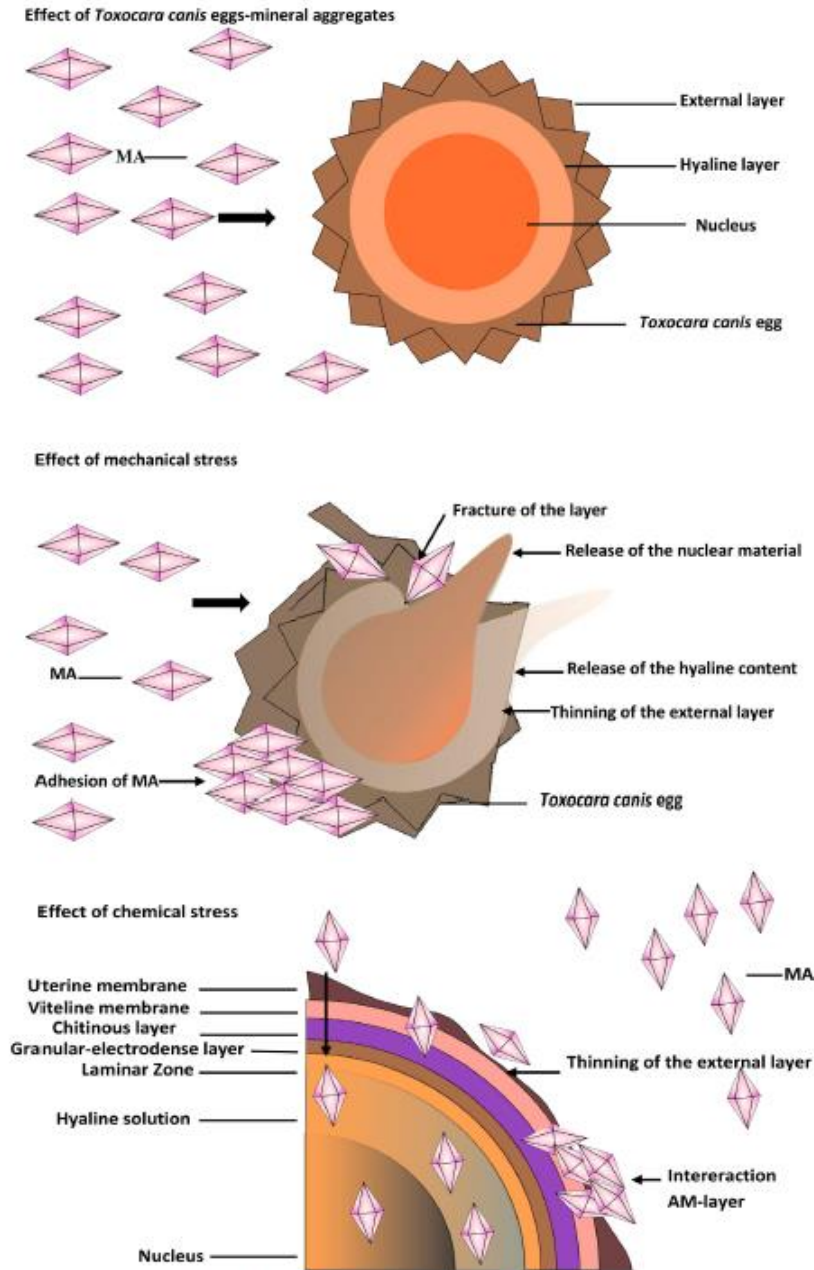


Fig. 4. Proposed mechanism for the inactivation of TCE induced by MA.

shown to be toxic on bacteria and fungi, as demonstrated by other studies (Solís-López et al., 2014; Miranda-Ríos et al., 2011; Dubas et al., 2006). The interaction among the metals, or their metallic compounds, in the MA and the TCE causes structural heterogeneity and thinning of the TCE layers, and thereby leads to viability loss. The damage produced by the MA on TCE, such as tears, fissures, rips, and abrasion of the layers in different degrees of severity, will impair the correct exchange regulation with the medium, the containment of the nuclear contents, the protection of the interior of the organism, and the structural integrity. On the other hand, due to the disruption of the intermembrane electron transfer, oxidation of the membrane components and blockage of chemical transport across membranes, the chemical damage will cause weakening and thinning of the membranes, thus allowing rupture and penetration through the cellular envelope (Fig. 2b). The penetration favors the input of chemicals into the egg, some of said chemicals may be reactive oxygen species, or heavy metal ions that usually cause physiological damage on living beings (Solís-López et al., 2014; Li et al., 2008), and presumably this also occurs in the TCE.

In order to produce treated wastewater useful for unrestricted irrigation according to WHO guidelines ($\leq 1 \text{ HEL}^{-1}$), a suitable disinfection of wastewater at the early stages of the treatment could be achieved by using MA as filter media in the secondary filter. Likewise, the use of MA can be seen as a novel alternative to the TCE inactivation in municipal wastewater treatment plants. This type of disinfectant has the following advantages: it is relatively easy to add it to the treatment process and it does not generate byproducts that require subsequent treatment. Also, its effectiveness could be comparable to disinfectant agents such as acids, phenols, O_3 and UV radiation. However, before recommending a widespread application, economic feasibility studies need to be conducted. Nevertheless, the alternative remains potentially interesting for developing countries.

4. Conclusion

MA were assessed as agents inducing viability loss on TCE. Results show, according to the assays performed, that this loss is progressive and is associated to the contact time, concentration and particle size of MA. Also, the tests showed that mineral aggregates are more effective against TCE when the particle size is smaller, and by increasing the concentration and contact times. In the NS tests, we observed that the TCE viability loss is attributable to chemical stress caused by the presence of elements with biocidal activity. On the other hand, the US tests produced data showing a synergy between the chemical and the mechanical stresses on the TCE viability loss. The latter could be associated to the morphology of the MA particles, and the effect of adhesion and abrasion on the external layer of the egg. Consequently, the TCE viability loss is caused by the combined mechanical–chemical damage produced by the MA, which eventually turns out irreparable for the organism. The most relevant aspects observed are the presence of ruptures, tears, and severe thinning of the external and internal layers, and the leakage of hyaline and nuclear material. Therefore, MA are seen as a novel alternative to the TCE inactivation in municipal wastewater.

Acknowledgements

We thank reviewers for insightful comments and suggestions for the improvement of the manuscript. We also want to thank for the economic support provided by Project UNAM/DGAPA PAPIIT IT103312 and PAIP (VMLP) 41-9414, CONACYT, Mexico grant (CVU 269374) received by RML for doctoral studies (Ph.D. studies) on Engineering in the PMyD at

UNAM. To the USAI of the Facultad de Química of the UNAM for the analytical support provided, and Luciano Hernández Gómez.

References

- Aguilár, P., Jiménez, B., Maya, C., Orta de Velásquez, T., Luna, V., 2006. Disinfection of sludge with high pathogenic content using silver and other compounds. *Water Sci. Technol.* 54, 179–187.
- Akao, N., Tsukidate, S., Kondo, K., Fujita, K., 1995. In vitro effects of benzalkonium-ion intercalated aluminium triphosphate on the second stage larvae and fertilized eggs of *Toxocara canis*. *Jpn. J. Parasitol.* 44, 138–142.
- Aladawi, M.A., Albarodi, H., Hammoudeh, A., Shamma, M., Sharabi, N., 2006. Accelerated larvae development of *Ascaris lumbricoides* eggs with ultraviolet radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 75, 115–119.
- ASTM, American Society for Testing and Materials, 1997. E1613-94 Standard Test Method for Analysis of Digested Samples for Lead by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES), Flame Atomic Absorption (FAAS), or Graphite Furnace Atomic Absorption (GFAAS) Techniques.
- Avramova, S., Dinev, D., Boeva, V., Dakova, A., Grigorova, M., Khadzharlarska, D., 1985. Study of the effect of some disinfectants on helminth ova. *Epidemiol. Mikrobiol. Infekt. Boles.* 22, 53–56.
- Ayçicek, H., Yarsan, E., Sarimehmetoglu, H.O., Tanyüksel, M., Girginkeleşler, N., Özyurt, M., 2001. Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. *Turk. J. Med. Sci.* 31, 35–39.
- Bandala, E.R., González, L., De La Hoz, F., Peláez, M.A., Dionysiou, D.D., Dunlop, P.S.M., Byrne, J.A., Sanchez, J.L., 2011. Application of zrO_2 dyes as dosimetric indicators for enhanced photocatalytic solar disinfection (ENPHOSODIS). *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 218, 185–191.
- Bandala, E.R., González, L., Sanchez-Salas, J.L., Castillo, J.H., 2012. Inactivation of *Ascaris* eggs in water using sequential solar driven photo-Fenton and free chlorine. *J. Water Health* 10, 20–30.
- De Souza, G.S.M.B., Rodrigues, L.A., de Oliveira, W.J., Chernicharo, C.A.L., Guimarães, M.P., Massara, C.L., Grossi, P.A., 2011. Disinfection of domestic effluents by gamma radiation: effects on the inactivation of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Water Res.* 45, 5523–5528.
- De Victorica, J., Galván, M., 2003. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantification/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater. *Water Res.* 37, 1278–1287.
- Dubas, S.T., Kumlanguudsana, P., Pottiyaraj, P., 2006. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 289, 105–109.
- Dubná, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovská, I., Vadlejch, J., Pekár, S., Fechtner, J., 2007. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 145, 120–128.
- Elchiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacaman, M.J., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnol.* 3, 1–10.
- Gadomska, K., Maleszewska, J., Krogulska, Wichrowska, B., 1991. Analysis of survival rate of *Ascaris suum* (Goeze, 1782) eggs and of *Escherichia coli* in ozone-disinfected water. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.* 39, 347–352.
- Guadagnini, R.A., dos Santos, L.U., Bueno, R.M., Guimarães, J.R., 2013. Inactivation of bacteria and helminth in wastewater treatment plant effluent using oxidation processes. *Water Sci. Technol.* 68, 1825–1829.
- Hablützel, A., Traldi, G., Ruggieri, S., Attili, A.R., Scuppa, P., Marchetti, R., Menghini, G., Esposito, F., 2003. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet. Parasitol.* 113, 243–252.
- Jiménez-Cisneros, B., 2008. Helminth ova control in wastewater and sludge for agricultural reuse. In: Grabow, W.O.K. (Ed.), *Water and Health. Encyclopedia of Life Support Systems*, vol. 1, pp. 5–13.
- Jiménez-Cisneros, B., Maya-Rendon, C., 2007. Helminths and sanitation. *Commun. Curr. Res. Educ. Top Trends Appl. Microbiol.* 52, 60–71.
- Jiménez, B., Wang, L., 2006. In: Ujang, Z., Henze, M. (Eds.), Chapter 10 in *Municipal Wastewater Management in Developing Countries: Principles and Engineering*. International Water Association Publishing, London, UK, pp. 237–292.
- Kozan, E., Gonenc, B., Sarimehmetoglu, O., Ayçicek, H., 2005. Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control* 16, 239–242.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Alvarez, P.J.J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 42, 4591–4602.
- Liu, R., Wu, H.S., Yeh, R., Lee, C.Y., Hung, Y., 2012. Synthesis and bactericidal ability of TiO_2 and Ag- TiO_2 prepared by coprecipitation method. *Int. J. Photoenergy* 2012, 1–7.
- Maya, C., Torner-Morales, F.J., Lucario, E.S., Hernández, E., Jiménez, B., 2012. Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. *Water Res.* 46, 4770–4782.
- Mengelle-López, J.J., Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., González-Partida, E., Camprubi, A., 2013. Secuencia vulcano-sedimentaria La Esperanza (Cretácico inferior) al norte de Guanajuato, México: importancia en la exploración de sulfuros masivos vulcanogénicos. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 65, 511–525.
- Miranda-Ríos, M., Luna-Pabelló, V.M., Orta de Velásquez, M.T., Barrera-Godínez, J.A., 2011. Removal of *Escherichia coli* from biological effluents using natural and artificial mineral aggregates. *Water SA* 37, 213–220.

- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353.
- Mun, S., Cho, S.H., Kim, T.S., Oh, B.T., Yoon, J., 2009. Inactivation of *Ascaris* eggs in soil by microwave treatment compared to UV and ozone treatment. *Chemosphere* 77, 285–290.
- Oaks, J.A., Kayes, S.G., 1979. Artificial hatching and culture of *Toxocara canis* second stage larvae. *J. Parasitol.* 65, 969–970.
- Orta de Velásquez, M.T., Martínez, J.L., Monje-Ramírez, I., Rojas-Valencia, M.N., 2004. Destruction of helminth (*Ascaris suum*) eggs by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 26, 359–366.
- Panacek, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T.J., Zboril, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem.* 110 (33), 16248–16253.
- Papale, J., Nieves-García, M.N., Torres, M., Berné, Y., Dellan, G., Rodríguez, D., Mendoza, N., 2008. Anemia, deficiencias de hierro y de vitamina A y helmintiasis en una población rural del estado Lara. *An. Venez. Nutr.* 21, 70–76.
- Pecson, B.M., Barrios, J.A., Jiménez, B.E., Nelson, K.L., 2007. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Res.* 41, 2893–2902.
- Rivera-Garza, M., Olguín, M.T., García-Sosa, I., Alcántara, D., Rodríguez-Fuentes, G., 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous Mesoporous Mater.* 39, 431–444.
- Rodríguez, M.D.L.F., Duménilo-Ripoll, B.E., Brito-Alberto, E., Aguilar-Sotelo, J., 2006. *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and syndrome larva Migrans Visceralis). *Rev. Electrón. Vet. REDVET* VII, 1–42.
- Rojas-Valencia, M.N., Orta-De-Velásquez, M.T., Vaca-Mier, M., Franco, V., 2004. Ozonation by-products issued from the destruction of microorganisms present in wastewaters treated for reuse. *Water Sci. Technol.* 50, 187–193.
- Rojas-Valencia, M.N., 2011. Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Microbiology Book Series-Number 3, vol. 1. FORMATEX, Spain, pp. 263–271.
- Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttgupta, S.P., Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 4, 707–716.
- Shalaby, H.A., Abdel-Shafy, S., Ashry, H.M., El-Moghazy, F.M., 2011. Efficacy of hydrogen peroxide and dihydroxy benzol mixture (disinfectant) on *Toxocara canis* eggs. *Res. J. Parasitol.* 6, 144–150.
- Sobsey, M.D., 2002. Managing water in the home: accelerated health gains from improved water supply. *World Health* 8, 1–83.
- Solís-López, M., Durán-Moreno, A., Rigas, F., Morales, A.A., Navarrete, M., Ramírez-Zamora, R.M., 2014. Assessment of copper slag as a sustainable Fenton-type photocatalyst for water disinfection. *Water Reclam. Sustain.*, 199–227.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177–182.
- Vinnerås, B., Holmqvist, A., Bagge, E., Albihn, A., Jönsson, H., 2003. The potential for disinfection of separated faecal matter by urea and by peracetic acid for hygienic nutrient recycling. *Bioresour. Technol.* 89, 155–161.
- Wang, H., Wick, R.L., Xing, B., 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollut.* 157, 1171–1177.
- WHO, 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Vol. 2. Wastewater Use in Agriculture. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Patente 349668 otorgada por el IMPI, titulada: Sistema móvil de flujo ascendente y descendente para depurar aguas contaminadas de materia orgánica, microorganismos patógenos y parásitos, septiembre de 2017.



TÍTULO DE PATENTE No. 349668

Titular(es): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Domicilio: 9° Piso de la Torre de Rectoría S/N, Ciudad Universitaria, 04510, Coyoacán, Distrito Federal, MÉXICO

Denominación: SISTEMA MÓVIL DE FLUJO ASCENDENTE Y DESCENDENTE PARA DEPURAR AGUAS CONTAMINADAS CON MATERIA ORGÁNICA, MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y PARASITARIOS.

Clasificación: CIP: C02F11/02; C02F3/22
CPC: C02F9/005; C02F1/001; C02F2101/30; C02F2201/002; C02F2201/007

Inventor(es): VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO; SERGIO ABURTO CASTAÑEDA; RAFAEL MÁGANA LÓPEZ; JORGE OJEDA MEJÍA; EDGAR ORTIZ GARCÍA; JUAN BENJAMÍN SEGURA MIRANDA; MANUEL SACRISTÁN DE ALVA

SOLICITUD

Número: MX/a/2012/013543 **Fecha de Presentación:** 22 de Noviembre de 2012 **Hora:** 11:21

Vigencia: Veinte años
Fecha de Vencimiento: 22 de noviembre de 2032
Fecha de Expedición: 27 de julio de 2017

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1°, 2° fracción I, 6° fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6° fracciones III y 7° bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1°, 3° fracción V inciso a), 4° y 12° fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1°, 3°, 4°, 5° fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1°, 3° y 5° inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES
NAHANNY CANAL REYES

 Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695|MX/2017/64281|MX/a/2012/013543|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(6)
1|XBUS+2gc9MZ5Cub4Wsn147qZPCI-

Sello Digital:
Bm779C46MhlnWpIoM2v0ZCu7EwtQV5FBrUoCGNH7UUI1R4UApVgddW+Z3a3Rdvn8C9Lpn8HxupLp3r8dBX
smqWQD9JfShkpg6bSbrW9XLLX8kq9H8OeUtkuBmCoPZEF22kGmxCiHC32Be0rspHCTESAdbHux09Y+a84loHTJ6
e62Ux84gk4pJUN7Jd96F7X6ebPgryLLACRH2acJkw9u0XqLN3M23J6TuZGXC2sRmlLwDuAXWHEv70Xj8gJIS
BDkfaH7Rpf+u+mlM28LTONZWC0IAEdgvAm5ZRloLvsrmu/Cu/1IGmpaquNMqpBWI7GK97+g--

Arenal No. 560, Piso 1, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020,
Ciudad de México.
(55)53340700 www.gob.mx/impi



“@ [=g3,8d] \&fbb=-q] /hK%fg” + DEL