



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA

***Cryptosporidium* en la Desinfección Solar**
del Agua de Bebida

MEMORIA que para optar al
Grado de Doctora en Farmacia presenta

María Fontán Sainz

Santiago de Compostela, 2011

M^a Elvira Ares Mazás, Profesora Titular de Parasitología, e Hipólito Gómez Couso, investigador contratado con cargo al Programa Ángeles Alvariño, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación titulado "***Cryptosporidium* en la desinfección solar del agua de bebida**", que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. María Fontán Sainz para optar al Grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Parasitología de este Departamento y, hallándose concluido, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 21 de diciembre de 2011.

Fdo. M^a Elvira Ares Mazás

Fdo. Hipólito Gómez Couso

Jesús López Romalde, Catedrático de Microbiología y Secretario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "***Cryptosporidium* en la desinfección solar del agua de bebida**", que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. María Fontán Sainz para optar al Grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizado bajo la dirección de la Prof. Dra. Dña. M^a Elvira Ares Mazás y del Dr. D. Hipólito Gómez Couso en el Laboratorio de Parasitología de este Departamento.

Y para que así conste y a los efectos oportunos expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 21 de diciembre de 2011.

Fdo. Jesús López Romalde

Mensaje del Secretario General de las Naciones Unidas Kofi Annan con motivo de la celebración del Día Mundial del Agua en el año 2001:

"Access to safe water is a fundamental human need and, therefore, a basic human right. Contaminated water jeopardises both physical and social health of all people. It is an affront to human dignity."

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Estas palabras de agradecimiento quisiera que comenzasen con un "Gracias" para los que han hecho posible que esta Tesis sea una realidad, por su exquisito celo y extraordinaria calidad profesional, he podido aprender de los mejores, de mis directores: la Dra. Dña. Elvira Ares Mazás y el Dr. D. Hipólito Gómez Couso. Muchas gracias por las oportunidades que me habéis brindado, la comprensión ofrecida, y el tiempo dedicado; por todo ello me llevo un bagaje profesional y personal muy importantes.

De esta forma, también deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han colaborado de forma directa o indirecta en la realización del presente trabajo y en especial:

Al Dr. D. Kevin McGuigan, Profesor del *Royal College of Surgeons in Ireland* (Dublín), por el asesoramiento prestado en los estudios realizados bajo condiciones simuladas de radiación solar.

Al Dr. D. Fernando Gil Sotres, Catedrático del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela, por su ayuda y asistencia en los análisis del suelo rojo y de las aguas turbias.

Al Dr. D. José Antonio Castro Hermida, por su constante disponibilidad y cooperación en la tarea de recogida de muestras, de las que pudimos obtener los aislados ooquísticos de *Cryptosporidium parvum* que han sido empleados en los diversos estudios de la presente Tesis Doctoral.

A la Dra. Dña. Pilar Fernández Ibáñez, de la Plataforma Solar de Almería, tanto por su colaboración y ayuda prestadas, como por sus consejos, tan necesarios para la consecución de este trabajo. Asimismo, también me gustaría agradecer la colaboración y amabilidad de Inma durante la realización de los estudios realizados en estas instalaciones. A todos los restantes miembros de la Plataforma Solar de Almería y especialmente a Agustín, por sus brillantes consejos, su entregada disposición y colaboración y por todo el cariño que siempre transmite.

Al Dr. D. Manuel Félix Camiña Darriba, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de esta Universidad, por el asesoramiento y guía en diversos estudios bioquímicos, así como por el tiempo que me ha dedicado en la instrucción acerca del manejo e interpretación de diversas técnicas instrumentales.

A Carmela y Estrella, agradecerles su amabilidad y desinteresada, pero importante colaboración, en la realización de ciertos ensayos.

Me gustaría manifestar el especial afecto que le guardo a cada uno de mis compañeros, con los que he podido coincidir a lo largo de esta experiencia; su compañerismo, apoyo y colaboración han sido imprescindibles. En particular, me gustaría nombrar a Marta, por regalarme su cariño y amistad en mis peores momentos. Igualmente al resto de compañeros y profesores del Departamento, por todos los instantes compartidos.

A mis amigos, a los que les debo tanto y de los que me siento especialmente orgullosa, porque han sabido animarme constantemente. No puedo dejar de citar a Esther y a Lucía porque con ellas he conocido el verdadero significado de la palabra "amistad". Gracias por vuestro cariño incondicional.

Finalmente, quisiera dedicarle estas últimas líneas a los que para mí son los primeros en mi día a día, a los que me dan aliento incesantemente, a los que creen en mí más que yo y en resumen a los que me quieren y apoyan siempre y en todo momento, mi familia y en especial a mi madre, padre y hermano por formar juntos el mejor equipo: Gracias.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Proyecto de Investigación titulado *Solar disinfection as an appropriate household water treatment and storage (HWTS) intervention against childhood diarrhoeal disease in developing countries or emergency situations*, subvencionado por la Comisión Europea (FP6-INCO-CT-2006-031650-SODISWATER).

Durante su realización, Dña. María Fontán Sainz disfrutó de una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación en el Programa de Acceso "Plan de Mejora y Acceso de Grandes Instalaciones Científicas y Tecnológicas Singulares 2004-2007 (ref. ICTS-2007-14)" en la Plataforma Solar de Almería.

LOS RESULTADOS DE ESTA MEMORIA SE HAN PUBLICADO O SE ENCUENTRAN EN PROCESO DE PUBLICACIÓN, CONSTITUYENDO LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:

Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M.; Fernández-Alonso, J. y Ares-Mazás, E. 2009. Excystation of *Cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection. *Parasitology*, **136**: 393-399.

Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M.; McGuigan, K.G. y Ares-Mazás, E. 2009. Effect of the radiation intensity, water turbidity and exposure time on the survival of *Cryptosporidium* during simulated solar disinfection of drinking water. *Acta Tropica*, **112**: 43-48.

Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P. y Ares-Mazás, E. 2009. Efficacy of the solar water disinfection method in turbid waters experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under real field conditions. *Tropical Medicine and International Health*, **14**: 620-627.

Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M. y Ares-Mazás, E. 2010. Thermal contribution to the inactivation of *Cryptosporidium* in plastic bottles during solar water disinfection procedures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 35-39.

Fontán-Sainz, M.; Gómez-Couso, H.; Fernández-Ibáñez, P. y Ares-Mazás, E. 2011. Evaluation of the solar water disinfection process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* using a 25-L static solar reactor fitted with a compound parabolic collector (CPC). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (en prensa).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. TRATAMIENTO DEL AGUA DE BEBIDA A NIVEL DOMICILIARIO EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO	9
2. EL MÉTODO SODIS.....	14
2.1. Breve reseña histórica.....	14
2.2. Aspectos técnicos de la desinfección solar del agua de bebida	15
2.3. ¿Dónde se puede aplicar el método SODIS?	16
2.4. Procedimiento de aplicación del método SODIS	18
2.5. Factores limitantes de la eficacia del método SODIS	19
2.6. El empleo del método SODIS y su impacto en la salud	20
2.7. Mejoras tecnológicas del método SODIS.....	24
2.7.1. Colectores solares: concentradores parabólicos compuestos (CPC).....	24
2.7.2. Procesos de oxidación avanzados.....	26
3. LA CRYPTOSPORIDIOSIS.....	29
3.1. El agente etiológico y su biología	30
3.2. Consideraciones epidemiológicas	34
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.....	43
1.1. Obtención de los aislados ooquisticos.....	43
1.2. Caracterización molecular.....	44
1.2.1. Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)	44
1.2.2. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
1.2.3. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (técnica de RFLP)	45
1.2.4. Secuenciación del ADN	46
1.3. Determinación de la viabilidad ooquistica.....	46
1.3.1. Técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico yoduro de propidio (IP).....	46
1.3.2. Valoración del desenquistamiento espontáneo	47
1.3.3. Cálculo de la viabilidad global.....	47

1.3.4. Técnica de desenquistamiento inducido	48
1.3.5. Bioensayos en ratón	48
2. AGUAS TURBIAS.....	49
3. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> EN CONDICIONES SIMULADAS DE RADIACIÓN SOLAR	50
3.1. Diseño experimental.....	51
3.2. Evaluación de la supervivencia ooquística.....	52
4. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> UTILIZANDO BOTELLAS PET.....	52
4.1. Evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar.....	53
4.2. Evaluación del efecto óptico de la radiación solar	54
4.3. Evaluación del efecto térmico de la radiación solar	54
4.4. Análisis estadístico	55
5. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> UTILIZANDO REACTORES SOLARES EQUIPADOS CON CPC.....	55
5.1. Evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC	55
5.2. Evaluación de un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC.....	57
5.3. Análisis estadístico	57
6. RESISTENCIA DE LOS OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> A TEMPERATURAS ALCANZABLES EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN SOLAR DEL AGUA	58
7. APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS EN LA DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i>	59
7.1. Empleo del fotocatalizador TiO ₂	59
7.2. Empleo del oxidante H ₂ O ₂	60
7.2.1. En condiciones naturales de radiación solar	60
7.2.2. En condiciones simuladas de radiación solar	61
7.3. Análisis estadístico	61
RESULTADOS	67
1. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> EN CONDICIONES SIMULADAS DE RADIACIÓN SOLAR	69
2. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> UTILIZANDO BOTELLAS PET.....	76
2.1. Resultados de la evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar.....	76
2.2. Resultados de la evaluación del efecto óptico de la radiación solar.....	79

2.3. Resultados de la evaluación del efecto térmico de la radiación solar	80
2.4. Estudio comparativo del efecto conjunto e independiente de los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la supervivencia de los ooquistes de <i>C. parvum</i>	83
3. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> UTILIZANDO REACTORES SOLARES EQUIPADOS CON CPC	85
3.1. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC	85
3.1.1. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1	85
3.1.2. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1,89.....	88
3.2. Resultados de la evaluación de un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC	92
3.3. Estudio comparativo de la eficacia de distintos reactores solares en la inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i>	96
4. RESISTENCIA DE LOS OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i> A TEMPERATURAS ALCANZABLES EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN SOLAR DEL AGUA	96
5. APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS EN LA DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE <i>C. PARVUM</i>	100
5.1. Resultados del empleo del fotocatalizador TiO ₂	100
5.2. Resultados del empleo del oxidante H ₂ O ₂	104
5.2.1. En condiciones naturales de radiación solar	104
5.2.2. En condiciones simuladas de radiación solar	108
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
RESUMEN	163
APÉNDICE	171

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BOE	Boletín Oficial del Estado
CAWST	<i>Centre for Affordable Water and Sanitation Technology</i>
cowp	Proteína de la pared del ooquiste de <i>Cryptosporidium</i>
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CPC	Concentradores parabólicos compuestos
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EAWAG	Instituto Federal Suizo de Ciencia y Tecnología del Agua
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Factor de concentración
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBSS	Solución balanceada de Hanks
IFD	Inmunofluorescencia directa
INRESA	Asociación de Sistemas Integrados de Energía Rural
IP	Ioduro de propidio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tereftalato de polietileno
PSA	Plataforma Solar de Almería
pi	Post-inoculación
PVC	Cloruro de polivinilo
RFLP	Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
ROS	Especies de oxígeno altamente reactivas

SANDEC	Departamento del Agua y Saneamiento en Países en Vías de Desarrollo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SODIS	Desinfección solar del agua
UNF	Unidades nefelométricas de formacina
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
USC	Universidad de Santiago de Compostela
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV	Radiación ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
vs	Versus

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representativo de la población con acceso a agua potable (OMS/UNICEF, 2010). .3	.3
Figura 2. Principales enfermedades infecciosas responsables de altas tasas de mortalidad (OMS, 2007).....4	4
Figura 3. Clasificación de microorganismos patógenos en función de la resistencia que presentan a los desinfectantes (extraída de Rutala y Weber, 2004).....5	5
Figura 4. Mapa representativo de las regiones geográficas en las que la radiación solar incidente determina la aplicación del método SODIS. 18	18
Figura 5. Representación gráfica del procedimiento de aplicación del método SODIS (adaptado de Fundación SODIS, 2011)..... 19	19
Figura 6. Esquema de un CPC (extraído de Navntoft y col., 2008)..... 25	25
Figura 7. Diagrama de la radiación solar reflejada en los CPC (extraído de Fernández Ibáñez, 2003)..... 25	25
Figura 8. Representación esquemática del ciclo biológico de <i>C. parvum</i> (adaptado de Smith y Rose, 1998). 33	33
Figura 9. Rutas de transmisión de la cryptosporidiosis humana y animal. 35	35
Figura 10. Ilustración del material y de los métodos utilizados (I). 63	63
Figura 11. Ilustración del material y de los métodos utilizados (II). 65	65
Figura 12. Superficies de respuesta definidas por la Ec. 9 mostrando los efectos que sobre la potencial viabilidad de <i>C. parvum</i> (porcentaje de ooquistes IP negativos) tienen la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición cuando uno de estos factores se mantiene en el valor central del dominio ($V_c=0$)..... 74	74
Figura 13. Superficies de respuesta definidas por la Ec. 10 mostrando los efectos que sobre la infectividad de <i>C. parvum</i> tienen la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición cuando uno de estos factores se mantiene en el valor central del dominio ($V_c=0$). ... 75	75
Figura 14. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando botellas PET. 77	77
Figura 15. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural. 78	78

Figura 16. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural.	79
Figura 17. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con niveles de turbidez de 0 y 300 UNF contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural y a temperatura controlada (20-25 °C).....	80
Figura 18. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en función de los perfiles de temperatura media registrados en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural.....	81
Figura 19. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1.....	86
Figura 20. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1.....	86
Figura 21. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1 y expuestos a la radiación solar natural durante 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas en dos días consecutivos.	87
Figura 22. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89.....	90
Figura 23. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89.	90
Figura 24. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89 y expuestos a la radiación solar natural durante 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas en dos días consecutivos.	91
Figura 25. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando un reactor solar de 25 l equipado con un CPC.	94
Figura 26. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en un reactor solar de 25 l equipado con un CPC.	94

Figura 27. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en un reactor solar de 25 l equipado con un CPC y expuesto a la radiación solar natural durante 8 horas.	95
Figura 28. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> cuando se exponen a temperaturas alcanzables en los procesos de desinfección solar del agua durante periodos de 2; 4; 6; 8; 10; y 12 horas.....	99
Figura 29. Evolución de la infectividad y de la intensidad de infección de los ooquistes de <i>C. parvum</i> tras 12 horas de exposición a temperaturas alcanzables en los procesos de desinfección solar del agua.....	100
Figura 30. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO ₂	102
Figura 31. Perfiles de temperatura media registrados en aguas contenidas en reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO ₂ . .	102
Figura 32. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas contenidas en reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO ₂ y expuestos a la radiación solar natural.	103
Figura 33. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i> utilizando reactores de 500 ml en presencia/ausencia del oxidante H ₂ O ₂	105
Figura 34. Perfiles de temperatura media registrados en el interior de reactores solares durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar el empleo del H ₂ O ₂ en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i>	106
Figura 35. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar su empleo en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i>	106
Figura 36. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas contenidas en reactores solares de 500 ml durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar el empleo del H ₂ O ₂ en la desinfección solar de aguas.	107
Figura 37. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ durante los ensayos realizados en condiciones simuladas de radiación solar para evaluar su empleo en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de <i>C. parvum</i>	109

Figura 38. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas contenidas en reactores solares de 25 ml durante los ensayos realizados en condiciones simuladas de radiación solar para evaluar el empleo del H ₂ O ₂ en la desinfección solar de aguas.	111
Figura 39. Efecto del H ₂ O ₂ sobre el desenquistamiento inducido de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en condiciones simuladas de radiación solar.	112
Figura 40. Efecto del H ₂ O ₂ sobre la infectividad de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en condiciones simuladas de radiación solar.	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación actual de países y número de usuarios del método SODIS (obtenida de EAWAG, 2011; Fundación SODIS, 2011).	17
Tabla 2. Relación de microorganismos evaluados en la desinfección solar del agua bajo condiciones simuladas o naturales de radiación solar.	21
Tabla 3. Especies del género <i>Cryptosporidium</i> actualmente reconocidas.	31
Tabla 4. Estudios de prevalencia de la cryptosporidiosis en poblaciones humanas de países en vías de desarrollo.	38
Tabla 5. Análisis edafológico del suelo rojo recogido en Níjar, Almería.	49
Tabla 6. Análisis fisicoquímico de las muestras de agua con diferentes niveles de turbidez preparadas con el suelo rojo recogido en Níjar, Almería.	50
Tabla 7. Valores experimentales y codificados de las tres variables investigadas.	51
Tabla 8. Influencia de la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la supervivencia de los ooquistes de <i>C. parvum</i> bajo condiciones simuladas de radiación solar.	71
Tabla 9. Efectos combinados de la turbidez, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la potencial viabilidad de los ooquistes de <i>C. parvum</i> evaluada mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP.	72
Tabla 10. Efectos combinados de la turbidez, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la infectividad de los ooquistes de <i>C. parvum</i> evaluada mediante bioensayos en ratón.	73
Tabla 11. Resultados de la simulación de los perfiles de temperatura media registrados en el interior de las botellas PET sobre la supervivencia de los ooquistes de <i>C. parvum</i>	82
Tabla 12. Resultados del estudio comparativo de los efectos conjunto e independiente de los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la viabilidad de los ooquistes de <i>C. parvum</i>	84
Tabla 13. Resultados del estudio comparativo de la eficacia de distintos reactores solares en la inactivación de los ooquistes de <i>C. parvum</i> en aguas con diferentes niveles de turbidez expuestas a la radiación solar natural.	97

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

A principios de los años setenta y como resultado de un amplio estudio realizado en el este de África sobre los sistemas de abastecimiento de agua de bebida a nivel domiciliario, se estimó que aproximadamente unos 950 millones de personas, en aquel momento una cuarta parte de la población mundial, no disponían de suministros de agua de bebida adecuados y seguros (White y col., 1972). Desde entonces, se han realizado numerosos esfuerzos con el fin de resolver esta situación, evidentemente relacionada con condiciones de pobreza. Las Naciones Unidas designaron la década de los ochenta como *Década Internacional del abastecimiento y saneamiento del agua de bebida* y plantearon, como uno de los objetivos del presente milenio, reducir a la mitad el número de personas que carecen de acceso sostenible a agua potable y de servicios básicos de saneamiento para el año 2015 (Naciones Unidas, 2000). Sin embargo, en la actualidad 884 millones de personas todavía no tienen acceso a fuentes mejoradas de agua de bebida, localizándose un 84% de esta población en zonas rurales (Figura 1). Además, 2600 millones de personas no disponen de servicios de saneamiento (OMS/UNICEF, 2010).

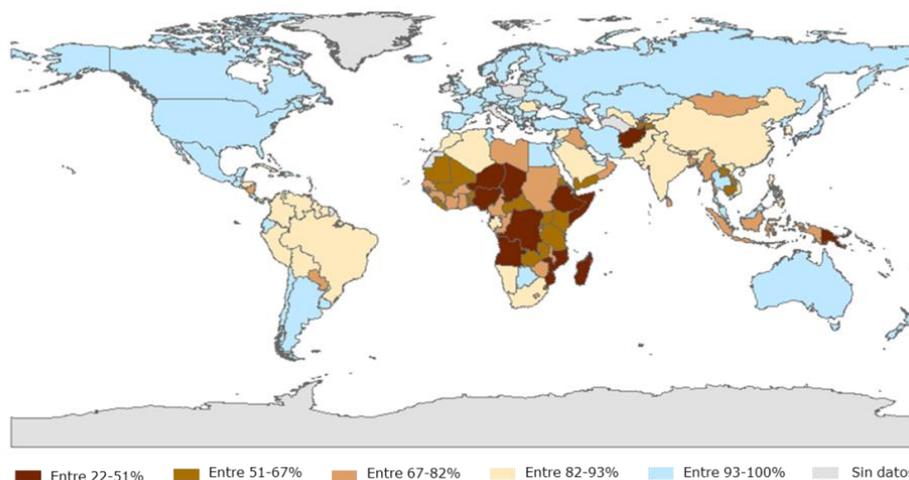


Figura 1. Mapa representativo de la población con acceso a agua potable (OMS/UNICEF, 2010).

Como consecuencia de la ausencia de abastecimientos de agua de bebida y de servicios de saneamiento adecuados, las enfermedades de transmisión hídrica representan uno de los problemas más importantes de salud pública en los países en vías de desarrollo. Las enfermedades diarreicas de etiología infecciosa se encuentran dentro del grupo de enfermedades de origen infeccioso que ocasionan mayor morbilidad y mortalidad. Anualmente y a nivel mundial, se estiman del orden de 4000 millones de casos de enfermedad diarreica que originan 1,8 millones de muertes (Figura 2). La diarrea incide

especialmente en la población infantil y además de la elevada mortalidad que ocasiona (1,5 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años) constituye una causa de malnutrición, repercutiendo en el desarrollo físico e incrementando la susceptibilidad a otras infecciones (OMS, 2007).

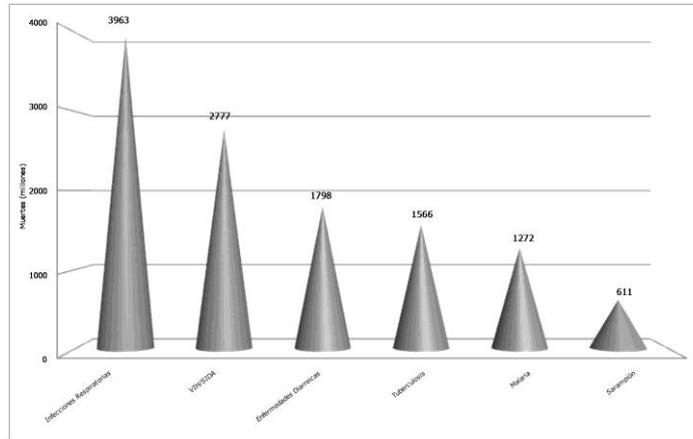


Figura 2. Principales enfermedades infecciosas responsables de altas tasas de mortalidad (OMS, 2007).

Los microorganismos patógenos transmitidos por el agua son predominantemente de origen fecal. Entre los principales enteropatógenos que afectan a la población infantil de los países en vías de desarrollo destacan: *Aeromonas* spp., *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* enterotoxigénico y enteropatógeno, rotavirus, *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae* O1/O139. Todos ellos, excepto *C. parvum*, son fácilmente controlables por cloración, aunque la recontaminación del agua tratada es un importante problema añadido (Ashbolt, 2004).

Cryptosporidium es un género de protozoos parásitos que ocasionan la cryptosporidiosis, una enfermedad diarreica autolimitada en personas inmunocompetentes pero que puede cronificarse y ser mortal en enfermos inmunocomprometidos. Desde que se reconoció su transmisión hídrica (D'Antonio y col., 1985), se han descrito a nivel mundial numerosos brotes de infección relacionados con el consumo de agua de bebida, destacando por su magnitud el ocurrido en Milwaukee (Estados Unidos) en 1993 y que afectó en torno a 403000 personas (Mac Kenzie y col., 1994). En la actualidad no existe un tratamiento totalmente eficaz frente a la enfermedad (Thompson y col., 2005) y *Cryptosporidium* está considerado como uno de los microorganismos más resistentes a los desinfectantes habitualmente empleados (Figura 3) (Rutala y Weber, 2004). Recientemente y junto con *C. jejuni* y rotavirus, *Cryptosporidium* ha sido seleccionado como uno de los patógenos de

referencia para la evaluación de los métodos de tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario (OMS, 2011).

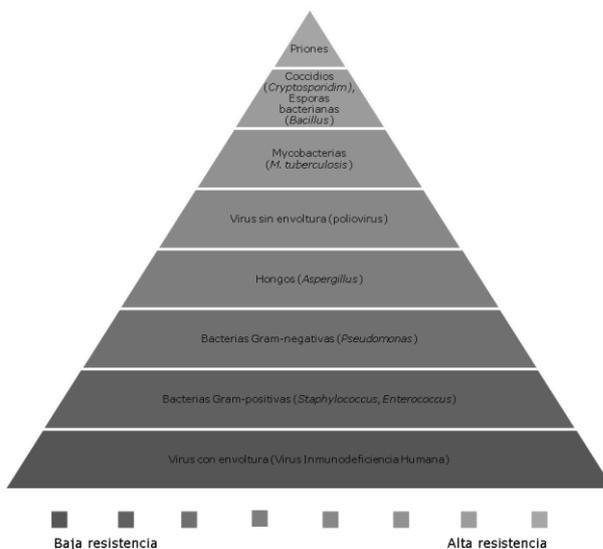


Figura 3. Clasificación de microorganismos patógenos en función de la resistencia que presentan a los desinfectantes (extraída de Rutala y Weber, 2004).

La dramática situación que representa la ausencia de agua potable reclama el desarrollo de un sistema económico y sencillo que permita tratar el agua de bebida. Una estrategia para abordar este problema consiste en el empleo de la radiación solar, un recurso abundante, gratis y renovable en la mayoría de los países en vías de desarrollo y cuya actividad bactericida es conocida desde hace más de un siglo (Downes y Blunt, 1877). La desinfección solar del agua (SODIS) es una solución simple, de bajo coste y ambientalmente sostenible para el tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario. El método consiste en rellenar botellas transparentes de plástico de tereftalato de polietileno (PET) con agua contaminada y exponerlas al sol durante un tiempo mínimo de 6 horas antes de su consumo. En la actualidad, varios millones de personas utilizan la técnica SODIS para mejorar la calidad microbiológica del agua de bebida (EAWAG, 2011). Además, y desde el año 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda su empleo en situaciones de emergencia (OMS/UNICEF, 2005).

El objetivo del presente trabajo de investigación es evaluar la eficacia del método SODIS y el empleo de nuevas tecnologías en la desinfección solar del agua de bebida, utilizando a *Cryptosporidium* como modelo de enteroparásito de transmisión hídrica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. TRATAMIENTO DEL AGUA DE BEBIDA A NIVEL DOMICILIARIO EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO

La OMS estima que un 94% de los casos de enfermedad diarreica registrados en los países en vías de desarrollo se pueden prevenir aumentando la disponibilidad de agua apta para el consumo y mejorando las condiciones de higiene y saneamiento. Con el fin de mejorar la calidad microbiológica del agua de bebida a nivel domiciliario, este organismo internacional recomienda el empleo de alguno de los siguientes métodos: i) la ebullición; ii) la cloración; iii) la filtración; iv) la floculación/desinfección; y v) el método SODIS. Todos ellos están comercializados, a excepción del primero y el último (OMS, 2007).

La ebullición, quizás el método más antiguo de desinfección del agua de bebida a nivel domiciliario (Sobsey, 2002), es también uno de los más efectivos si se aplica correctamente, ya que destruye o inactiva todas las clases de patógenos hídricos, incluyendo esporas bacterianas y quistes de protozoos, formas altamente resistentes a los desinfectantes químicos (Block, 2001). Además, mientras que otros métodos pueden estar influidos por la turbidez del agua y la presencia de ciertos compuestos químicos, estas condiciones no afectan a la eficacia de la ebullición. Se estima que más de 350 millones de personas lo utilizan a nivel mundial, aunque su práctica se restringe a ciertas regiones geográficas. Así, se calcula que un 4,9% de las poblaciones rurales pertenecientes a 17 países de África lo emplean para tratar el agua de bebida. Porcentajes superiores se estiman en Latinoamérica y en países del Caribe (20,4%), en el sudeste de Asia (21,2%), en Centroeuropa (34,8%) y en la región del Pacífico Oeste (68,3%) (Clasen, 2009). Sin embargo, la ebullición presenta una serie de desventajas que pueden limitar su aplicación como método rutinario para el tratamiento del agua de bebida: i) la no disponibilidad y el elevado coste del combustible; ii) el empleo de madera, carbón u otro tipo de biomasa como fuente de energía, cuya obtención no sólo contribuye a la deforestación (se estima que un kilo de madera es necesario para hervir un litro de agua) sino que requiere una inversión en tiempo y energía (Davis y Lambert, 2002); y iii) el riesgo que para la salud puede suponer la generación de emisiones tóxicas como consecuencia de su aplicación en el interior de las casas, generalmente cerradas o con escasa ventilación (Rehfuss y col., 2006).

La capacidad de los desinfectantes químicos para inactivar patógenos presentes en el agua y reducir de esta forma la transmisión de enfermedades infecciosas ha sido conocida desde la comprobación de la teoría microbiana de la enfermedad a mediados del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta finales de este siglo y principios del siglo XX cuando se reconoció

al cloro como un desinfectante eficaz, práctico y asequible, siendo, actualmente, el agente más utilizado en la desinfección del agua de bebida ya que presenta una elevada eficacia frente a la práctica totalidad de patógenos hídricos, con la excepción de *Cryptosporidium* spp. y *Mycobacterium* spp. (Sobsey, 1989).

En países en vías de desarrollo y para el tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario, la especie química más utilizada es el hipoclorito sódico por su mayor facilidad de almacenamiento y dosificación. Numerosos estudios han demostrado que la cloración, junto con el almacenamiento del agua en recipientes especiales que disminuyen el riesgo de contaminación externa, mejora significativamente la calidad microbiológica del agua y disminuye la incidencia de enfermedades diarreicas en aproximadamente un 20-40% (Sobsey, 2002). Una alternativa al hipoclorito sódico son las tabletas de dicloroisocianurato sódico, ampliamente utilizadas desde hace décadas en la desinfección de agua a nivel industrial, comercial, doméstico e incluso recreacional. A partir de los años ochenta, estos comprimidos efervescentes se utilizan en situaciones de emergencia, y, desde el año 2004 y previa revisión por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han establecido su empleo rutinario en el tratamiento del agua de bebida al presentar ciertas ventajas en términos de seguridad, vida media, coste y facilidad de aplicación (OMS, 2004; Clasen y Edmondson, 2006). Estudios de campo demostraron que estas tabletas son bien aceptadas por la población y que mejoran la calidad microbiológica del agua de bebida (Clasen y col., 2007). Sin embargo, en un reciente estudio sobre el impacto en la salud derivado del empleo de estas tabletas y de sistemas de almacenamiento del agua de bebida realizado en una zona periurbana de Ghana, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de población que utilizó el desinfectante y el grupo control, a pesar de que el tratamiento con dicloroisocianurato sódico mejoró sustancialmente la calidad microbiológica del agua de bebida. Los autores sugieren que la ausencia de beneficios en la salud pudo deberse, entre otras causas, a la utilización del sistema de almacenamiento de agua o a una incidencia de las enfermedades diarreicas de etiología infecciosa menor a la esperada durante el periodo de estudio (Jain y col., 2010).

La filtración es otra metodología antigua y ampliamente utilizada que elimina partículas en suspensión y al menos algunos microorganismos presentes en el agua. La eficacia de estos métodos en la reducción de los microorganismos varía ampliamente, dependiendo del tipo de microorganismo y de la naturaleza y la calidad del medio filtrante o sistema utilizado, ya que a menudo influyen factores locales. Existen una gran variedad de medios y procesos de filtración para el tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario. De todos ellos, los más utilizados son los filtros de cerámica y los filtros biológicos de arena (Sobsey, 2002).

Los filtros de cerámica, utilizados ya desde la antigüedad y citados por Aristóteles (384-322 a. C.), tal como hoy los conocemos datan del siglo XVIII (Baker, 1948). Los filtros pueden fabricarse localmente a partir de varios tipos de arcilla y materiales orgánicos, como serrín o cáscara de arroz. Estos materiales se mezclan y a continuación se da forma a una vasija que se deja secar y se somete a un proceso de cocción a distintas temperaturas con el fin de obtener tamaños de poro diferentes, consecuencia de la calcinación del material orgánico. Además, se les puede aplicar una solución coloidal de nitrato de plata para inactivar diversos patógenos, incluyendo bacterias y en menor medida virus (Lara y col., 2011), que pasan a través de los poros del filtro, o bien limitar el crecimiento bacteriano dentro del propio filtro (Bielefeldt y col., 2009). Las vasijas, una vez elaboradas, se asientan en recipientes de cerámica o material plástico de 20-30 litros de capacidad que disponen de un grifo en la parte inferior. El agua atraviesa el filtro por gravedad y cae en el recipiente inferior, del cual se toma para su uso. Se considera que existen dos mecanismos principales por los cuales se consigue reducir la contaminación microbiológica del agua. La filtración, tanto como resultado del tamaño de poro del propio filtro como de la capa de sedimentos que se van acumulando sobre el filtro, elimina microorganismos de mayor tamaño como protozoos y algunas bacterias. Además, ciertas bacterias y virus pueden ser eliminados mediante procesos de adsorción (Bielefeldt y col., 2009). Diversos estudios a escala de laboratorio, realizados con filtros de cerámica fabricados en diversos países en vías de desarrollo, han demostrado eficacias del 82-100% en la eliminación de patógenos hídricos. Sin embargo, en trabajos de campo se comprobó una menor eficacia en la filtración, e incluso, en algunos casos se observó una mayor contaminación en el agua tratada como consecuencia de un mantenimiento deficiente del sistema (Bielefeldt y col., 2009, 2010; Brown y Sobsey, 2010). No obstante, varios estudios en los que se evaluó el impacto en la salud han reportado una disminución en el desencadenamiento de procesos diarreicos en la población durante aquellos periodos en los que se utilizaron filtros de cerámica para el tratamiento del agua de bebida (Clasen y col., 2004, 2005, 2006; Brown y col., 2008; du Preez y col., 2008).

Por otra parte, los filtros biológicos de arena empleados en el tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario son una adaptación de los filtros lentos de arena utilizados durante más de un siglo en los sistemas de tratamiento de aguas (Hijnen y col., 2004). En la década de los noventa, el Dr. David Manz de la Universidad de Calgary desarrolló el primer filtro biológico de arena con el fin de mejorar la calidad del agua de bebida en comunidades rurales carentes de acceso a agua apta para el consumo (Lee, 1991; Manz y col., 1993). Desde entonces, numerosos grupos de población han optado por este sistema para mejorar la calidad microbiológica del agua de bebida en países en vías de desarrollo, estimándose en unos 200000 los suministrados en 70 países durante el año 2009 (CAWST,

2010). El sistema consiste en una cámara hueca de hormigón o plástico que se estrecha ligeramente en la parte inferior. En el fondo de la cámara existe una capa drenante de grava que se cubre con otra de separación constituida por gravilla y una lámina filtrante de arena. Aproximadamente, a unos 5 cm de la lámina de arena, existe un filtro difusor cuya finalidad es mantener intacta la superficie de la capa de arena cuando se adiciona agua al sistema. Consta también de un tubo de vaciado que recoge el agua del fondo de la cámara, la asciende verticalmente y la descarga en un recipiente exterior colocado a una altura comprendida entre el filtro difusor y el límite superior de la lámina de arena, permitiendo así el mantenimiento de una película de agua sobre su superficie que previene el secado de la lámina filtrante de arena. Durante un ciclo de 24 horas, y tras incorporar agua en la parte superior de la cámara (aproximadamente 20 l), la carga hidráulica empuja el agua hacia abajo a través de la capa de filtración de arena hasta llegar a la capa de drenaje de grava, donde es recogida por el tubo de salida y descargada en última instancia en el recipiente externo. El caudal disminuye a medida que desciende el nivel del agua en la cámara filtrante, cesando cuando se igualan ambos niveles. Debido a que la capa filtrante de arena permanece sumergida, en la parte superior de ésta y transcurrido un periodo de una a dos semanas, se desarrolla una zona biológicamente activa (1-2 cm) en donde los granos de arena se recubren de biofilm (CAWST, 2010).

Los microorganismos patógenos y partículas en suspensión presentes en el agua sometida a tratamiento se eliminan mediante una combinación de procesos físicos y biológicos que tienen lugar en la zona biológicamente activa de la lámina filtrante de arena: i) retención mecánica o filtración propiamente dicha, en la que los patógenos y partículas en suspensión se retienen en los espacios existentes entre los granos de arena; ii) depredación, los microorganismos presentes en la zona biológicamente activa se alimentan de otros presentes en el agua; iii) adsorción, los microorganismos se adhieren bien entre sí, o bien a las partículas en suspensión presentes en el agua y/o a los granos de arena; y iv) muerte natural, los microorganismos se mueren al no disponer de suficientes nutrientes y oxígeno para sobrevivir en la lámina filtrante de arena (CAWST, 2010).

Diferentes estudios realizados tanto en el laboratorio como en el campo demostraron una mejor calidad microbiológica del agua de bebida tras el empleo de este sistema de filtración. Así, se comprobó una reducción del 70,00-99,99% en las concentraciones bacterianas y víricas en función del estado de desarrollo del biofilm, el tiempo de muestreo y la especie de microorganismo analizada (Buzunis, 1995; Stauber y col., 2006; Baumgartner y col., 2007; Elliott y col., 2008). Además, estos sistemas consiguen eliminar el 100% de los quistes de *Giardia intestinalis* y el 99,88% de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Palmateer y col., 1999). Por otra parte, y como resultado de los estudios de evaluación de impacto en la salud realizados en la República Dominicana y en

Kenia, se estimó que la utilización de los filtros biológicos de arena reduce, al menos en un 20%, la frecuencia de enfermedad diarreica en todos los grupos de edad, incluyendo niños menores de 5 años (Stauber y col., 2006; Tiwari y col., 2009).

La combinación de procedimientos de coagulación/floculación, filtración y cloración se utiliza frecuentemente en los países industrializados para el tratamiento de aguas, especialmente de aguas superficiales, destinadas al consumo humano (LeChevallier y Au, 2004). Sin embargo, su introducción a nivel domiciliario es difícil debido a la complejidad de estos procesos. Hace aproximadamente dos décadas, se desarrollaron en Sudáfrica unas tabletas comerciales conteniendo cloro en forma de halazone o dicloroisocianurato sódico y agentes floculantes (sulfato de aluminio u otros agentes no especificados), que se evaluaron y promovieron para el tratamiento del agua a nivel comunitario o doméstico, así como también en situaciones de emergencia. Actualmente, estos productos están comercializados e indicados para tratar distintos volúmenes de agua en situaciones de emergencia, operaciones militares y actividades recreacionales, ya que reducen drásticamente la contaminación microbiológica (virus, bacterias y protozoos). Sin embargo, su empleo no está muy extendido en países en vías de desarrollo por lo que no existen estudios epidemiológicos sobre la eficacia de dichos sistemas en la reducción de las enfermedades diarreicas de transmisión hídrica (Kfir y col., 1989; Rodda y col., 1993; Powers y col., 1994). Desde 1995, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos y la compañía Protec & Gamble Co. (Cincinnati, Ohio, Estados Unidos) han colaborado estrechamente en el desarrollo y evaluación de estrategias con el fin de obtener agua de bebida segura de una forma económica y práctica en países en vías de desarrollo. Fruto de esta cooperación fue el desarrollo de un nuevo producto que incluye sulfato férrico como floculante e hipoclorito cálcico como desinfectante, reactivos comúnmente utilizados en las estaciones de tratamiento de aguas potables (PūR[®], Protec & Gamble Co.). Dicho producto se formuló para su uso individual en sobres de 4 g. El contenido del sobre se vierte sobre el agua a tratar (10 l) y se mezcla durante 5 minutos. A continuación, el agua se filtra a través de un tejido y se deja reposar durante 20 minutos, permitiendo así la acción desinfectante del hipoclorito cálcico antes de su consumo. Diversos estudios realizados a escala de laboratorio demostraron su alta eficacia no sólo en la eliminación de virus, bacterias y protozoos, sino también en la de metales pesados, además de mejorar el aspecto del agua al disminuir la turbidez de la misma (Rangel y col., 2003; Souter y col., 2003). Por otra parte, estudios de campo llevados a cabo en Guatemala, Kenia, Liberia y Pakistán demostraron que este método de floculación/desinfección reduce la incidencia de las enfermedades diarreicas en un porcentaje comprendido entre el 17-92%, tanto en adultos como en niños (Reller y col., 2003; Crump y col., 2004, 2005; Chiller y col., 2006; Doocy y Burnham, 2006).

2. EL MÉTODO SODIS

2.1. Breve reseña histórica

Textos griegos y sánscritos datados hace más de 6000 años incluyen recomendaciones sobre el empleo de la filtración, la ebullición y la exposición a la luz solar para mejorar el aspecto del agua de bebida (OMS, 2003). Sin embargo, la acción bactericida de la luz solar fue inicialmente descrita en 1877 por Downes y Blunt, quienes, de forma casual, observaron la ausencia de turbidez (consecuencia del crecimiento bacteriano) en soluciones acuosas azucaradas expuestas a la radiación solar en el alfeizar de una ventana, a diferencia de aquellas mantenidas alejadas de la claridad (Downes y Blunt, 1877). Un siglo más tarde, el profesor Aftim Acra, del Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad Americana de Beirut, llevó a cabo investigaciones específicas sobre la desinfección solar del agua en la década de los setenta. Junto con su equipo, Acra realizó estudios en condiciones naturales para evaluar el efecto de la radiación solar sobre la calidad del agua utilizada en la elaboración de soluciones orales de rehidratación. Entre sus hallazgos destacan la comprobación de que *E. coli* es más resistente a la luz solar que otras bacterias entéricas, siendo por tanto, un indicador útil para estas investigaciones, y el planteamiento de la hipótesis de que el efecto desinfectante del sol podría deberse a la radiación ultravioleta A (UV-A) (Acra y col., 1984).

Los trabajos de Acra y colaboradores alentaron a la Asociación de Sistemas Integrados de Energía Rural (INRESA), dependiente de la Universidad de las Naciones Unidas, a promover en 1985 un amplio programa para divulgar y desarrollar esta tecnología. En colaboración con diversas instituciones de Colombia, Egipto, Nigeria, Perú y Sri Lanka se llevaron a cabo estudios de campo, cuyos resultados y conclusiones se presentaron en un seminario celebrado en Montreal en 1988. Entre los principales hallazgos del proyecto destacan: i) la confirmación cualitativa de los resultados obtenidos por Acra y colaboradores; ii) la comprobación de que la desinfección solar del agua es efectiva si la intensidad de radiación solar supera los 500 W/m² durante 5 horas y siempre que la contaminación del agua no exceda de 1000 coliformes fecales/100 ml; y iii) la observación de que la temperatura del agua comprendida entre 12-40 °C no influye significativamente en la inactivación bacteriana (Lawand y col., 1988). Posteriormente, Acra y col. (1990) comprobaron una mayor resistencia de otros microorganismos a la radiación solar (*Streptococcus faecalis*); la influencia del origen y de la concentración bacteriana en la eficacia desinfectante; y la ausencia de crecimiento de fitoplancton en el interior de los contenedores utilizados en sus investigaciones.

En 1991, un equipo multidisciplinar del Instituto Federal Suizo de Ciencia y Tecnología del Agua (EAWAG), actualmente centro de referencia mundial del método SODIS, inició un amplio proyecto experimental y en condiciones de campo para evaluar la potencial aplicación de la técnica SODIS. Como resultado de las investigaciones realizadas se concluyó que la radiación UV-A es responsable de la inactivación de los microorganismos presentes en el agua y que una dosis de radiación de aproximadamente 2000 kJ/m² o de 555 W/m² es necesaria para lograr una reducción del crecimiento de *E. coli* en 3 unidades logarítmicas en agua a temperaturas de 20 y 40 °C. Además, la misma dosis de radiación reduce de forma similar al bacteriófago f2 y a una cepa de rotavirus, por lo que estos microorganismos pueden ser utilizados como indicadores de inactivación de bacterias y virus en el agua. También, se comprobó un fuerte efecto sinérgico entre la luz UV-A y la temperatura cuando ésta alcanza o supera los 50 °C, así como un efecto negativo a medida que aumenta la concentración de materia orgánica en suspensión (Wegelin y col., 1994).

Durante los años siguientes, el Departamento del Agua y Saneamiento en Países en Vías de Desarrollo (SANDEC) del EAWAG, estudió la aceptación sociocultural, la aplicabilidad y la posibilidad de financiación del método SODIS mediante proyectos de demostración en comunidades de Bolivia, Burkina Faso, China, Colombia, Indonesia, Tailandia y Togo. En el año 2005, la OMS recomendó el empleo del método SODIS en situaciones de emergencia (OMS/UNICEF, 2005) y, desde 2007, se incluye junto con la ebullición, la cloración, la filtración (filtros de cerámica/arena) y la floculación/desinfección entre los métodos aconsejados por la OMS para el tratamiento del agua de bebida a nivel domiciliario en países en vías de desarrollo (OMS, 2007). En la actualidad, el método SODIS ha sido introducido en 34 países y se estima en varios millones el número de personas que lo utilizan habitualmente para mejorar la calidad microbiológica del agua que consumen (Tabla 1) (EAWAG, 2011; Fundación SODIS, 2011).

2.2. Aspectos técnicos de la desinfección solar del agua de bebida

La desinfección solar del agua se basa en dos componentes de la luz solar: la radiación UV-A con efecto germicida y la radiación infrarroja que provoca una elevación de la temperatura generando un efecto de pasteurización cuando se alcanzan los 45-50 °C. La combinación de ambos efectos produce una sinergia que incrementa la eficacia del proceso (Wegelin y col., 1994).

La luz solar, en el más amplio sentido, es el espectro total de la radiación electromagnética proveniente del sol y puede ser dividido en cinco regiones en orden creciente de longitud de onda (Naylor y Farmer, 1995):

- UV-C (rango 100-280 nm), radiación que no alcanza la superficie terrestre al ser absorbida por el oxígeno y el ozono de la atmósfera.
- UV-B (rango 280-320 nm), radiación parcialmente absorbida por la capa de ozono, recibiendo la superficie terrestre un porcentaje mínimo que puede originar lesiones a nivel cutáneo.
- UV-A (rango 320-400 nm), radiación tradicionalmente considerada menos dañina, utilizándose en ciertos tratamientos estéticos y terapéuticos.
- Luz visible (rango 400-700 nm), radiación percibida por el ojo humano.
- Luz infrarroja (rango 700-10⁶ nm), se trata de la radiación responsable del calentamiento que proporciona el sol.

La radiación solar puede inactivar los microorganismos presentes en el agua mediante tres mecanismos: i) la radiación UV-A inhibe la replicación del ADN celular como consecuencia de la formación de dímeros de timina al inducir uniones covalentes entre bases adyacentes (Acra y col., 1984; Reed, 1997). Además, la reparación incorrecta de estos dímeros puede ocasionar mutaciones (Raven y Johnson, 1999); ii) la absorción de la radiación UV por la materia orgánica natural disuelta en el agua induce reacciones fotoquímicas que conducen a la formación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) como superóxidos (O_2^-), peróxidos (O_2^{-2}) y radicales hidroxilo (OH^-) que producen daños en los microorganismos debido a la oxidación de los componentes celulares (Stumm y Morgan, 1995; Reed, 1996 y 1997; McGuigan y col., 1998); y iii) el agua absorbe intensamente la radiación infrarroja generando un aumento de la temperatura que puede actuar desnaturalizando las proteínas y ser letal (Brock y col., 2000).

2.3. ¿Dónde se puede aplicar el método SODIS?

La eficacia de la técnica SODIS depende principalmente de la cantidad de luz solar disponible ya que la radiación solar se distribuye de manera irregular y su intensidad varía de una zona geográfica a otra en función de la latitud, la estación del año y la hora del día. La variación estacional depende de la latitud y es la principal responsable del clima de la región. Las zonas más próximas a la línea ecuatorial experimentan una menor variación anual en la intensidad de radiación que las regiones del hemisferio norte o sur. Además, la intensidad solar también está sujeta a variaciones diurnas como consecuencia de la posible nubosidad. Así, al aumentar ésta, la intensidad de la radiación solar disminuye, de tal forma que en un día completamente nublado se reduce prácticamente a un tercio de la intensidad registrada en días despejados. Además, las características topográficas pueden originar zonas microclimáticas con radiación solar y temperaturas insuficientes. De esta forma, ciertas áreas montañosas presentan a menudo y como consecuencia de la orografía, nubosidad abundante y bajas temperaturas (SANDEC, 2011).

Tabla 1. Relación actual de países y número de usuarios del método SODIS (obtenida de EAWAG, 2011; Fundación SODIS, 2011).

Zona geográfica	Número de usuarios^a	Número total de usuarios
Latinoamérica		775 000
Bolivia	300 000	
Brasil		
Ecuador	150 000	
El Salvador		
Guatemala	50 000	
Honduras	75 000	
Nicaragua	100 000	
Perú	100 000	
Asia		1 937 153
Bután	10 388	
Camboya	4 550	
Filipinas	29 605	
India	394 110	
Indonesia	180 000	
Nepal	139 530	
Pakistán	1 000 000	
Sri Lanka	10 740	
Uzbekistán	94 395	
Vietnam	73 835	
África		559 670
Angola	2 000	
Benín	100	
Burkina Faso	2 000	
Camerún	50 000	
Ghana	5 000	
Guinea	3 200	
Kenia	197 560	
República Democrática del Congo	50 000	
Senegal	25 000	
Sierra Leona	10 000	
Sudáfrica	10 810	
Tanzania	4 000	
República Togolesa	50 000	
Uganda	20 000	
Zambia	30 000	
Zimbabue	100 000	
Número total de usuarios del método SODIS		3 271 823

^a Se asumen cinco personas por domicilio.

Las regiones más favorables para aplicar el método SODIS se ubican entre las latitudes 15 y 35° N, así como 15 y 35° S. Estas zonas semiáridas se caracterizan por la gran cantidad de radiación solar que reciben debido a la escasa nubosidad y poca precipitación (menos de 250 mm de precipitación y generalmente más de 3000 horas anuales de luz solar). Otra zona favorable se encuentra entre las latitudes 15° N y 15° S. La cantidad de radiación es alta (unas 2500 horas anuales de luz solar) a pesar de la elevada humedad y frecuente cobertura nubosa de estas zonas. Es importante señalar que la mayoría de los países en vías de desarrollo se localizan entre las latitudes 35° N y 35° S (Figura 4) (SANDEC, 2011).

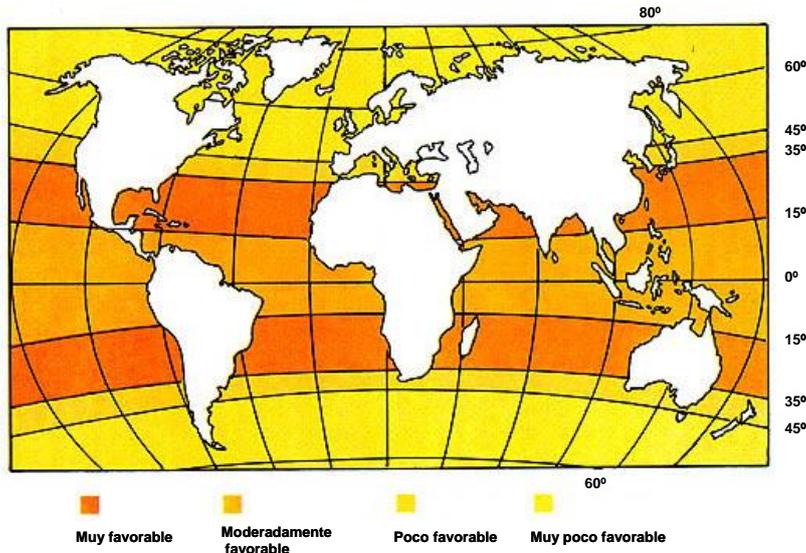


Figura 4. Mapa representativo de las regiones geográficas en las que la radiación solar incidente determina la aplicación del método SODIS.

2.4. Procedimiento de aplicación del método SODIS

El centro de referencia mundial del método SODIS recomienda seguir la siguiente pauta de actuación (Figura 5) (EAWAG, 2011):

- Verificar que las condiciones climáticas son adecuadas para la realización de la técnica SODIS.
- Disponer de botellas de plástico PET de hasta 2 l de capacidad. Idealmente deberían exponerse al sol al menos dos botellas por cada miembro de la familia, mientras que otras dos botellas deben estar preparadas para el consumo.
- Comprobar el estado del tapón y que las botellas sean herméticas.

- Elegir un soporte adecuado para exponer las botellas.
- El agua debe ser suficientemente clara [turbidez menor de 30 unidades nefelométricas (UNF)].
- Por lo menos dos miembros de la familia deben estar capacitados en la aplicación de la técnica SODIS, siendo uno de ellos responsable de exponer las botellas al sol.
- Reemplazar las botellas viejas o rayadas.
- Si la nubosidad es abundante, las botellas se deberán exponer durante dos días consecutivos.

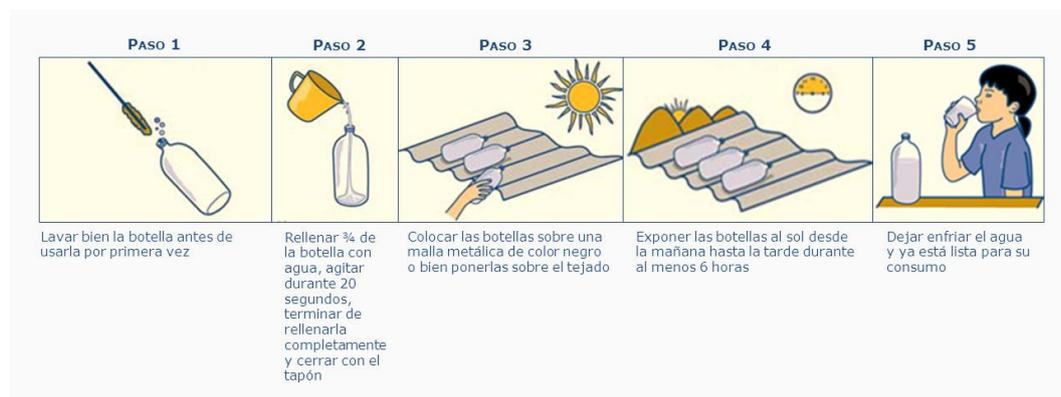


Figura 5. Representación gráfica del procedimiento de aplicación del método SODIS (adaptado de Fundación SODIS, 2011).

2.5. Factores limitantes de la eficacia del método SODIS

Además de los factores climáticos, es necesario tener en cuenta que las partículas suspendidas en el agua limitan la penetración de la radiación solar e impiden que los microorganismos sean irradiados. Por tanto, la eficacia del método SODIS se reduce considerablemente en aguas turbias, recomendándose un agua relativamente clara con un valor máximo de turbidez de 30 UNF. Si la turbidez del agua fuese superior a este valor, sería necesario someterla a un pretratamiento mediante métodos de decantación, filtración y/o floculación/sedimentación (OMS, 2007).

Por otra parte, la técnica SODIS es más eficaz en aguas con altos niveles de oxígeno. Con anterioridad, se comentó que la luz solar produce ROS que interfieren con ciertas estructuras celulares provocando la muerte celular. Por ello, se aconseja la aireación del

agua mediante la agitación vigorosa del envase durante 20-30 segundos una vez que se ha llenado en sus tres cuartas partes y antes de exponerlo al sol (EAWAG, 2011)

Por lo que respecta al tipo de recipiente utilizado, existen varios materiales plásticos transparentes que son buenos transmisores de la luz en el rango de las radiaciones UV-A y visible del espectro solar. Se recomienda el empleo de botellas PET ante las siguientes ventajas: ligereza, sabor neutro, transparencia, relativa resistencia y estabilidad química, además de contener muchos menos aditivos que otras botellas de plástico como son las constituidas por cloruro de polivinilo (PVC) (EAWAG, 2011).

Debido al envejecimiento de las botellas de plástico o ante la presencia de ralladuras, se reduce la transmisión de la radiación UV lo que ocasiona una menor eficacia del método SODIS, por lo que se aconseja reemplazarlas por otras nuevas cada 6 meses (EAWAG, 2011). Además y como consecuencia de su reutilización, se pueden producir reacciones fotoquímicas que ocasionan cambios en las propiedades químicas del plástico, representando un potencial riesgo para la salud humana. Sin embargo, Wegelin y col. (2001) comprobaron, en trabajos realizados en el laboratorio y bajo condiciones de campo, que los fotoproductos se generan en la superficie de las botellas por lo que no entran en contacto con el agua. Además, recientes estudios demostraron que, durante los tiempos de exposición recomendados y a pesar de las temperaturas alcanzadas en el interior de las botellas PET, no se generan productos tóxicos (antimonio, acetaldehídos, adipatos y ftalatos) y las concentraciones de formaldehído detectadas durante la aplicación del método SODIS son inferiores al valor límite establecido en la legislación (Montuori y col., 2007; Schmid y col., 2008; Westerhoff y col., 2008).

2.6. El empleo del método SODIS y su impacto en la salud

En estos últimos 15 años, diversos estudios experimentales realizados bajo condiciones simuladas o naturales y empleando virus, bacterias, protozoos, hongos e incluso nematodos demostraron que la radiación solar reduce significativamente la contaminación biológica del agua al inactivar los microorganismos presentes en la misma (Tabla 2). Sin embargo, son escasos los datos disponibles y derivados de ensayos de campo en los que se demuestra que dicho descenso en los niveles de contaminación microbiológica repercute en un menor riesgo de enfermedad para la población.

Tabla 2. Relación de microorganismos evaluados en la desinfección solar del agua bajo condiciones simuladas o naturales de radiación solar.

Microorganismo	Radiación solar	Referencia
<i>E. coli</i>	Simulada	Joyce y col., 1996
<i>Salmonella typhimurium</i>	Simulada	Smith y col., 2000
<i>Shigella dysenteriae</i> tipo 1	Simulada	Kehoe y col., 2004
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> (trofozoitos)		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Candida albicans</i>	Simulada	Lonnen y col., 2005
<i>E. coli</i>		
<i>Fusarium solani</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>A. polyphaga</i> (quistes)	Simulada	Heaselgrave y col., 2006
Poliovirus tipo 2		
<i>Giardia muris</i>	Simulada	McGuigan y col., 2006
<i>C. parvum</i>	Natural	Méndez-Hermida y col., 2007; King y col., 2008
<i>C. parvum</i>		
<i>Cyclospora cayetanensis</i>		
<i>Entamoeba histolytica</i>	Natural	Gaafar, 2007
<i>G. intestinalis</i>		
<i>Microsporidia</i> spp.		
<i>B. subtilis</i>		
<i>C. jejuni</i>		
<i>E. coli</i> enteropatógeno	Natural	Boyle y col., 2008
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		
<i>Ascaris lumbricoides</i> (huevos)		
<i>C. parvum</i>	Simulada	Heaselgrave y Kilvington, 2011
<i>E. histolytica</i>		
<i>G. intestinalis</i>		
<i>Naegleria fowleri</i>		

El primer trabajo en el que se demostró una asociación entre la desinfección solar del agua y una reducción significativa del riesgo de padecer enfermedad diarreica fue realizado en Kenia por Conroy y col. (1996). En dicho trabajo se llevó a cabo el seguimiento, durante un periodo de 4 meses, de 206 niños de la etnia Masái con edades comprendidas entre 5-16 años. Se comprobó que los niños que consumieron agua que había sido sometida al método SODIS tuvieron aproximadamente un 20% menos de riesgo de padecer episodios diarreicos. Posteriormente, los mismos autores realizaron un estudio en 349 niños menores de 6 años pertenecientes a la misma etnia y observaron una reducción de la enfermedad diarreica del 16% en aquel grupo que consumió agua que había sido expuesta al sol (Conroy y col., 1999). También, estos investigadores demostraron que el método SODIS ofreció una protección frente al cólera en niños menores de 6 años (Conroy y col., 2001).

Hobbins (2003), miembro del Instituto Tropical y de Salud Pública Suizo, evaluó el impacto en la salud del método SODIS en un total de 204 niños menores de 5 años de un área rural del Departamento de Cochabamba (Bolivia). A pesar de que algunos niños consumieron agua que no había sido tratada, el autor comprobó que la aplicación del método redujo en un 40% el riesgo de padecer diarrea. Además, se estimó una reducción de un episodio de enfermedad diarreica por niño y año. Sin embargo, en un estudio posterior en el que participaron 725 niños menores de 5 años pertenecientes a 425 domicilios de 22 comunidades rurales del mismo departamento boliviano, se observó una menor reducción en los procesos diarreicos (19%). Dicho descenso no fue estadísticamente significativo, quizás debido al bajo cumplimiento de las normas de aplicación del método SODIS por parte del grupo participante (32,1%) (Mäusezahl y col., 2009). La interpretación de estos resultados sugiere que una aceptación limitada del método SODIS, consecuencia de un fallo en las intervenciones dirigidas a promocionarlo o bien una elección equivocada en la pauta de evaluación, pueden ser los factores responsables de la ausencia de beneficios en la salud (Bhutta, 2009).

En un estudio realizado en población infantil menor de 5 años residente en los suburbios de la ciudad de Vellore (sudeste de la India) y, a pesar de que el 86% de los participantes consumieron también agua que no había sido expuesta a la radiación solar, se comprobó que el riesgo de padecer enfermedad diarreica se redujo en un 40% (Rose y col., 2006). En una población similar de la ciudad de Jorethang (nordeste de la India) también se demostró una reducción del 76% en los procesos diarreicos en aquellos niños que consumieron agua tratada mediante el método SODIS (Rai y col., 2010).

En Camerún, se realizó un amplio estudio en el que se incluyeron 2911 domicilios con niños menores de 5 años de edad. Se observó que la prevalencia de las enfermedades diarreicas descendió tras la utilización del método SODIS de un valor inicial del 34,3% a un

22,8% (31,8% en el grupo control). Además, se comprobó que en aquellos domicilios en los que se cumplieron rigurosamente las normas del estudio, la prevalencia de enfermedades diarreicas en población infantil disminuyó al 18,3% y el riesgo de su padecimiento se redujo en un 42,5% (Graf y col., 2010). De esta forma, du Preez y col. (2010) en un estudio realizado en Sudáfrica comprobaron que existe una reducción estadísticamente significativa en la prevalencia de los procesos diarreicos sólo en aquellos domicilios con una alta motivación y compromiso en el empleo del método SODIS, concluyendo que estos son factores determinantes para valorar los beneficios en la salud (porcentaje de reducción del 74%).

Recientemente, McGuigan y col. (2011) estudiaron los efectos de la desinfección solar del agua de bebida en la incidencia de procesos diarreicos en 928 niños de edades comprendidas entre los 3-5 años de edad y pertenecientes a 782 domicilios de varias comunidades rurales del sudeste de Camboya. Los autores observaron un alto grado de motivación en los participantes (el 95% de los mismos mostraron un compromiso elevado) y comprobaron que el método SODIS redujo en un 50% el riesgo de padecer episodios de diarrea disintérica, e incluso en un mayor porcentaje en el caso de diarrea no disintérica. También, du Preez y col. (2011) evaluaron la influencia del método SODIS en 1089 niños de edades comprendidas entre los 6 meses y los 5 años residentes en 765 domicilios de comunidades rurales y peri-urbanas de Nakuru (Kenia). Se comprobó que aquellos niños que consumieron agua tratada mediante el método SODIS presentaron de forma estadísticamente significativa un menor riesgo de padecer enfermedad diarreica, tanto disintérica como no disintérica. Además, se observó que los usuarios del método SODIS presentaban una mayor estatura y peso corporal con respecto a los no usuarios.

Finalmente, es necesario señalar que cualquier tipo de promoción del método SODIS lleva asociado el fomento de medidas higiénicas apropiadas entre los participantes, debido a que la falta de higiene es un factor de riesgo para el padecimiento de enfermedades diarreicas. Así, Graf y col. (2010) comprobaron que los usuarios del método SODIS presentan de forma estadísticamente significativa unas mejores condiciones higiénicas tanto personales como domésticas que los no usuarios. Por lo tanto, es difícil diferenciar los beneficios aportados por la aplicación del método SODIS de los debidos a la instauración de medidas higiénicas adecuadas en el hogar, ya que ninguno de los estudios en los que se evaluó el método SODIS es de tipo doble ciego.

2.7. Mejoras tecnológicas del método SODIS

Con el fin de mejorar la eficacia de la técnica SODIS, en estos últimos años se ha abordado el estudio de diferentes sistemas tecnológicos mediante un mejor aprovechamiento de los recursos y/o acelerando los procesos que culminan en la inactivación de los microorganismos presentes en el agua.

2.7.1. Colectores solares: concentradores parabólicos compuestos (CPC)

Cuando las botellas PET se exponen al sol, tan sólo la parte superior es iluminada, por lo que una importante fracción de la radiación solar incidente no alcanza la totalidad del agua expuesta, impidiendo que los microorganismos sean irradiados. Recientemente, se han llevado a cabo diferentes intentos con el fin de concentrar la radiación solar empleando superficies reflectantes (Walker y col., 2004; Navntoft y col., 2008; Ubomba-Jaswa y col., 2009). La investigación de los sistemas de concentración de la luz solar ha dado lugar a una amplia variedad de colectores que, dependiendo de la finalidad para la que se diseñen, pueden ser muy sencillos o alcanzar un alto grado de sofisticación. Normalmente, y dependiendo del factor de concentración (FC) (cociente de la división entre el área de apertura del colector y el área de aprovechamiento de la radiación), se clasifican en función de la temperatura que se puede alcanzar en ellos (Fernández Ibáñez, 2003).

Los CPC son colectores estáticos de media concentración (permiten alcanzar temperaturas entre 150 y 400 °C), que presentan una superficie reflectante cuya sección es una curva compuesta a su vez por dos curvas, de forma que cuando se utiliza un reactor cilíndrico, la sección está formada por una parábola y por la involuta del reactor (Figura 6). Estos colectores consiguen concentrar sobre el reactor toda la radiación solar que incide sobre los mismos por debajo de un determinado ángulo, conocido como ángulo de aceptación (ángulo que delimita el rango angular dentro del que todos los rayos incidentes son interceptados directamente por el tubo receptor o reflejados sobre el mismo) (Blanco Gálvez, 2002). La radiación reflejada por la superficie del colector incide también sobre la parte posterior del reactor lo que permite que esté irradiado en toda su superficie de forma casi homogénea (Figura 7). Los CPC se caracterizan por concentrar tanto la radiación directa como la difusa, sin la necesidad de reorientar el colector en función del movimiento del sol a lo largo del día (Malato y col., 2004). Puesto que la radiación UV-A consiste en radiación solar directa ($\approx 60\%$) y difusa ($\approx 40\%$), el uso de los CPC asegura que toda la radiación UV-A esté disponible (Madronich y Flocke, 1997).

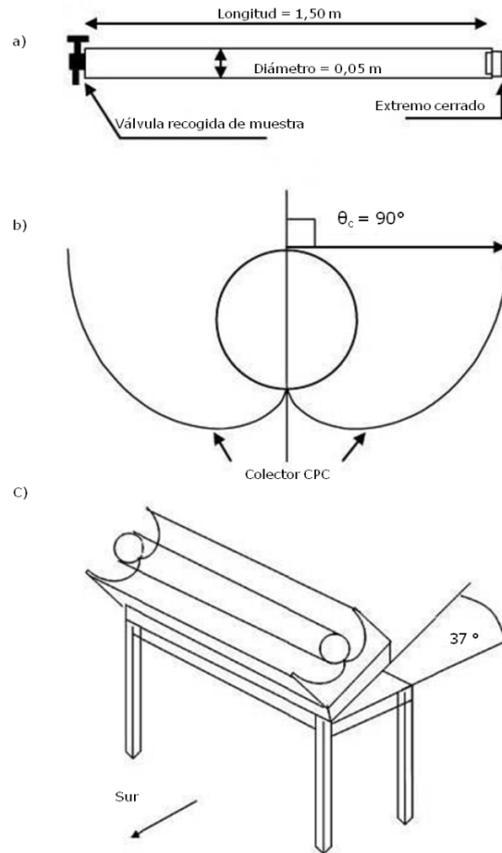


Figura 6. Esquema de un CPC: a) configuración del tubo reactor cilíndrico; b) sección de la superficie reflectante del CPC adaptada a un reactor cilíndrico; c) CPC en su soporte y en su posición adaptada a la latitud de la Plataforma Solar de Almería (extraído de Navntoft y col., 2008).

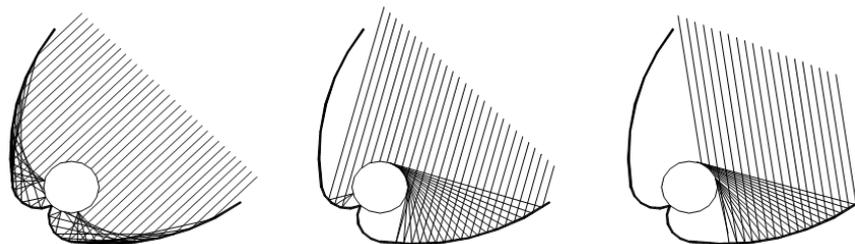


Figura 7. Diagrama de la radiación solar reflejada en los CPC (extraído de Fernández Ibáñez, 2003).

El reactor, además de contener el medio acuoso, debe transmitir de forma eficaz la radiación UV que le llega desde el concentrador CPC y resistir temperaturas ligeramente altas sin alterar sus propiedades. Además, debe ser resistente a las condiciones meteorológicas y de fácil limpieza (interna y externa). Desde el punto de vista de su transparencia en el rango de la radiación UV, el mejor material para su composición es el cuarzo, pero presenta el inconveniente de su elevado coste. Por ello, se utiliza habitualmente el vidrio borosilicatado que también cumple todas las exigencias anteriores (Blake y col., 1997). De igual forma, la superficie reflectante debe presentar una alta reflectividad en el rango de la radiación UV y además ser resistente a la radiación solar y a las condiciones ambientales. Así, la elección más apropiada es la utilización de aluminio sometido a un tratamiento de anodizado brillo o electropulido (Malato y col., 1996; Vidal y col., 1999; Blanco y col., 2000).

2.7.2. Procesos de oxidación avanzados

Los procesos de oxidación avanzados pueden definirse como aquéllos que implican la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) cuyo potencial de oxidación es muy superior al de otros agentes oxidantes tradicionales (ozono, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro y cloro). Estos radicales, con carácter no selectivo, son capaces de oxidar y mineralizar una amplia variedad de moléculas orgánicas originando anhídrido carbónico, agua e iones inorgánicos (Gogate y Pandit, 2004) mediante tres posibles reacciones: i) adición radicalaria [Ec. 1]; ii) abstracción de hidrógeno [Ec. 2]; y iii) transferencia electrónica [Ec. 3] (Stansinakis, 2008).

La generación de radicales $\cdot\text{OH}$ es probablemente el mecanismo más importante por el que las proteínas pueden ser afectadas al ser oxidados residuos aminoácidos, siendo los aminoácidos con grupos sulfidriilo (cisteína, metionina) los más sensibles. Como consecuencia, se pueden generar enlaces cruzados entre proteínas o causar su fragmentación y consiguiente pérdida de funcionalidad (Berlett y Stadtman, 1997). La peroxidación lipídica es el principal proceso asociado a la inactivación celular al ocasionar cambios en la permeabilidad e integridad de la membrana, favoreciendo la liberación del contenido plasmático así como la inhibición de la respiración celular (Cheng y col., 2007). Además, el ADN es particularmente susceptible al estrés oxidativo, pudiendo ser atacado a nivel de la base nitrogenada o a nivel de su componente glucídico, originando de esta forma una amplia variedad de productos que pueden causar mutaciones irreversibles (Dizdaroglu y col., 2002).



En estos últimos 30 años, los procesos de oxidación avanzados se han revelado como una tecnología importante al acelerar los procesos de oxidación pudiendo ser aplicados en numerosas áreas de descontaminación y desinfección (Klavarioti y col., 2009). La versatilidad de estos procesos radica en el hecho de que existen diferentes formas de producir radicales $\bullet OH$, incluso utilizando la radiación solar. Algunos de los métodos más utilizados son la fotocatalisis heterogénea, generalmente con dióxido de titanio (TiO_2), y la fotólisis directa de ciertos oxidantes.

La fotocatalisis heterogénea con TiO_2 ha sido ampliamente utilizada como tratamiento terciario para la degradación de los contaminantes químicos presentes en aguas residuales. Sus principales ventajas son la ausencia de toxicidad, la alta estabilidad y la posibilidad de reutilización, y el bajo coste del fotocatalizador, así como las suaves condiciones de trabajo (pH natural y temperatura y presión ambientales), sin necesidad de agentes químicos adicionales y la posibilidad de utilizar la luz solar como fuente de radiación. La fotocatalisis se puede realizar manteniendo el catalizador en una suspensión acuosa, o bien puede ser inmovilizado en un soporte sólido. La elección de uno u otro método dependerá de la aplicación a la que sea destinado el tratamiento, de forma que si el sistema es diseñado para la purificación del agua de bebida a nivel domiciliario, será necesario emplear el TiO_2 inmovilizado (Malato y col., 2009).

Los procesos de desinfección mediante fotocatalisis heterogénea con TiO_2 consisten en el empleo de radiación UV de longitud de onda de 300-400 nm capaz de fotoexcitar el catalizador semiconductor que, en contacto con el agua y en presencia de oxígeno, genera especies oxidantes como son los radicales $\bullet OH$. Matsunaga y col. (1985) aportaron los primeros datos sobre el potencial empleo del TiO_2 en procesos de desinfección al comprobar la inactivación (total o parcial) después de dos horas de incubación de *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, las investigaciones precursoras sobre el empleo de este fotocatalizador en la desinfección del agua de bebida se deben a Ireland y col. (1993) quienes comprobaron una reducción total de la flora bacteriana en muestras de aguas superficiales no cloradas tras su exposición al TiO_2 en un reactor de flujo continuo. En el año 2000, Herrera Melián y col. (2000) demostraron la eficacia del empleo del TiO_2 en la desinfección de aguas residuales urbanas

al reducir significativamente la carga de coliformes fecales utilizando como fuente de radiación lámparas de luz UV-C y radiación solar. Posteriormente, Rincón y Pulgarín (2004) demostraron un efecto desinfectante residual al no observar un recrecimiento de *E. coli* K12 en las 60 horas posteriores al tratamiento con TiO₂ en presencia de luz solar. Trabajos actuales demuestran la eficacia frente a microorganismos más resistentes como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, y *Fusarium* spp. e incluso una reciente contribución demostró una reducción significativa en la infectividad de biomoléculas infecciosas (priones) tras el tratamiento de las muestras con procesos de fotocatalisis heterogénea con TiO₂ (Seven y col., 2004; Paspaltsis y col., 2006; Sichel y col., 2007).

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un reconocido oxidante, ha sido empleado como aditivo en ciertos tipos de procesos de oxidación avanzados junto con el ozono o la radiación UV-C. Cuando el H₂O₂ se irradia con fotones de longitud de onda menor de 300 nm se produce su fotólisis originando radicales *OH (Malato y col., 2009). La radiación solar que alcanza la superficie terrestre contiene la mayoría de la radiación UV-A (320-400 nm) del espectro, una pequeña fracción de la radiación UV-B (280-320 nm), mientras que la radiación UV-C (100-280 nm) es absorbida por las capas superiores de la atmósfera. Ante la ausencia de fotones de la radiación UV-C a nivel del mar, la radiación solar no es tan efectiva en la generación de radicales *OH por la fotólisis del H₂O₂ en comparación con el ozono y las lámparas de radiación UV-C. Sin embargo, un reducido número de publicaciones reportan el efecto letal del H₂O₂ en presencia de radiación solar para ciertos microorganismos existentes en el agua. Aunque el mecanismo de acción no se conoce (se sugiere un incremento del estrés oxidativo incapaz de ser controlado por mecanismos enzimáticos naturales), existen datos evidentes de un fuerte efecto sinérgico entre la radiación solar y el H₂O₂. Este efecto fue descrito por primera vez para el bacteriófago T7 (Anasthaswamy y Eisenstark, 1977; Anathaswamy y col., 1979) y posteriormente para *E. coli* K12 (Hartman y Eisenstark, 1980). Recientemente, se demostró su eficacia en la inactivación de esporas de *Fusarium* spp. (Sichel y col., 2009; Polo-López y col., 2011). Este proceso de desinfección requiere pequeñas concentraciones de peróxido y puede utilizar la radiación solar, por lo que es una potencial tecnología de bajo coste. Además, la descomposición del reactivo en agua y oxígeno no supone una contaminación química secundaria del medio.

3. LA CRYPTOSPORIDIOSIS

La cryptosporidiosis es una enfermedad parasitaria producida por especies de protozoos pertenecientes al género *Cryptosporidium*, que infectan tanto al hombre como a otros animales vertebrados. Las manifestaciones clínicas de la infección en el hombre dependen de su estado inmunitario, reconociéndose tres categorías clínicas: aguda autolimitada o enfermedad transitoria, crónica y fulminante (Warren y Guerrant, 2007).

La cryptosporidiosis aguda autolimitada es la forma clínica más frecuente en personas inmunocompetentes. El periodo de prepatencia suele ser de 4-7 días, transcurridos los cuales se manifiesta un proceso diarreico que durante un máximo de 7 días puede desencadenar entre 8-20 deposiciones diarias, siendo el periodo de patencia (excreción ooquistica) superior a un mes después de la resolución de los síntomas. Además de la diarrea acuosa, también se han descrito malestar general, dolor abdominal difuso, anorexia y fiebre moderada en algunos casos (Chappell y col., 2003). En países en vías de desarrollo, la cryptosporidiosis aguda es causa de muerte infantil, principalmente en niños malnutridos. La mortalidad asociada a esta infección es aproximadamente 2-4 veces superior a la causada por otros patógenos intestinales (Molbak y col., 1993).

La cryptosporidiosis crónica se manifiesta habitualmente en enfermos inmunocomprometidos y en personas con un cierto grado de malnutrición (Blanshard y col., 1992; Cárcamo y col., 2005). El cuadro clínico se caracteriza también por diarrea acuosa, dolor abdominal difuso, náuseas, vómitos, cefaleas, anorexia, fiebre y pérdida de peso. La OMS establece que la cryptosporidiosis con diarrea de más de un mes de duración y en enfermos con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) bien demostrada y no existiendo otras causas de inmunodeficiencia que puedan explicarla, es una de las situaciones clínicas diagnósticas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Gatell y col., 1996).

La infección fulminante solamente se ha descrito en enfermos de SIDA o con inmunosupresión inducida por fármacos. En estos casos, la enfermedad se presenta como un cuadro similar al cólera, ocasionando la muerte por "shock" hipovolémico (Hunter y Nichols, 2002).

3.1. El agente etiológico y su biología

Ernest Edward Tyzzer (1875-1965) fue el primero en describir y denominar la especie tipo del género *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907, al observar estados de desarrollo de un nuevo organismo en el estómago del ratón común (*Mus musculus*) (Tyzzer, 1907, 1910). En 1912 describe una segunda especie encontrada en ratones de laboratorio, *C. parvum* Tyzzer, 1912, que difiere de la especie tipo tanto en el lugar de la infección como en la morfología de los ooquistes (Tyzzer, 1912). Otra significativa aportación de Tyzzer al género *Cryptosporidium* fue el descubrimiento de una especie en la bolsa de Fabricio de pollos, erróneamente denominada *C. parvum* (Tyzzer, 1929). Con posterioridad, esta especie se nombró *Cryptosporidium tyzzeri* por Levine en 1961 (Upton, 2003), pero permaneció como *nomen nudum* hasta que Current y col. (1986) realizaron una completa descripción, reemplazando el *nomen nudum* por el de *Cryptosporidium baileyi*. Desde entonces, hubo una continua evolución en la determinación de especies y rango de hospedadores. Diversas especies fueron denominadas simplemente al ser encontradas en un nuevo hospedador, en el cual *Cryptosporidium* no había sido descrito previamente. Desde el momento en que ciertas especies de *Cryptosporidium* se reconocieron como agentes patógenos para el ganado (Panciera y col., 1971) y el hombre (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976), éstas adquirieron una mayor importancia y se incrementaron los estudios de transmisión utilizando aislados ooquisticos de procedencia humana a hospedadores animales. De esta forma, se comprobó que aislados morfológicamente indistinguibles pueden ser transmitidos entre dos o más especies de hospedadores. Como consecuencia de estos hallazgos, algunos investigadores sugirieron que el género *Cryptosporidium* podría ser monoespecífico (Tzipori y col., 1980). Sin embargo, posteriores estudios de transmisión cruzada y recientes aportaciones moleculares invalidaron esta hipótesis.

En los últimos años, la caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* ha permitido clarificar la confusa taxonomía de las especies de este género y validar la existencia de diferentes especies en cada clase de hospedador vertebrado. Nuevas especies de *Cryptosporidium* han sido denominadas basándose en diferentes parámetros que incluyen no sólo los datos morfológicos sino también los aspectos biológicos, la especificidad por el hospedador, las consecuencias histopatológicas y las particularidades moleculares. Así, atendiendo a estos criterios, actualmente se reconocen 23 especies válidas (Tabla 3). Además, existen varios genotipos pendientes de su clasificación definitiva, lo que indica que el género está en continua revisión (Navarro-i-Martínez y col., 2011).

Tabla 3. Especies del género *Cryptosporidium* actualmente reconocidas.

Especie	Hospedador tipo	Localización primaria	Ooquiste (µm)	Referencia
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i>	ES; ID	5,6×7,4	Tyzzler, 1910
<i>C. parvum</i>	<i>M. musculus</i>	ID	4,5×5,5	Tyzzler, 1912
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	ID	4,5-4,0×4,6-5,2	Slavin, 1955
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i>	ID	4,9-5,0×4,8-5,6	Vetterling y col., 1971
<i>C. felis</i>	<i>Felis catus</i>	ID	4,5×5,0	Iseki, 1979
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata</i> ; <i>E. subocularis</i> ; <i>Sanzinia</i> <i>madagascariensis</i>	ES	5,6-6,6×4,8-5,6	Levine, 1980
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i>	BF; CL; TR	4,6×6,2	Current y col., 1986
<i>C. varanii</i>	<i>Eumeces schneideri</i>	CL; ID	4,2-5,2×4,4-5,6	Pavlassek y col., 1995
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i>	A	5,5×7,4	Lindsay y col., 2000
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	ID	4,95×4,71	Fayer y col., 2001
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>	ID	4,9×5,2	Morgan-Ryan y col., 2002
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata</i> ; <i>Dicentrarchus labrax</i>	ES	4,7×4,5	Álvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. galli</i>	<i>G. gallus</i> ; <i>Pinicola enucleator</i> ; <i>Tetrao urogallus</i> ; especies de Spermestidae y Fringillidae	PR	8,25×6,3	Ryan y col., 2003
<i>C. scopthalmi</i>	<i>Scophthalmus maxima</i>	I; ES	3,7-5,0×3,0-4,7	Álvarez-Pellitero y col., 2004
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i>	ID	4,9-4,4×4,0-4,3	Ryan y col., 2004
<i>C. bovis</i>	<i>B. taurus</i>	-	4,7-5,3×4,2-4,8	Fayer y col., 2005
<i>C. fayeri</i>	<i>Macropus rufus</i>	ID	4,5-5,1×3,8-5,0	Ryan y col., 2008
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	ES	5,5-7,0×5,0-6,5	Jirků y col., 2008
<i>C. ryanae</i>	<i>B. taurus</i>	ID	2,9-4,4×2,9-3,7	Fayer y col., 2008
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus giganteus</i>	-	4,5-6,0×5,0×6,0	Power y Ryan, 2008
<i>C. xiaoi</i>	<i>Ovis aries</i>	-	2,9-4,4×2,9-4,4	Fayer y Santín, 2009
<i>C. ubiquitum</i>	Especies de Bovidae, Muridae y otros mamíferos	ID	4,9-5,6×4,4-5,4	Fayer y col., 2010
<i>C. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	ID	5,5-6,4×5,02-5,9	Robinson y col., 2010

A, abomaso; BF, bolsa de Fabricio; CL, cloaca; ES, estómago; ID, intestino delgado; PR, proventrículo; TR, tráquea.

Tradicionalmente, *C. parvum* fue considerada como la única especie responsable de la cryptosporidiosis humana. Sin embargo, los resultados de recientes estudios biológicos y moleculares demostraron que *C. parvum* es un complejo de varias especies o genotipos que difieren en características genéticas, especificidad por el hospedador y otros aspectos biológicos (Morgan y col., 1999, 2000; Xiao y col., 2000). De esta forma, numerosos estudios han demostrado que dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *Cryptosporidium hominis*, son las responsables de la mayoría de las infecciones humanas. *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium suis*, *C. muris*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium cuniculus* y los genotipos procedentes de ciervos y monos, también infectan a personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas. *C. meleagridis* es la tercera especie en importancia, considerándose actualmente como parásito emergente (Xiao, 2010).

Las especies del género *Cryptosporidium* presentan un ciclo biológico directo en el cual todos los estados de desarrollo (asexual y sexual) ocurren en el interior de vacuolas parasitóforas localizadas en el borde apical de la célula hospedadora (Current y García, 1991). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* con aislados de *Cryptosporidium* spp. obtenidos de diferentes hospedadores revelan que el ciclo evolutivo de este parásito consta de varias etapas de desarrollo (Figura 8).

Figura 8. Tras el desenquistamiento de los ooquistes en la luz intestinal, los esporozoítos penetran en las células del hospedador y se transforman en trofozoítos en el interior de vacuolas parasitóforas formadas en el borde de las microvellosidades del epitelio de la mucosa intestinal. Los trofozoítos sufren una división asexual (esquizogonia=merogonia) dando lugar a merozoítos. Después de ser liberados de los esquizontes Tipo I, los merozoítos invasivos penetran en células adyacentes dando lugar a nuevos esquizontes Tipo I o bien a esquizontes Tipo II. Los esquizontes Tipo II originan merozoítos de segunda generación que penetran en las células para dar lugar a las etapas sexuales, macrogamontes y microgamontes. La mayoría de los cigotos formados tras la fertilización del macrogameto por el microgameto (liberado del microgamonte), se transforman en ooquistes de pared gruesa, que sufren una esporogonia dando lugar a ooquistes esporulados conteniendo cuatro esporozoítos. Los ooquistes esporulados eliminados en las heces son las formas de resistencia del ciclo biológico y transmiten la infección de un hospedador a otro. Un porcentaje menor de cigotos no forma una pared gruesa, sino que tienen una única membrana rodeando a los cuatro esporozoítos. Estos ooquistes de pared fina representan las formas autoinfectantes del ciclo endógeno que permiten el mantenimiento de la infección en el hospedador, sin que éste se exponga a nuevas infecciones externas.

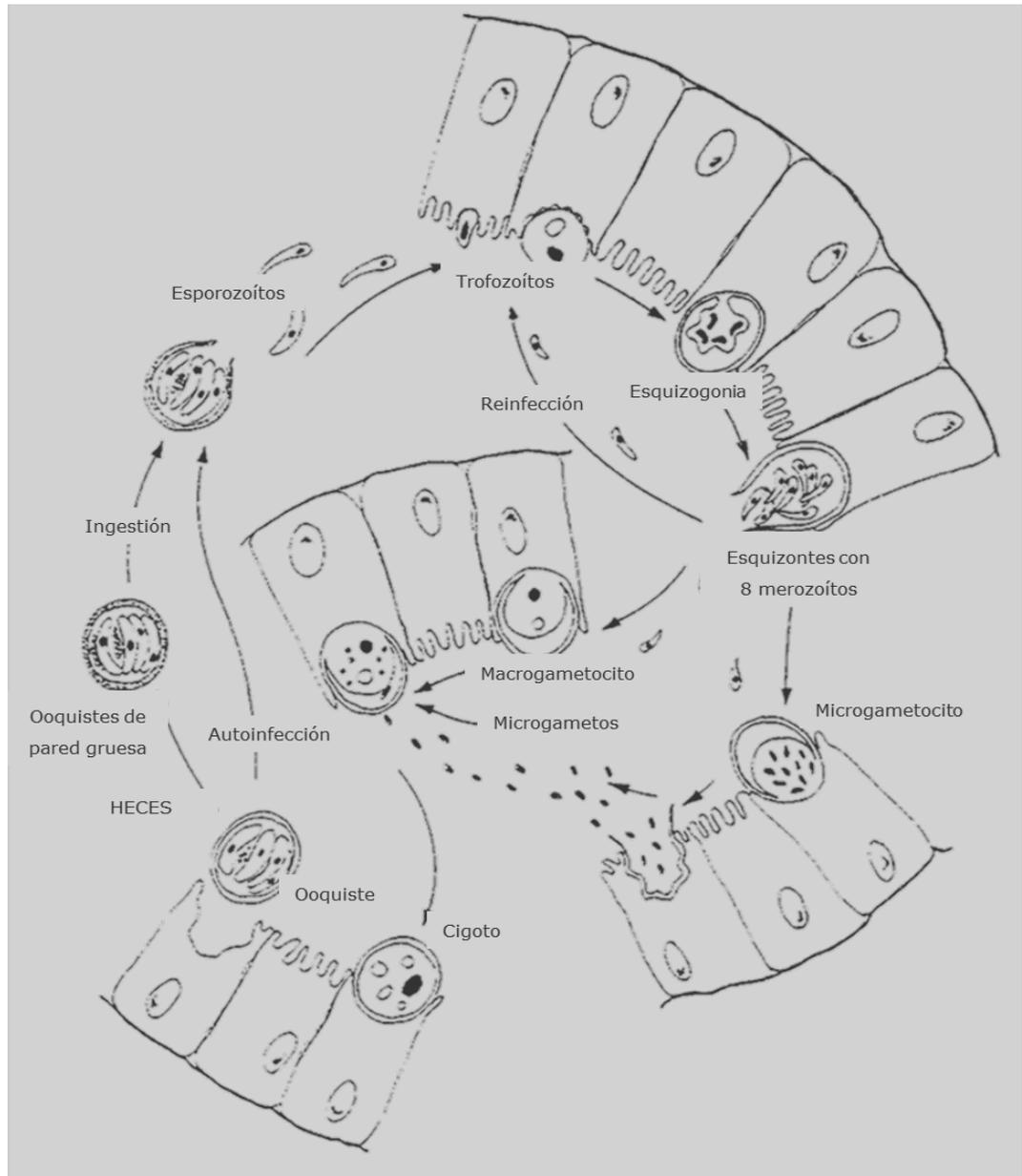


Figura 8. Representación esquemática del ciclo biológico de *C. parvum* (adaptado de Smith y Rose, 1998).

3.2. Consideraciones epidemiológicas

Ciertas características biológicas de las especies del género *Cryptosporidium* determinan los aspectos epidemiológicos generales de la infección: i) el amplio rango de hospedadores susceptibles, incluyendo al hombre; ii) la baja dosis infectante (10-30 ooquistes), que facilita la infección en personas inmunocompetentes, quienes pueden eliminar 10^8 - 10^9 ooquistes en un único episodio diarreico y mantener la excreción ooquistica hasta 50 días después de cesar el cuadro clínico, garantizando altos niveles de contaminación ambiental; iii) el pequeño tamaño de los ooquistes (4-8 μ m), ya infectantes cuando se eliminan en las heces del hospedador; iv) su gran resistencia a las condiciones ambientales y a los desinfectantes habitualmente utilizados; y v) la ausencia de un tratamiento totalmente eficaz (Casemore y col., 1997; Dillingham y col., 2002; Putignani y Menichella, 2010).

Las rutas a través de las cuales los ooquistes son transmitidos a partir de las heces de un hospedador infectado hasta un hospedador susceptible son numerosas e incluyen los principales mecanismos de transmisión de los patógenos intestinales. Sin embargo, las especies de *Cryptosporidium* se diferencian de otros enteropatógenos por su incapacidad para multiplicarse fuera del hospedador. Por tanto, las rutas de transmisión son el contacto directo hombre-hombre, animal-animal, animal-hombre, o indirecto a través de aguas destinadas al consumo, recreacionales y/o superficiales, alimentos y posiblemente por inhalación de aire (Figura 9) (Nichols, 2007).

Desde 1976, año en el que se describieron los primeros casos humanos de cryptosporidiosis (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976), las infecciones por *Cryptosporidium* spp. han sido diagnosticadas en más de 90 países y en todos los continentes, lo que confirma el carácter ubicuo de este parásito (Nichols, 2007). Por la bibliografía revisada, se constata la implicación de este protozoo en tres escenarios epidemiológicos: i) esporádico, a menudo relacionado con la transmisión hídrica y manifestándose como brotes autolimitados en personas inmunocompetentes; ii) crónico, representando una enfermedad con compromiso vital; y iii) diarrea y malnutrición en niños de países en vías de desarrollo. No obstante, las mejoras implantadas en los procesos de tratamiento del agua han tenido como consecuencia un descenso de la cryptosporidiosis en la población en general y la disponibilidad del tratamiento con antirretrovirales ha disminuido la incidencia y la severidad en pacientes VIH+/SIDA (Mor y Tzipori, 2008).

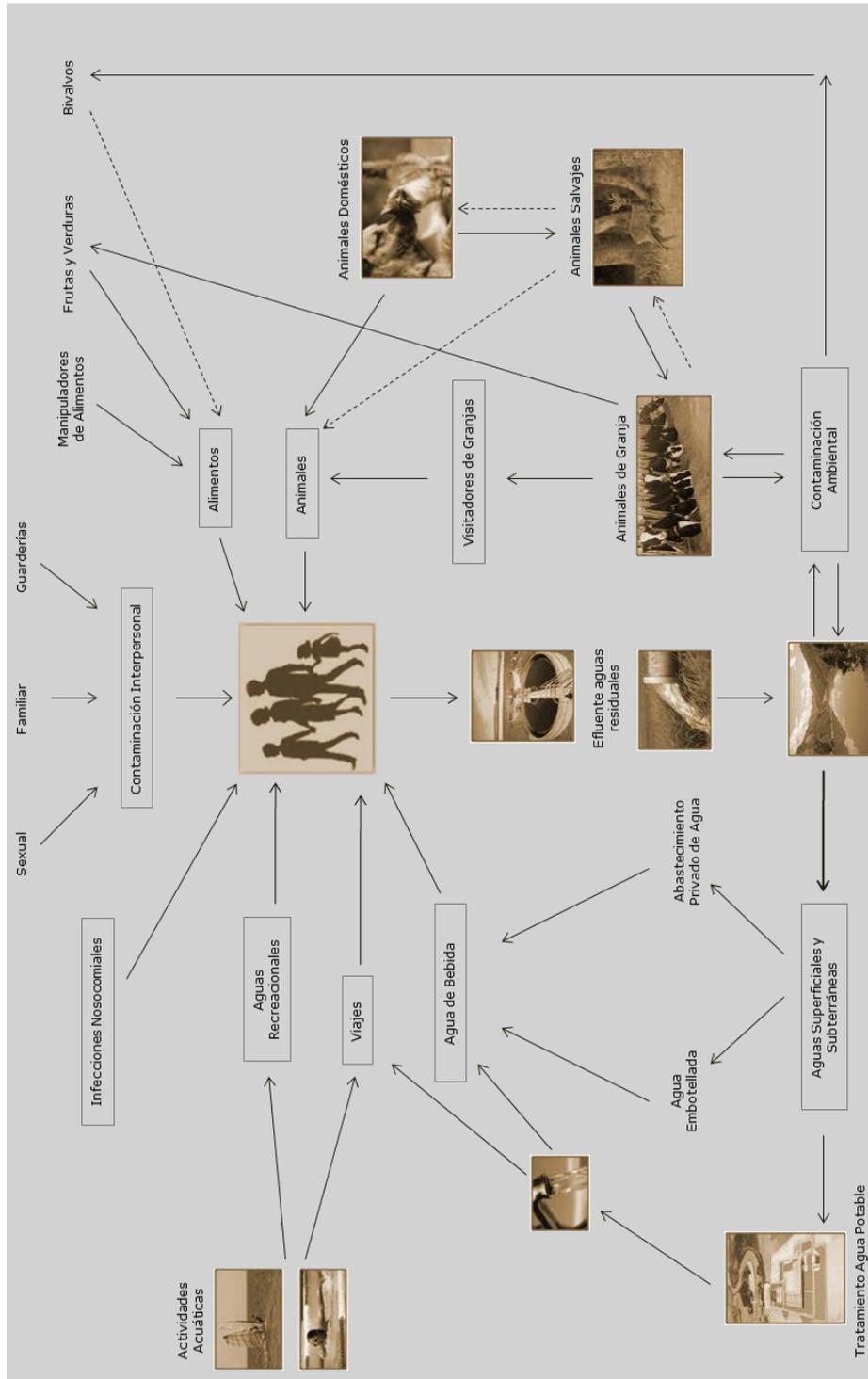


Figura 9. Rutas de transmisión de la cryptosporidiosis humana y animal.

En la Unión Europea, la cryptosporidiosis es una enfermedad notificable. Durante el año 2005, se confirmaron 7960 casos de infección en 16 países miembros. La incidencia global fue de 1,9 casos por 100000 habitantes, aunque existieron diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos en distintos países: un 0% en Estonia, Hungría, Lituania, Polonia, Eslovaquia frente al 13,7% detectado en Irlanda. Aunque sólo 5 de los 16 países reportaron datos sobre la edad de los individuos infectados, se comprobó un mayor riesgo en niños menores de 5 años (5,7 casos por 100000 habitantes en niños <5 años; 2,5 casos en niños de 5-14 años; y <1 caso en otros grupos de edad). Además, las investigaciones y los análisis realizados sobre brotes de cryptosporidiosis asociaron el padecimiento de la enfermedad con la contaminación de abastecimientos de agua, el contacto con animales, los viajes y las actividades recreacionales en piscinas. También se comprobó un pico de infección durante el otoño, reportándose un 50% de los casos en los meses de agosto y noviembre. Sin embargo, en Irlanda y España, los picos de infección tuvieron lugar en la primavera y en el verano, respectivamente (Semenza y Nichols, 2007).

En los Estados Unidos, datos aportados por el CDC y referentes a la situación de esta enfermedad parasitaria durante los años 2006-2008, demostraron un notable incremento en el número de casos reportados en el periodo 2006-2007 (79,0%) y un ligero descenso durante el año 2008 (9,9%) siendo la incidencia global superior a 2,5 casos por 100000 habitantes. Se observó un mayor número de casos en niños de 1-9 años y en población adulta de 25-39 años. El mayor pico estacional se alcanzó durante el verano, coincidiendo con un incremento de las actividades acuáticas recreacionales en lugares públicos (Yoder y col., 2010).

En países en vías de desarrollo y como consecuencia de la inclusión en estos últimos años de nuevos marcadores epidemiológicos e indicadores de infección, se comprobó el fuerte impacto que tienen los protozoos parásitos en las enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, todavía una gran proporción de las enfermedades diarreicas, principalmente aquellas que afectan a la población infantil, son de etiología desconocida. La cryptosporidiosis es frecuente en población humana a nivel mundial, incidiendo fundamentalmente en población infantil y en enfermos con SIDA. Como consecuencia de esta situación, desde el año 2006, *Cryptosporidium*, junto con el protozoo flagelado *Giardia*, se incluye en *The Neglected Diseases Initiative*. Estas enfermedades son con frecuencia buenos indicadores de pobreza y subdesarrollo, al afectar a poblaciones pobres y con escasos recursos, habitantes de zonas remotas, áreas rurales, suburbios o zonas afectadas por desastres naturales o diversos tipos de conflictos, circunstancias que facilitan su difusión entre la población (Savioli y col., 2006).

Cryptosporidium está implicado en más del 20% de los casos de diarrea infantil en países en vías de desarrollo y en estas regiones puede tener complicaciones mortales en enfermos de SIDA. Además y en niños de corta edad, se asocia a menudo con un retraso en el desarrollo y una función cognitiva deficiente. Incluso, en países del África Subsahariana, la cryptosporidiosis tiene un valor predictivo de la mortalidad infantil (Molbak y col., 1993; Amadi y col., 2001; Tumwine y col., 2003). En estas zonas geográficas, la cryptosporidiosis es más prevalente en niños menores de 2 años, en los que se reportaron porcentajes de infección del 45% (Valentiner-Branth y col., 2003). En individuos adultos la enfermedad crónica está relacionada con estados de inmunodeficiencia asociados a la infección por el VIH (Tabla 4). Sin embargo, los niños de estas áreas son más vulnerables al padecimiento crónico de la infección debido a los efectos independientes o conjuntos de su inmadurez fisiológica, estado de desnutrición e infección por el VIH. Además, se demostró una asociación entre la presencia de *Cryptosporidium* y el estado de malnutrición infantil (Mor y Tzipori, 2008).

Por otra parte, los datos obtenidos en estudios de seroprevalencia realizados en poblaciones de países de zonas tropicales indican niveles elevados de exposición al parásito. Así, datos obtenidos en diversas poblaciones de estas latitudes revelan valores de seroprevalencia comprendidos entre un 60-100% (Ungar y col., 1988; Vergara Castiblanco, 1999) frente a valores del 25-35% obtenidos en países industrializados (Ungar y col., 1989; O'Donoghue, 1995). De esta forma, se confirma que los niveles de seroprevalencia tienden a ser mucho más elevados que la frecuencia con la que se identifican ooquistes en las heces. Además, se comprobó un incremento de los niveles de anticuerpos séricos con la edad (Cox y col., 2005). En un reciente estudio se investigaron los efectos que las medidas de sanidad ambiental, los hábitos higiénicos y el abastecimiento, almacenamiento y manipulación del agua de bebida tienen sobre el desarrollo de anticuerpos séricos en una población residente en un área periurbana en el noreste de Brasil. Se comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de seroprevalencia (anticuerpos IgG) detectados en personas que vivían en comunidades con y sin saneamiento ambiental. También se observó una asociación positiva entre los altos niveles de IgG anti-*Cryptosporidium* en aquellas personas que ingerieron agua no hervida, no filtrada o procedente de abastecimientos deficientes. Los resultados sugieren que estas circunstancias son importantes factores de riesgo en la transmisión de la cryptosporidiosis en países en vías de desarrollo (Teixeira y col., 2007).

Tabla 4. Estudios de prevalencia de la cryptosporidiosis en poblaciones humanas de países en vías de desarrollo.

País	Población	Prevalencia	Observaciones	Referencia
Albania	321 niños asintomáticos	0,3%		Sejdini y col., 2011
Bangladesh	6221 personas con y sin diarrea	2,4%	2,8% en 3646 pacientes con diarrea; 1,9% en 2575 personas asintomáticas	Haque y col., 2009
Bielorrusia	432 niños asintomáticos	2,8-8,0%	4,1-8,0% en niños procedentes de regiones afectadas por el accidente de Chernóbil; 2,8% en niños de regiones control	Lavdovskaia y col., 1996
Bolivia	377 personas de la etnia Aimara de 5-19 años asintomáticas	31,6%	-	Esteban y col., 1998
Burkina Faso	1385 niños con y sin diarrea <36 meses	5,2%	7,8% en niños con diarrea	Nacro y col., 1998
Burundi	100 pacientes con SIDA	13,1%	84 pacientes presentaban diarrea	Kadende y col., 1989
Camboya	80 pacientes VIH+	46,7%	40,0% en pacientes con diarrea; 53,3% en pacientes asintomáticos	Chhin y col., 2006
Camerún	154 adultos VIH+	3,9%	-	Safarti y col., 2006
Chile	4892 personas	0,4%	0,5% en niños <2 años	Mercado y García, 1995
Colombia	103 pacientes VIH+	21,4%	-	Navarro-i-Martínez y col., 2006
Costa de Marfil	130 niños <5 años con diarrea	7,7%	-	Kassi y col., 2004
Costa Rica	Niños con diarrea	4,3%	-	Mata y col., 1984
Cuba	401 niños de 0-9 años hospitalizados con y sin diarrea	3,2%	11,5% en niños con diarrea	Núñez y col., 2003
Ecuador	293 niños de la etnia Quechua de 12-60 meses	8,9%	-	Jacobsen y col., 2007
Egipto	120 niños	33,3%	90 niños hospitalizados por diversas causas	Antonios y col., 2010
	110 pacientes con diarrea	31,1%	-	Mousa y col., 2010
El Salvador	210 niños con diarrea	4,0%	-	Reinthalder y col., 1988
Etiopía	655 niños <14 años	12,2%	-	Ayalew y col., 2008
	384 personas VIH+ y VIH-	13,6%	25,0% en pacientes VIH+; 2,1% en personas VIH-	Getaneh y col., 2010
Filipinas	735 niños y adultos con diarrea	2,9%	Niños de 6-20 meses	Cross y col., 1985
Gabón	288 niños <2 años	24,0%	28,0% en casos de diarrea aguda	Duong y col., 1995
Gambia	1200 niños <5 años con y sin diarrea	5,3%	9,0% en niños con diarrea; 3,0% en niños sin diarrea	Adegbola y col., 1994

Tabla 4. (Continuación)

País	Población	Prevalencia	Observaciones	Referencia
Ghana	354 niños <5 años con y sin diarrea	25,1%	27,8% en niños con diarrea; 15,6% en niños sin diarrea	Adjei y col., 2004
	48 pacientes VIH+ hospitalizados con diarrea y pacientes VIH-	33,3%	28,6% en pacientes VIH+; 37,0% en pacientes VIH-	Adjei y col., 2003
	274 niños <5 años con y sin diarrea	5,8%	8,7% en niños con diarrea; 1,0% en niños sin diarrea	Opintan y col., 2010
Guatemala	100 pacientes con gastroenteritis	32,0%	-	Laubach y col., 2004
Guinea Bissau	4922 niños <5 años con diarrea	7,7%	-	Perch y col., 2001
Guinea Ecuatorial	171 pacientes VIH+	18,1%	21,4% en personas sanas	Blanco y col., 2009
Haití	1553 muestras diarreicas	10,3%	1,0% en población asintomática	Raccurt y col., 2006
Honduras	266 niños <36 meses con diarrea	6,7%	-	Kaminsky, 1991
	100 pacientes VIH+ y VIH-	4,0%	7,7% en pacientes VIH+	Lindo y col., 1998
India	2579 niños <5 años con diarrea hospitalizados	2,7%	-	Ajjampur y col., 2010
Indonesia	318 pacientes VIH+ con diarrea	4,9%	-	Kurniawan y col., 2009
	42 niños inmunocomprometidos de 0,5-12 años	4,8%	VIH+	Idris y col., 2010
Irán	214 pacientes inmunocomprometidos	1,4%	6,3% en pacientes con diarrea	Nahrevanian y Assmar, 2008
Iraq	380 pacientes con y sin diarrea	5,7%	9,7% en pacientes con diarrea crónica vs 1,1% en pacientes sin diarrea	Mahdi y Ali, 2004
	300 niños hospitalizados	37,3%	-	Mahgoub y col., 2004
Kenia	4899 muestras de niños <5 años	4,0%	Prevalencia mayor en niños de 13-24 meses (5,2%) y menor en aquellos de 48-60 meses (2,0%)	Gatei y col., 2006
Liberia	374 niños <5 años con y sin diarrea	7,8%	8,4% en niños con diarrea vs 5,9 en asintomáticos	Hojlyng y col., 1986
Madagascar	215 niños de 0-27 meses con diarrea	5,6%	-	Areeshi y col., 2008
Malawi	848 niños <5 años con diarrea	5,9%	-	Morse y col., 2007
Mali	112 pacientes VIH+	25,7%	Con terapia antirretroviral	Minta y col., 2007
México	5459 niños <6 años con diarrea	5,1%	-	Larrosa-Haro y col., 2010
Mongolia	165 personas asintomáticas	1,2%	-	Huh y col., 2006
Myanmar	203 niños con diarrea	3,4%	Predominio en niños <11 meses	Aye y col., 1994
Nicaragua	272 niños de 4-15 años asintomáticos	35,7%	-	Muñoz-Antolí y col., 2011
Níger	334 niños <5 años hospitalizados	5,7%	6,1% en niños diarreicos; 5,5% en niños malnutridos	Gay-Andrieu y col., 2007

Tabla 4. (Continuación)

País	Población	Prevalencia	Observaciones	Referencia
Nigeria	96 pacientes VIH+ con y sin diarrea	54,2%	-	Ojurongbe y col., 2011
	692 niños de 19,5-72 meses	19,4%	-	Molloy y col., 2011
Pakistán	334 pacientes adultos con y sin diarrea	4,0%	3,9% en pacientes con diarrea crónica; 4,2% en pacientes sin diarrea	Yakoob y col., 2010
Palestina	760 niños <13 años con diarrea	11,6%	-	Abu-Alrub y col., 2008
Papua Nueva Guinea	1526 niños con diarrea	10,0%	2,2% en niños asintomáticos	Howard y col., 2000
Perú	533 niños	20,5%	Seguimiento durante un periodo de 4 años	Cama y col., 2008
República Democrática del Congo	175 pacientes >15 años hospitalizados con SIDA	9,7%	87 pacientes (49,7%) con diarrea	Wumba y col., 2010
Rumania	92 niños hospitalizados	12,0%	-	Brannan y col., 1996
Senegal	594 personas VIH+ y VIH-, con y sin diarrea	3,0%	8,2% en pacientes VIH+ con diarrea	Gassama y col., 2001
Sierra Leona	178 niños desnutridos	10,0%	-	Gbakima y col., 2007
Sri Lanka	354 niños	0,3%	-	de Silva y col., 1994
Sudáfrica	525 pacientes hospitalizados y 225 niños de escuelas primarias	25,5%	-	Samie y col., 2009
Sudán	100 niños con diarrea	16,0%	-	Adam y col., 1994
Tailandia	90 pacientes inmunocomprometidos	30,0%	-	Saksirisampant y col., 2009
Tanzania	280 niños <5 años hospitalizados con diarrea	18,9%	-	Moyo y col., 2011
Túnez	633 niños <5 años asintomáticos y 75 adultos inmunodeficientes hospitalizados	2,7%	1,7% en niños y 10,7 en adultos	Essid y col., 2008
Uganda	2446 niños <5 años hospitalizados con diarrea	25,0%	-	Tumwine y col., 2003
Venezuela	190 manipuladores de alimentos	11,8%	-	Freites y col., 2009
Vietnam	53 niños <5 años con diarrea	3,8%	-	Pham y col., 2007
Yemen	503 personas de 1-80 años	1,0%	-	Alyousefi y col., 2011
Zambia	403 niños de 25-84 meses	28,0%	-	Siwila y col., 2010
Suazilandia	48 niños hospitalizados con diarrea	4,2%	-	Dlamini y col., 2005
Zimbabue	500 pacientes con diarrea	5,8%	-	Simango y Mutikani, 2004

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

1.1. Obtención de los aislados ooquisticos

Se utilizaron diversos aislados ooquisticos obtenidos a partir de muestras fecales recogidas directamente del recto de terneros de raza Frisona menores de 15 días e infectados naturalmente. Las muestras se seleccionaron tras la realización de una tinción negativa directa con fucsina fenicada (Heine, 1982) al presentar un promedio superior a 10 ooquistes de *Cryptosporidium* sp. por campo microscópico 100 \times , valor obtenido tras la observación de 20 campos microscópicos elegidos al azar (criterio establecido en anteriores estudios como indicativo de infección grave) (Castro Hermida, 2002). Las muestras se conservaron en cámara fría a 4 °C, en igual volumen de solución acuosa de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) al 5%.

Tinción de Heine (1982)

Sobre portaobjetos desengrasados se colocan volúmenes similares de heces y fucsina fenicada; se homogeniza la mezcla y la extensión realizada se deja secar a temperatura ambiente. La observación microscópica (100 \times) se realiza en un tiempo inferior a 15 minutos (Figura 10.A)

Concentración

- Se homogenizan en un mortero alícuotas de las heces conservadas en $K_2Cr_2O_7$ al 5%. Se tamizan a través de mallas con diámetro de poro de 150 y 45 μ m. El $K_2Cr_2O_7$ se elimina por sucesivos lavados en tampón fosfato salino (PBS) 0,04 M pH 7,2 (Apéndice) mediante centrifugación a 1250 \times g, a 4 °C, durante 5 minutos.
- Se realizan concentraciones difásicas en PBS 0,04 M pH 7,2/éter etílico (2:1) hasta la total extracción de restos lipídicos por centrifugación a 1250 \times g, a 4 °C, durante 5 minutos.
- Los restos de éter etílico se eliminan mediante sucesivos lavados del sedimento obtenido con PBS 0,04 M pH 7,2 por centrifugación a 1250 \times g, a 4 °C, durante 5 minutos.
- El sedimento obtenido se resuspende en PBS 0,04 M pH 7,2 y se adiciona igual volumen de solución acuosa de $K_2Cr_2O_7$ al 5%. Se conserva a 4 °C hasta su purificación.

Purificación

- Los ooquistes previamente concentrados y conservados a 4 °C en $K_2Cr_2O_7$ al 5% se lavan dos veces con PBS 0,04 M pH 7,2 mediante centrifugación a 1250 \times g, a 4 °C, durante 5 minutos.

- El sedimento obtenido se purifica mediante gradientes discontinuos de cloruro de cesio (CsCl) de densidades 1,40; 1,10; y 1,05 g/ml (Kilani y Sekla, 1987) (Apéndice). En un tubo graduado de fondo cónico de 10 ml se pipetea 1 ml de cada una de las disoluciones de CsCl por orden decreciente de densidad y se añade 1 ml de la suspensión ooquistica. A continuación, se centrifuga a 1250×g, a 4 °C, durante 60 minutos (Figura 10.B)
- Se aspira la banda situada entre las disoluciones de densidad 1,10 y 1,05 g/ml.
- Los restos de CsCl se eliminan mediante varios lavados en PBS 0,04 M pH 7,2 mediante centrifugación a 1250×g, a 4 °C, durante 10 minutos (Figura 10.C)

Cuantificación

El recuento de ooquistes se realiza en un hemacitómetro (cámara de Neubauer, 40×) utilizando una disolución acuosa de verde malaquita al 0,16% como contracolorante (Apéndice) (Figura 10.D).

1.2. Caracterización molecular

1.2.1. Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción del ADN a partir del material biológico de acuerdo con el método descrito por Patel y col. (1998) y modificado por McLaughlin y col. (1999). El protocolo aplicado incluye la agitación con perlas de circonio para facilitar la destrucción de la pared ooquistica y diversas modificaciones del procedimiento original de extracción de ácidos nucleicos descrito por Boom y col. (1990).

1.2.2. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de 341 pares de bases (pb) del gen que codifica una proteína de la membrana externa de la pared ooquistica de *Cryptosporidium* (gen *cowp*) de acuerdo con Amar (2003). Dicha técnica de PCR se realizó en dos etapas (PCR anidada), constituida cada una de ellas por una reacción independiente, incluyéndose controles positivos y negativos en todos los ensayos. En la primera etapa se amplificó un fragmento de 430 pb del gen *cowp* presente en un amplio rango de especies de *Cryptosporidium* usando los cebadores PCOWPF y PCOWPR. La reacción de amplificación se realizó con 5 µl del ADN extraído; 1 µl de tampón de PCR 10×; 2,5 nmol de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP); 3 pmol de cada oligonucleótido; 20 nmol de cloruro mágnésico (MgCl₂); y 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline Ltd., Londres, Reino Unido) en un volumen final de 10 µl. Los tubos con

las mezclas correspondientes se sometieron a una fase de desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante un minuto seguida de 25 ciclos de amplificación (94 °C durante 20 segundos; 50 °C durante 30 segundos; 72 °C durante un minuto) y de una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

En la segunda etapa se amplificó un segmento interno de 341 pb del fragmento del gen *cowp* anteriormente amplificado, empleando los cebadores PCOWPIF y PCOWPIR. La reacción de amplificación se realizó utilizando 10 µl del producto amplificado en la primera etapa (diluido 1:10 en agua para biología molecular); 2 µl de tampón de PCR 10×; 5 nmol de cada dNTP; 20 pmol de cada oligonucleótido; 30 nmol de MgCl₂; y una unidad de *Taq* ADN polimerasa en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la reacción consistieron en una desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante un minuto, 33 ciclos de amplificación (94 °C durante 20 segundos; 56 °C durante 30 segundos; 72 °C durante un minuto) y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos obtenidos mediante la técnica de PCR se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co., San Luis, Misuri, Estados Unidos) y aplicando un voltaje de 4 V/cm durante una hora en tampón de electroforesis TAE 1× (Apéndice). Los ácidos nucleicos se visualizaron empleando un transiluminador ultravioleta (Gel Doc™ XR, Bio-Rad Laboratories).

1.2.3. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (técnica de RFLP)

Los productos obtenidos de la amplificación mediante la técnica de PCR descrita anteriormente se sometieron a un proceso de digestión con los enzimas *RsaI* y *AluI* (Stratagene, La Jolla, California, Estados Unidos) que reconocen puntos de restricción AG↓CT y GT↓AC (5'→3'), respectivamente, originando fragmentos de diferente tamaño en función del número y localización de los puntos de corte en la secuencia amplificada. La técnica de RFLP se llevó a cabo mediante la incubación, a 37 °C durante 4 horas, de 5-10 µl del producto obtenido por la técnica de PCR con 5 unidades de cada uno de los enzimas de restricción en tampón universal 1× (Stratagene) y en un volumen final de 30 µl (Amar, 2003). Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3,2% (p/v) en tampón TAE 1× teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) aplicando un voltaje de 3,5 V/cm durante 3 horas. Los fragmentos se visualizaron utilizando un transiluminador ultravioleta (Gel Doc™ XR, Bio-Rad Laboratories) (Figura 10.E).

1.2.4. Secuenciación del ADN

Los productos de PCR se purificaron en columnas de centrifugación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenciaron de acuerdo con el procedimiento de Sanger y col. (1977) utilizando CEQTM-Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, Estados Unidos); 50-500 ng de ADN; y 3,2 pmoles del cebador correspondiente (PCOWPIF o PCOWPIR). El programa de termociclado consistió en una desnaturalización a 96 °C durante 20 segundos; una hibridación a 50 °C durante 20 segundos; y 4 minutos de elongación a 60 °C, repitiéndose este ciclo un total de 30 veces. Cada muestra se secuenció en ambas direcciones por duplicado. Los productos de la reacción de secuenciación se separaron y analizaron en un secuenciador automático CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon utilizando los programas informáticos BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (©1997-2004, Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, California, Estados Unidos) y Chromas v.2.3 (©1998-2004, Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) y se compararon con otras secuencias de especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) usando el programa BLAST v.2.2.22 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

1.3. Determinación de la viabilidad ooquistica

1.3.1. Técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico yoduro de propidio (IP)

La potencial viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* se determinó mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (Sigma-Aldrich Co.) de acuerdo con Campbell y col. (1992). Esta técnica se modificó con la incorporación de un ensayo de inmunofluorescencia directa (IFD) empleando anticuerpos monoclonales con el fin de facilitar la identificación ooquistica (Dowd y Pillai, 1997).

- El sedimento obtenido a partir de las muestras se resuspende en 100 µl de solución balanceada de Hanks (HBSS) (Sigma-Aldrich Co.) y se incuba con 10 µl de solución de trabajo de IP (Apéndice) a 37 °C durante 10 minutos (tiempo óptimo establecido para producir la máxima adquisición del colorante).

- A continuación, se realizan dos lavados con PBS 0,04 M pH 7,2 a 10000×g, a 4 °C, durante 5 minutos y la muestra se incuba durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda con 30 µl de anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Aqua-Glo G/C Direct, Waterborne, Inc., Nueva Orleans, Luisiana, Estados Unidos).

- Bajo microscopio de epifluorescencia (AX70, Olympus Optical Co. Ltd., Tokio, Japón/Eclipse 50i Nikon Co., Tokio, Japón) equipado con contraste de fases y filtro azul de banda ancha (excitación 450-480 nm; barrera 515 nm) se identifican los ooquistes y, a continuación, se examina la inclusión/exclusión del colorante IP bajo filtro verde de banda ancha (excitación 510-550 nm; barrera 590 nm), cuantificándose las proporciones de ooquistes IP positivos (inviabiles) e IP negativos (potencialmente viables) (Figura 10.F-H).

1.3.2. Valoración del desenquistamiento espontáneo

El desenquistamiento espontáneo, fenómeno descrito por Smith y col. (2005), consiste en que los esporozoítos de *C. parvum* pueden desenquistarse en un pequeño porcentaje cuando los ooquistes se incuban a 37 °C en ausencia de cualquier otro estímulo, haciendo por tanto imposible su supervivencia al encontrarse en un ambiente diferente al que le ofrecería un hospedador susceptible.

Para valorar dicho fenómeno, alícuotas de 10 µl de las muestras se observaron bajo microscopía óptica de contraste de fases (40×) (BH2, Olympus Optical Co. Ltd./Eclipse 50i Nikon Co.). Las proporciones de paredes ooquisticas (ooquistes vacíos), de ooquistes parcialmente desenquistados y de ooquistes enteros se cuantificaron por duplicado tras la observación de 200-400 estructuras ooquisticas (Figura 10.I) El porcentaje de desenquistamiento espontáneo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Desenq. espontáneo(\%)} = \frac{\text{ooquistes vacíos (n)} + \text{ooquistes parcialmente desenquistados (n)}}{\text{estructuras ooquisticas (n)}} \times 100 \quad [\text{Ec. 4}]$$

1.3.3. Cálculo de la viabilidad global

Teniendo en cuenta que los ooquistes desenquistados total o parcialmente y los ooquistes IP positivos no son viables, se estableció el parámetro *viabilidad global*, cuyo cálculo se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad global (\%)} = \frac{\text{ooquistes enteros (\%)} \times \text{ooquistes IP negativos (\%)}}{100} \quad [\text{Ec. 5}]$$

1.3.4. Técnica de desenquistamiento inducido

Se aplicó una técnica de desenquistamiento optimizada en nuestro Laboratorio por Vergara Castiblanco (1999).

- Suspensiones de 2×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* previamente lavados con solución salina fisiológica, se someten a un tratamiento con líquido de digestión (Apéndice) durante 30 minutos, a 37 °C, en agitación suave en un incubador orbital.
- A continuación, las suspensiones se neutralizan con bicarbonato sódico al 2,2% (Apéndice) y se adicionan 0,022 g de taurocolato sódico (Sigma-Aldrich Co.) y 0,004 g de tripsina bovina (Sigma-Aldrich Co.), para de nuevo incubar durante 90 minutos, a 37 °C, en agitación suave.
- Finalmente, las suspensiones se centrifugan a $1250 \times g$, a 4 °C, durante 5 minutos.
- Alícuotas de 10 μ l del sedimento obtenido se observan microscópicamente bajo contraste de fases con el objetivo 40 \times (BH2, Olympus Optical Co., Ltd.). Se consideran ooquistes viables aquéllos total o parcialmente desenquistados, cuya proporción, expresada en porcentaje, se determina tras varios recuentos de más de 100 estructuras ooquisticas: ooquistes vacíos, ooquistes parcialmente desenquistados y ooquistes enteros (figura 10.I). El porcentaje de desenquistamiento inducido se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Desenq. inducido (\%)} = \frac{\text{ooquistes vacíos (n)} + \text{ooquistes parcialmente desenquistados (n)}}{\text{estructuras ooquisticas (n)}} \times 100 \quad [\text{Ec. 6}]$$

1.3.5. Bioensayos en ratón

Se utilizaron camadas de ratones Swiss CD-1 suministradas por el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). En todos los ensayos se emplearon animales con un peso corporal comprendido entre 2,5-3,0 g (3-4 días de edad). Las camadas con sus respectivas madres se mantuvieron separadas en jaulas de plástico a una temperatura aproximada de 20 °C. Diariamente recibieron un pienso comercial (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, Francia) y agua, manteniéndose bajo unas condiciones higiénicas adecuadas de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos [BOE (núm. 252) de 21 de octubre de 2005].

Los ratones se separaron de sus madres al menos una hora antes de ser inoculados intragástricamente con una dosis de 25000 ooquistes/ratón utilizando para ello una micropipeta de volumen fijo de 100 μ l y devolviéndolos de nuevo con ellas en sus jaulas hasta el momento del sacrificio (Figura 10.J-L). A los 7 días post-inoculación (pi), día de

máxima producción ooquistica establecido en estudios previos (Villacorta y col., 1988), se sacrificaron los animales y los intestinos se recogieron individualmente sobre 5 ml de PBS 0,04 M pH 7,2. A continuación, se trituraron utilizando un homogenizador de barras (Ultra-Turrax® T10, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) y la producción ooquistica se cuantificó en cámara de Neubauer previa dilución del homogenizado intestinal (1:10) con solución de verde malaquita al 0,16%.

La infectividad se definió como el porcentaje de animales infectados por camada y la intensidad de infección como el número de ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado.

2. AGUAS TURBIAS

Para la preparación de las muestras de agua con distintos niveles de turbidez se utilizó un suelo rojo, recogido en una zona próxima al circuito de pruebas de la empresa Michelin (Níjar, Almería), cuya composición es muy similar a la de los suelos de las regiones tropicales (Figura 10.M) (Patrick, 1980). El análisis edafológico realizado por el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la USC se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis edafológico del suelo rojo recogido en Níjar, Almería.

pH (agua)	8,61	Carbono Orgánico Total	0,395%
pH (KCl)	7,58	Nitrógeno Total	0,048%
P-CIH	50,93 mg/Kg	Relación C/N	8,2
P-CO ₃ H ⁻	14,93 mg/Kg	Fe ₂ O ₃	0,060%
P _{inorganic} ⁻ -CO ₃ H ⁻	10,62 mg/Kg	Al ₂ O ₃	0,162%
P _{organic} ⁻ -CO ₃ H ⁻	4,31 mg/Kg	Carbonatos	8,1%
Análisis granulométrico			
	Sin destrucción de carbonatos		Con destrucción de carbonatos
Arena (500-50 µm)	33%		37%
Limo grueso (50-20 µm)	9%		7%
Limo fino (20-2 µm)	13%		20%
Arcilla (<2 µm)	44%		36%
Mineralogía de la fracción arcilla			
Minerales dominantes		Illita, Halloisita	
Minerales subdominantes		Calcita	

Las muestras de agua turbia se prepararon por adición de distintas cantidades de suelo, previamente tamizado (diámetro de poro de 500 μm), a agua destilada hasta conseguir los niveles de turbidez requeridos y determinados mediante un turbidímetro TN-100 (Eutech Instruments Pte. Ltd., Singapur). Así, las suspensiones turbias de 5; 30; 100; y 300 UNF se obtuvieron añadiendo 0,3; 3,2; 7,0; y 13,0 g de suelo, respectivamente, a 500 ml de agua destilada y manteniendo dichas suspensiones en agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las suspensiones se dejaron en reposo durante una hora, al cabo de la cual se recogió el sobrenadante de cada una de las muestras (400 ml) y se ajustó la turbidez de los mismos a los niveles requeridos mediante la adición de agua destilada. Las suspensiones finales se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 827 kPa y se almacenaron a 4-8 °C (Gómez Couso y Ares Mazás, datos no publicados). El citado Departamento de Edafología y Química Agrícola realizó los análisis fisicoquímicos correspondientes a las muestras de aguas turbias de 5; 100; y 300 UNF que se muestran en la Tabla 6 (Figura 10.N).

Tabla 6. Análisis fisicoquímico de las muestras de agua con diferentes niveles de turbidez preparadas con el suelo rojo recogido en Níjar, Almería.

	pH ^a	DOC	P-CO ₃ H ^{-a}	P _{inorgánico} -CO ₃ H ^{-a}	P _{orgánico} -CO ₃ H ^{-a}	Color ^b
	mg/l					
5 UNF	7,01	0,7	0,004	0,000	0,004	0,6Y 9,4/1,0
100 UNF	7,41	6,0	0,055	0,013	0,042	6,1YR 6,5/8,3
300 UNF	7,47	12,2	0,254	0,021	0,232	3,8YR 5,3/6,6

^aParámetros determinados en muestras filtradas.
^bEscala Munsell.

3. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* EN CONDICIONES SIMULADAS DE RADIACIÓN SOLAR

La influencia que ciertos factores ambientales (turbidez del agua e intensidad de radiación), así como el tiempo de exposición, tienen sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* durante los procesos de desinfección solar del agua de bebida se determinó mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP y de bioensayos en ratón (Apartados 1.3.1. y 1.3.5., respectivamente).

3.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial 2×3 de primer orden (Box y col., 1978) que permite evaluar los efectos de los factores estudiados y detectar las interacciones entre los mismos, además de ofrecer una gran precisión facilitando el modelaje del sistema (Goupy, 1988; Miron y col., 1988).

El análisis de la varianza (ANOVA) permitió detectar los efectos significativos de los factores estudiados sobre la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* determinada *in vitro* e *in vivo*. Los factores que mostraron efectos significativos se modelaron por medio del método de regresión múltiple de mínimos cuadrados. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa informático Statgraphics® Plus v.5.1 (©1994-2001 Statistical Graphics Corporation, Herndon, Virginia, Estados Unidos).

Para establecer el diseño factorial es necesario construir una matriz experimental con los valores de los factores experimentales codificados. Estos valores codificados pueden descodificarse y obtener los correspondientes valores experimentales (Tabla 7).

Tabla 7. Valores experimentales y codificados de las tres variables investigadas.^{a, b}

Valor codificado	Valor real		
	Turbidez (UNF)	Intensidad de radiación (W/m ²)	Tiempo de exposición (horas)
-1	5	200	4
0	100	600	8
1	300	900	12

^aCodificación: $V_c = (V_n - V_o) / \Delta V_n$.
 V_c : valor codificado; V_n : valor real; V_o : valor real en el centro del dominio; ΔV_n : incremento en V_n correspondiente a una unidad de V_c .
^bDescodificación: $V_n = V_o + (\Delta V_n \times V_c)$.

En la realización de los experimentos se utilizó un simulador de radiación solar provisto de una lámpara de arco de xenón de 1000 W (Oriel Corp., Stratford, Conética, Estados Unidos) y equipado con un filtro de la radiación UV (barrera 320 nm) (Oriel Corp.) (Figura 11.A₁). La radiación se ajustó con un medidor de potencia óptica (modelo 200/10+; Coherent, Cambridge, Reino Unido) a intensidades de radiación global de 200; 600; y 900 W/m², que equivalen aproximadamente a las intensidades de radiación solar descritas para áreas ecuatoriales en días totalmente nublados, parcialmente nublados y soleados, respectivamente (Joyce y col., 1996; McGuigan y col., 1998).

Tubos universales, transparentes y estériles, de poliestireno de 30 ml (Barloworld Scientific, Stone, Reino Unido) se llenaron con muestras de agua con niveles de turbidez de 5; 100; y 300 UNF y se contaminaron con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum*. Los tubos se agitaron con el fin de asegurar la máxima distribución de los ooquistes y favorecer la oxigenación de la muestra y se expusieron a las diferentes intensidades de radiación solar simulada (200; 600; y 900 W/m²) durante los distintos periodos de tiempo establecidos (4; 8; y 12 horas). A lo largo de los ensayos, las muestras se mantuvieron a una temperatura constante de 30 °C mediante la inmersión horizontal de los tubos en un baño de agua, de forma que la mitad inferior de los mismos permaneciese en contacto con ésta, mientras que la mitad superior quedase totalmente expuesta a la radiación solar simulada (McGuigan y col., 2006). Los correspondientes controles se realizaron recubriendo los tubos con papel de aluminio para así evitar que la radiación incidiese sobre las muestras. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2. Evaluación de la supervivencia ooquistica

Después de cada periodo de exposición, las muestras se centrifugaron a $1250 \times g$, a 4 °C, durante 10 minutos y los sedimentos obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (Apartado 1.3.1.) y la infectividad en el modelo murino lactante descrito (Apartado 1.3.5.).

4. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO BOTELLAS PET

El estudio se realizó durante los meses de julio y octubre de 2007 en la Plataforma Solar de Almería (PSA), perteneciente al Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Ciencia e Innovación y situada en el Desierto de Tabernas, Almería (latitud, 37°05'54" N; longitud, 2°21'32" O; altitud, 500 m).

El Servicio de Radiometría de la PSA nos proporcionó los datos de radiación solar incidente alcanzada durante los ensayos y correspondiente a la radiación solar global de longitud de onda corta comprendida en el rango espectral de 310-2800 nm y medida utilizando un piranómetro (modelo CMP 21, Kipp & Zonen, Delft, Países Bajos). De igual forma, dicho Servicio nos suministró los datos de radiación UV (directa y difusa) medida entre 295-385 nm (parte de la radiación UV-A y UV-B) empleando un radiómetro UV (CUV 3, Kipp & Zonen) orientado horizontalmente.

La radiación solar global o UV acumuladas, definidas como la energía que recibe la muestra por unidad de superficie, se calcula integrando la media de la radiación solar global o UV medidas a diferentes tiempos de exposición como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Dosis_{Global;UV} = \int_{t_2}^{t_1} Radiación_{Global;UV} \cdot dt \quad [Ec. 7]$$

donde $Dosis_{Global;UV}$, es la radiación solar global o UV acumuladas expresada en J/m^2 ; $Radiación_{Global;UV}$, es la radiación solar global o UV que recibe la muestra expresada en W/m^2 ; y t , tiempo expresado en segundos.

4.1. Evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar

Se determinó el efecto que, conjuntamente, ejercen los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* durante el proceso de desinfección solar del agua de bebida. Para ello, botellas PET de 1,5 l de capacidad, transparentes y limpias, se llenaron con aguas de 0; 5; 100; y 300 UNF de turbidez y a continuación se contaminaron con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum*. Las botellas se agitaron vigorosamente durante 10-30 segundos con el fin de asegurar la máxima distribución de los ooquistes y favorecer la oxigenación de las muestras. Posteriormente, se expusieron a la radiación solar durante 4; 8; y 12 horas en uno de los tejados de las instalaciones de la PSA (Figura 11.B). Los tiempos de exposición se establecieron de forma que la mitad de cada ensayo coincidiese con el mediodía solar, aproximadamente a las 14:00 horas (hora local). Así, los ensayos de exposición de 4 horas se llevaron a cabo entre las 12:00-16:00 horas; los ensayos de 8 horas, entre las 10:00-18:00 horas; y los de 12 horas, entre las 8:00-20:00 horas. Además, se realizaron controles de exposición en oscuridad, en los que las botellas PET conteniendo aguas de 0 UNF contaminadas con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* se recubrieron con papel de aluminio y se expusieron a la radiación solar con las restantes muestras. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

A lo largo de los ensayos, la temperatura de las muestras se monitorizó cada hora mediante un termómetro (modelo HI 98509-1, Hanna Instruments, S.L., Eibar, España). Al final de cada periodo de exposición, las muestras se guardaron en el laboratorio, en oscuridad y a 20 °C, condiciones que no afectan a la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* (Peng y col., 2008).

Finalmente, las muestras se concentraron en un volumen final de 10 ml mediante filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro 2 μm) utilizando para ello la unidad de concentración del equipo Filta-Max[®] (IDEXX Laboratorios, Inc., Westbrook, Maine, Estados Unidos). Alícuotas de un mililitro de cada una de las muestras se centrifugaron a $10000\times g$, a 4 °C, durante 5 minutos y los sedimentos obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (Apartado 1.3.1.).

4.2. Evaluación del efecto óptico de la radiación solar

Se valoró el efecto que el componente óptico de la radiación solar ejerce sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*. Para ello, botellas PET de 1,5 l de capacidad, transparentes y limpias, conteniendo aguas con los niveles extremos de turbidez (0 y 300 UNF) contaminadas con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum*, se expusieron a la radiación solar natural durante 4; 8; y 12 horas a temperatura controlada. Así, las botellas se colocaron en un baño de agua, de tal forma que la mitad inferior quedase sumergida, mientras que la superior estuviese expuesta a la radiación solar (Figura 11.C). Durante las exposiciones, la temperatura del agua se mantuvo entre 20-25 °C mediante la adición de hielo al baño. Al final de cada periodo de exposición, el procesamiento de las muestras y la valoración de la supervivencia ooquistica se realizó como se describe en el apartado anterior.

4.3. Evaluación del efecto térmico de la radiación solar

Con el fin de evaluar tan sólo el efecto que el componente térmico de la radiación solar ejerce sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*, se simularon en el laboratorio los perfiles de temperatura media registrados en el interior de las botellas PET durante los ensayos de evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar (Apartado 4.1.). Para ello, tubos de microcentrifuga de 1,5 ml conteniendo un mililitro de agua destilada contaminada con 2×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* se expusieron, tras permanecer una hora a temperatura ambiente (18-20 °C), a los diferentes perfiles de temperatura durante 4; 8; y 12 horas en un bloque seco de calor (Figura 11.D) (Uniequip GmbH, Dresde, Alemania), ajustándose la temperatura cada 30 minutos. Al final de cada periodo de exposición, las muestras se centrifugaron a $10000\times g$ durante 5 minutos y los sedimentos así obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (Apartado 1.3.1.); la valoración del desenquistamiento espontáneo (Apartado 1.3.2.); y el cálculo de la viabilidad

global (Apartado 1.3.3.). Para periodos de exposición de 4 horas, estos parámetros se determinaron cada hora, mientras que para los de 8 y 12 horas, se evaluaron cada dos horas. Además, al final de cada uno de los periodos de exposición se comprobó la infectividad ooquistica mediante bioensayos en ratón (Apartado 1.3.5.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4. Análisis estadístico

El programa informático GraphPad InStat® v.3.05 (©1992-2000 GraphPad Software, La Jolla, California, Estados Unidos) se empleó en el análisis estadístico de los datos. Las diferencias observadas en los valores de temperatura del agua alcanzados en el interior de las botellas PET durante la exposición a la radiación solar; en la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP; en los porcentajes de desenquistamiento espontáneo y de viabilidad global; y en las intensidades de infección para los diferentes niveles de turbidez del agua y/o tiempos de exposición se compararon utilizando métodos paramétricos de comparación de medias, concretamente el test de comparación múltiple SNK (Student-Newman-Keuls) y el de análisis de la varianza (ANOVA de una sola vía). Las diferencias se consideraron significativas para niveles de probabilidad de $P < 0,05$.

5. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO REACTORES SOLARES EQUIPADOS CON CPC

Los estudios se realizaron durante los meses de junio y julio de los años 2008 y 2009 utilizando sistemas de reactores solares equipados con CPC de diferentes características y disponibles en las instalaciones de la PSA. Al igual que en el Apartado 4, el Servicio de Radiometría nos proporcionó los datos de radiación solar incidente alcanzada durante los ensayos, calculándose la radiación solar global o UV acumulada de acuerdo con la Ec. 7. De forma similar y durante los ensayos, la temperatura del agua se monitorizó cada hora (modelo HI 98509-1, Hanna Instruments, S.L.).

5.1. Evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC

Durante el periodo comprendido entre el 15 de junio y el 10 de julio de 2008, se evaluó el empleo de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC en la desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.

Los reactores utilizados están constituidos por tubos de vidrio borosilicatado Duran® 3,3 (Schott AG, Mainz, Alemania) con una transmitancia del 90% y del 45% en el rango de las radiaciones UV-A y UV-B, respectivamente, y presentan las siguientes dimensiones: i) longitud de 150 cm; ii) diámetro de 5 cm; iii) espesor de la pared de 0,18 cm; y iv) volumen interno de 2,5 l. Uno de los extremos del reactor se encuentra completamente cerrado, mientras que el otro presenta una válvula a través de la cual se pueden recoger fácilmente las muestras.

Los CPC ensayados presentan las siguientes características:

- CPC1: i) apertura de 15,70 cm; ii) altura de 6,43 cm; iii) área de apertura de 0,210 m²; y iv) FC de la radiación solar de 1.

- CPC1,89: i) apertura de 29,70 cm; ii) altura de 19,37; iii) área de apertura de 0,375 m²; y iv) FC de la radiación solar de 1,89.

La superficie reflectante de ambos CPC se compone de láminas de aluminio anodizado 320G de 0,5 mm de espesor (Alanod Aluminium GmbH, Ennepetal, Alemania) y presenta una reflectividad del 82% para la radiación UV y del 85% para la restante radiación del espectro solar. El conjunto reactor-CPC se encuentra situado sobre una plataforma de aluminio orientada en el eje N-S con una inclinación, respecto a la latitud local, de 37° para el CPC1 y de 12° para el CPC1,89 (inclinaciones óptimas para captar la máxima radiación solar) (Figura 11.E,F) (Collares-Pereira y col., 2006; Navntoft y col., 2008).

Para la realización de los ensayos, los reactores se llenaron con aguas de 0; 5; y 100 UNF de turbidez, que se contaminaron con $7,5 \times 10^6$ ooquistes purificados de *C. parvum* ($2,5 \times 10^6$ ooquistes/l). Antes de colocar los reactores en el centro de la superficie reflectante del CPC correspondiente, se balancearon cuidadosamente durante 10-30 segundos con el fin de asegurar la máxima distribución de los ooquistes y favorecer la oxigenación de las muestras. A continuación, se expusieron a la radiación solar durante un tiempo máximo de 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas durante dos días consecutivos (11:00-17:00 horas, hora local). Al final de cada periodo de exposición, las muestras se guardaron en el laboratorio, en oscuridad y a 20 °C, condiciones que no afectan a la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* (Peng y col., 2008). A intervalos de 2 horas de exposición, se recogieron muestras de 50 ml, que se repusieron con igual cantidad de agua de la misma turbidez no contaminada y mantenida a temperatura ambiente con el fin de conservar el volumen de muestra irradiado. Las muestras se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 15 minutos y los sedimentos así obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica (Apartado 1.3.1.); valorar el desenquistamiento espontáneo (Apartado 1.3.2.); y realizar el cálculo de la viabilidad global (Apartado 1.3.3.). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

5.2. Evaluación de un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC

Durante el periodo comprendido entre los días 23 de junio y 8 de julio de 2009, se evaluó el empleo de un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC en la desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. El reactor utilizado consiste en un cilindro de metacrilato de las siguientes dimensiones: i) longitud de 92,5 cm; ii) diámetro de 20 cm; iii) espesor de la pared de 1 cm; y iv) volumen interno de 25 l. Dicho reactor presenta en la parte superior una cubierta desmontable del mismo material que permite rellenarlo con el agua a tratar, evitar pérdidas debidas a la evaporación y posibles contaminaciones ambientales. Además, en la parte inferior dispone de una válvula que facilita la toma de muestras y el vaciado del mismo.

El CPC incorporado presenta las siguientes características: i) apertura de 58 cm; ii) altura de 25,71 cm; iii) área de apertura de 0,58 m²; y iv) FC de la radiación solar de 1. La superficie reflectante está constituida por una lámina de aluminio anodizado altamente reflectante MIRO-SUN[®] (Alanod Aluminium GmbH) cuya reflectividad es del 87% para la radiación UV y del 90% para el resto de la radiación del espectro solar. El conjunto reactor-CPC se encuentra situado sobre una plataforma de aluminio orientada en el eje N-S con una inclinación con respecto a la latitud local de 37° (inclinación óptima para captar la máxima radiación solar) (Figura 11. G) (Ubomba-Jaswa y col., 2010).

Muestras de agua de 0; 5; y 30 UNF de turbidez se contaminaron con $2,5 \times 10^6$; 6×10^6 ; y 10×10^6 ooquistes/l de *C. parvum*, respectivamente, en contenedores de 30 l de capacidad, que se agitaron durante 10-30 segundos con el fin de asegurar la máxima distribución de los ooquistes y favorecer la oxigenación del agua, rellenándose posteriormente el reactor.

Las muestras se expusieron a la radiación solar durante un periodo máximo de 8 horas (10:00-18:00 horas, hora local). A intervalos de 2 horas de exposición, se recogieron del centro del reactor dos muestras de 50 ml, reponiéndose con igual volumen de agua no contaminada de la misma turbidez y mantenida a temperatura ambiente. El procesamiento de las muestras y la evaluación de la viabilidad ooquistica se llevó a cabo como se describe en el Apartado 5.1. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

5.3. Análisis estadístico

El programa informático GraphPad InStat[®] v.3.05 (©1992-2000 GraphPad Software) se empleó en el análisis estadístico de los datos. Las diferencias observadas en los valores de temperatura del agua alcanzados en el interior de los reactores durante la exposición a la radiación solar; en la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP; en los

porcentajes de desenquistamiento espontáneo y de viabilidad global, para los diferentes niveles de turbidez del agua y/o tiempos de exposición se compararon utilizando métodos paramétricos de comparación de medias, concretamente el test de comparación múltiple SNK (Student-Newman-Keuls) y el de análisis de la varianza (ANOVA de una sola vía). Las diferencias se consideraron significativas para niveles de probabilidad de $P < 0,05$.

6. RESISTENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* A TEMPERATURAS ALCANZABLES EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN SOLAR DEL AGUA

Durante los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de *C. parvum* y realizados en condiciones naturales de radiación solar se comprobó un notable incremento de la temperatura del agua. En este apartado se evalúa la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* cuando se exponen a temperaturas que se pueden alcanzar durante estos procesos.

Para ello, y utilizando un bloque seco de calor (Uniequip GmbH) (Figura 11.D), tubos de microcentrífuga de 1,5 ml conteniendo un mililitro de agua destilada contaminada con 2×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* se expusieron, tras permanecer una hora a temperatura ambiente (18-20 °C), a valores de temperatura de 37; 40; 42; 44; 46; 48; y 50 °C durante periodos de 2; 4; 6; 8; 10; y 12 horas. Al final de cada tiempo de exposición, las muestras se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 5 minutos y los sedimentos obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (Apartado 1.3.1.); valorar el desenquistamiento espontáneo (Apartado 1.3.2.); y calcular la viabilidad global (Apartado 1.3.3.). Además, y al mayor tiempo de exposición (12 horas), se evaluó la infectividad ooquistica mediante bioensayos en ratón (Apartado 1.3.5.). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

El programa informático GraphPad InStat® v.3.05 (©1992-2000 GraphPad Software) se empleó en el análisis estadístico de los datos. Las diferencias observadas en la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP; en los porcentajes de desenquistamiento espontáneo y de viabilidad global; y en las intensidades de infección para las diferentes temperaturas y/o tiempos de exposición se compararon utilizando métodos paramétricos de comparación de medias, concretamente el test de comparación múltiple SNK (Student-Newman-Keuls) y el de análisis de la varianza (ANOVA de una sola vía). Las diferencias se consideraron significativas para niveles de probabilidad de $P < 0,05$.

7. APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS EN LA DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM*

7.1. Empleo del fotocatalizador TiO₂

Mediante reactores equipados con CPC en modo recirculante, disponibles en las instalaciones de la PSA, se evaluó el uso del fotocatalizador TiO₂ en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. Los estudios se realizaron durante los días 9 y 10 de julio de 2009 y, al igual que en los Apartados 4 y 5, el Servicio de Radiometría nos proporcionó los datos de radiación solar incidente alcanzada durante los ensayos, calculándose la radiación solar global o UV acumulada de acuerdo con la Ec. 7. De forma similar y durante los ensayos, la temperatura del agua se monitorizó cada hora (modelo HI 98509-1, Hanna Instruments, S.L.).

El fotocatalizador utilizado (TiO₂ P25, Evonik Industries, Essen, Alemania) está fijado, en una proporción de 20 g/m², a una lámina sintética de fibra inorgánica de 460 μm de espesor y 80 g/m² de gramaje (Ahlstrom Research & Services, Helsinki, Finlandia) que, a su vez, envuelve un soporte tubular que se sitúa concéntricamente en el interior del reactor. Dicho reactor está constituido por dos tubos de vidrio borosilicatado Duran[®] 3,3 (Schott) equipados con sendos CPC1, de características y dimensiones similares a los utilizados en el Apartado 5.1. Los tubos se encuentran conectados en serie de forma que, y a partir de un depósito, el agua recircula por todo el sistema a un caudal máximo de 20 l/minuto impulsada por una bomba centrífuga de 20 W (Pan World, Barcelona, España). El depósito presenta en su parte superior una abertura a través de la cual se puede vaciar el sistema. Además, dispone de una válvula de salida que facilita la toma de muestras. Paralelamente, el sistema posee un segundo circuito que posibilita la realización simultánea de los ensayos control. El conjunto se encuentra situado sobre una plataforma de aluminio orientada en el eje N-S con una inclinación de 37° respecto a la latitud local y permite tratar un volumen de agua de 14 l, siendo el volumen irradiado de 4,7 l (Figura 11.H) (Collares-Pereira y col., 2006).

Volúmenes de 7 l de agua destilada contaminada con ooquistes purificados de *C. parvum* (5×10⁶ ooquistes/l) se expusieron, simultáneamente en presencia y ausencia del fotocatalizador, a la radiación solar durante un tiempo de 8 horas (10:00-18:00 horas, hora local) en cada uno de los dos circuitos que componen el sistema. A intervalos de 2 horas de exposición, se recogieron dos muestras de 50 ml de cada uno de los circuitos, cuyo procesamiento y evaluación de la viabilidad ooquistica se llevó a cabo como se describe en el Apartado 5.1. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

7.2. Empleo del oxidante H₂O₂

En este estudio se evaluó, en condiciones naturales y simuladas de radiación solar, la utilización del H₂O₂ en la desinfección solar de aguas contaminadas experimentalmente con ooquistes de *C. parvum*. Para la realización de los ensayos se utilizó una concentración de 500 mg/l de H₂O₂ (Honeywell Riedel-de Haën[®], Seelze, Alemania; Sigma-Aldrich, Co.) que se valoró mediante el método colorimétrico del oxisulfato de titanio (TiOSO₄), empleado habitualmente en el análisis del agua de bebida y cuyo límite de detección es de 0,1 mg/l (Adán Delgado, 2008). El fundamento del método reside en que el TiOSO₄ reacciona estequiométricamente con el H₂O₂ presente en la muestra formando un complejo TiOSO₄-H₂O₂ de color amarillo cuya absorbancia máxima se encuentra a una longitud de onda de 410 nm, siendo fácilmente determinable mediante métodos espectrofotométricos al existir una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de H₂O₂ en el rango de 0,1-100 mg/l. El protocolo consiste en adicionar 0,5 ml de una disolución comercial de TiOSO₄ 1,9-2,1 % p/v (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Co.) a 5 ml de muestra diluida en la proporción 1:10. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente la absorbancia se determina a 410 nm (T-60-U, PG Instruments Ltd., Wibtoft, Reino Unido; NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos) y la concentración de H₂O₂ se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$y = 51,731 \times Abs - 0,024 \quad [Ec. 8]$$

donde y , es la concentración de H₂O₂ en mg/l y Abs , el valor de absorbancia a 410 nm.

7.2.1. En condiciones naturales de radiación solar

En las instalaciones de la PSA y durante el periodo comprendido entre los días 7-13 de julio de 2010, reactores de vidrio borosilicatado Duran[®] de 500 ml de capacidad (Schott AG) conteniendo 250 ml de agua destilada contaminada con ooquistes purificados de *C. parvum* (10×10⁶ ooquistes/l), se expusieron en agitación y en presencia de H₂O₂ (500 mg/l) a la radiación solar natural durante 5 horas (11:00-16:00 horas, hora local). Paralelamente, se realizaron los correspondientes controles sin H₂O₂ y de exposición en oscuridad, recubriendo los reactores con papel de aluminio (Figura 11.I).

El correspondiente Servicio de Radiometría, al igual que en los Apartados 4 y 5, nos proporcionó los datos de radiación solar incidente alcanzada durante los ensayos, calculándose la radiación solar global o UV acumulada de acuerdo con la Ec. 7. De forma similar, cada hora se monitorizó la temperatura del interior del reactor mediante un

termómetro (modelo HI 98509-1, Hanna Instrument, S.L.) y la concentración de H₂O₂ de acuerdo con el método descrito anteriormente. A intervalos de 2,5 horas de exposición, se recogieron 15 ml de las muestras para la evaluación de la viabilidad ooquistica tal y como se describe en el Apartado 5.1. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

7.2.2. En condiciones simuladas de radiación solar

Para la realización de estos ensayos se utilizó un simulador de radiación solar provisto de una lámpara de arco de Xenón de 1100 W (SUNTEST CPS+, ATLAS Material Testing Technology GmbH, Lisengericht, Alemania) y equipado con un filtro de radiación UV (Suprax, ATLAS Material Testing Technology GmbH) (barrera 290 nm). La intensidad de la radiación global se ajustó a 350 W/m² (~33 W/m² de UV) mediante un microprocesador incorporado al equipo. De igual forma, se ajustó una temperatura máxima de la cámara de exposición de 40 °C (Figura 11.A₂).

Reactores de vidrio borosilicatado Pyrex[®] de 25 ml (Barloworld Scientific, Stone, Reino Unido) conteniendo muestras de agua destilada contaminada con 7×10⁶ ooquistes purificados de *C. parvum* se expusieron a la radiación solar simulada y en presencia de H₂O₂ (500 mg/l) durante 5 horas. Paralelamente, se realizaron los correspondientes controles sin H₂O₂ y en oscuridad. Cada hora se monitorizó la concentración de H₂O₂ de acuerdo con el método descrito anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

A intervalos de 2,5 horas de exposición las muestras se centrifugaron a 1250×g, a 4 °C, durante 10 minutos. Los sedimentos así obtenidos se utilizaron para determinar la viabilidad ooquistica mediante las técnicas descritas en el Apartado 1.3.

7.3. Análisis estadístico

El programa informático GraphPad InStat[®] v.3.05 (©1992-2000 GraphPad Software) se empleó en el análisis estadístico de los datos. Las diferencias observadas en la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP; en los porcentajes de desenquistamiento espontáneo e inducido y de viabilidad global, así como en las intensidades de infección, para los dos tiempos de exposición establecidos, se compararon utilizando métodos paramétricos de comparación de medias, concretamente el test de comparación múltiple SNK (Student-Newman-Keuls) y el de análisis de la varianza (ANOVA de una sola vía). Las diferencias se consideraron significativas para niveles de probabilidad de $P < 0,05$.

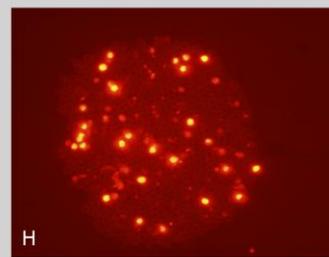
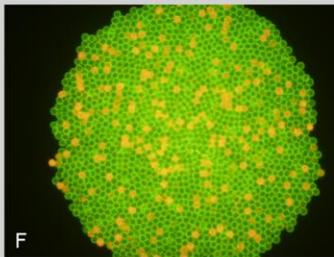
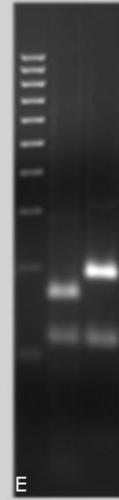
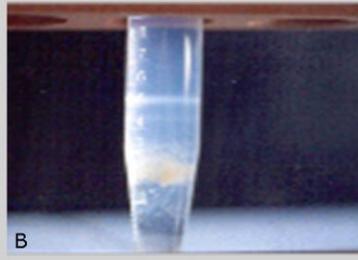
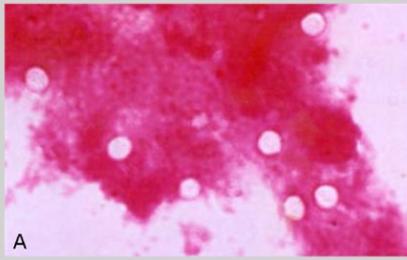




Figura 10. Ilustración del material y de los métodos utilizados (I).

A, técnica de Heine; B y C, purificación de ooquistes en gradientes discontinuos de cloruro de cesio; D, cuantificación ooquistica; E, caracterización molecular del aislado de *Cryptosporidium* sp.; F, identificación ooquistica mediante IFD; G, observación microscópica bajo contraste diferencial de fases; H, técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP; I, ooquistes enteros y paredes ooquisticas; J, animalario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la USC; K y L, bioensayos en ratones lactantes; M, suelo rojo recogido en Níjar, Almería; N, preparación de aguas turbias.

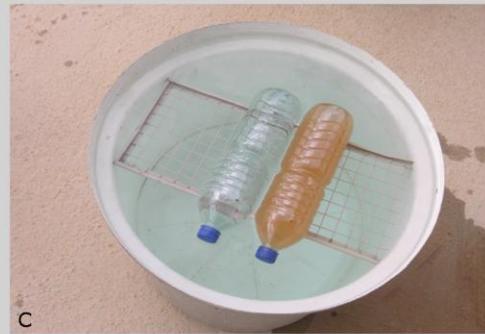




Figura 11. Ilustración del material y de los métodos utilizados (II).

A, simuladores de radiación solar; B, botellas PET expuestas a la radiación solar en la PSA; C, evaluación del efecto óptico de la radiación solar; D, bloque seco utilizado en los ensayos del efecto térmico de la radiación solar; E y F, reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1 y CPC1,89, respectivamente; G, reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC; H, reactor solar equipado con CPC1 en modo recirculante utilizado en los ensayos de fotocátalisis con TiO_2 ; I, evaluación del H_2O_2 en condiciones naturales.

RESULTADOS

1. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* EN CONDICIONES SIMULADAS DE RADIACIÓN SOLAR

Mediante un diseño factorial 2×3 de primer orden y bajo condiciones simuladas de radiación solar, se evaluó la influencia que la turbidez del agua (5; 100; y 300 UNF), la intensidad de radiación (200; 600; y 900 W/m² de radiación global) y el tiempo de exposición (4; 8; y 12 horas) tienen sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* durante los procesos de desinfección solar del agua de bebida.

El aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos ensayos mostró una potencial viabilidad ooquistica del 95,0±2,7% (porcentaje de ooquistes IP negativos) y una infectividad en el modelo murino lactante del 100±0,0%. De forma general, se pudo comprobar que la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* (valorada como potencial viabilidad e infectividad ooquisticas) disminuye a medida que aumentan tanto la intensidad de radiación como el tiempo de exposición, detectándose los mayores descensos en muestras de agua con los menores niveles de turbidez (Tabla 8).

Los resultados de ANOVA de los datos obtenidos mediante la aplicación de la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP (potencial viabilidad ooquistica) y los hallados en los bioensayos en ratón para cada uno de los ensayos establecidos se reflejan en la Tabla 9 y 10, respectivamente. Se observó que los porcentajes de potencial viabilidad ooquistica oscilaron entre un mínimo del 54,0% (Tabla 9, Ensayo 16: condiciones reales de 5 UNF de turbidez, 900 W/m² de intensidad de radiación y 12 horas de tiempo de exposición) y un máximo del 91,7% (Tabla 9, Ensayos 3, 20 y 26: condiciones reales de 200 W/m² y 4 horas, independientemente del nivel de turbidez). De igual forma, se comprobó que el menor valor de infectividad ooquistica (30,8%) se obtuvo para unas condiciones reales de 5 UNF de turbidez, 900 W/m² de intensidad de radiación y 12 horas de tiempo de exposición (Tabla 10, Ensayo 16).

Una vez obtenidos los resultados experimentales correspondientes a los valores representados en las matrices, se analizó la significación de cada parámetro evaluado, comprobándose que los tres factores considerados, así como la interacción de la turbidez con la intensidad de radiación y de la intensidad de radiación con el tiempo de exposición presentaron valores de $P < 0,05$. Sobre la base de la estimación de la significación estadística, los efectos de los parámetros y de su interacción sobre la potencial viabilidad e infectividad ooquisticas pueden ser descritos por las siguientes ecuaciones empíricas:

$$\text{Potencial viabilidad (\%)} = 81,51 + 2,13T - 9,05I - 4,54t + 2,96TI - 3,49It \quad [\text{Ec. 9}]$$

$$R^2 = 87,58\%$$

$$\text{Infectividad (\%)} = 86,52 + 5,09T - 16,54I - 6,46t + 5,95TI - 5,70It \quad [\text{Ec. 10}]$$

$$R^2 = 82,50\%$$

donde T , es la turbidez; I , la intensidad de radiación; t , el tiempo de exposición; TI , la interacción entre la turbidez y la intensidad de radiación; e It , la interacción entre intensidad de radiación y el tiempo de exposición.

Los valores estadísticos de R^2 indican que el modelo explica el 87,58% y el 82,50% de la variabilidad en la potencial viabilidad e infectividad ooquisticas, respectivamente. En las Figuras 12 y 13 se muestran las superficies de respuesta para el porcentaje de ooquistes IP negativos (potencialmente viables) y para la infectividad ooquistica definidas por las ecuaciones 9 y 10, respectivamente. En cada uno de los tres gráficos que componen las figuras, una de las variables estudiadas se fijó en el valor central del dominio ($V_c=0$), observándose que los valores de intensidad de radiación global establecidos ejercen un fuerte efecto sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*. Sin embargo, cuando este parámetro se fija en el valor medio evaluado (600 W/m^2), la influencia de la turbidez del agua y del tiempo de exposición sobre la potencial viabilidad e infectividad ooquisticas es poco notoria.

Tabla 8. Influencia de la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* bajo condiciones simuladas de radiación solar.

Turbidez (UNF)	Intensidad de radiación (W/m ²)											
	200				600				900			
	Tiempo de exposición (h)		Tiempo de exposición (h)		Tiempo de exposición (h)		Tiempo de exposición (h)		Tiempo de exposición (h)		Tiempo de exposición (h)	
5	Potencial viabilidad (%)	91,7 ± 2,6	88,2 ± 3,67	87,1 ± 0,71	86,0 ± 6,0	84,2 ± 6,2	82,1 ± 2,4	80,2 ± 2,8	61,4 ± 1,2	54,0 ± 0,8		
	Infectividad (%)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	81,8 ± 15,1	75,0 ± 10,5	67,5 ± 14,8	66,7 ± 10,8	30,8 ± 5,2		
100	Potencial viabilidad (%)	91,7 ± 2,6	88,2 ± 3,7	87,1 ± 0,7	86,6 ± 5,2	84,6 ± 0,6	82,5 ± 0,3	80,4 ± 5,4	67,3 ± 6,3	64,0 ± 7,3		
	Infectividad (%)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	76,0 ± 12,3	75,0 ± 13,2	68,0 ± 10,8	58,0 ± 8,3		
300	Potencial viabilidad (%)	91,7 ± 2,6	88,2 ± 3,7	87,1 ± 0,7	87,2 ± 2,8	85,1 ± 1,1	82,9 ± 0,8	85,1 ± 3,1	74,1 ± 2,0	72,0 ± 1,4		
	Infectividad (%)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	77,7 ± 3,9	87,9 ± 6,2	75,0 ± 4,3	73,3 ± 3,9		
Aislado de <i>C. parvum</i> : potencial viabilidad, 95,0 ± 2,7 %; infectividad, 100 ± 0,0 %												

Tabla 9. Efectos combinados de la turbidez, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la potencial viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* evaluada mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP.

Ensayo	T ^a	I ^b	t ^c	Valor Observado	Valor esperado	Residual estandarizado
1	-1	1	0	61,4	67,4	-1,8837
2	0	0	1	82,5	77,0	1,5636
3	-1	-1	-1	91,7	83,5	-0,6117
4	1	1	-1	85,1	84,5	0,1915
5	0	-1	0	88,2	90,6	-0,6266
6	1	0	1	82,9	80,2	0,8061
7	-1	-1	1	87,1	89,3	-0,7493
8	-1	1	-1	80,2	76,5	1,3464
9	0	1	0	67,3	72,5	-1,4536
10	-1	0	1	82,1	73,2	2,9052
11	0	0	0	84,6	81,5	0,8137
12	1	1	1	72,0	70,6	0,4895
13	1	1	0	74,1	77,6	-1,0408
14	-1	-1	0	88,2	91,4	-0,9346
15	1	-1	0	88,2	89,7	-0,4363
16	-1	1	1	54,0	58,3	-1,5613
17	0	1	-1	80,4	80,5	-0,0308
18	0	-1	1	87,1	89,5	-0,6972
19	-1	0	-1	86,0	85,0	0,2948
20	0	-1	-1	91,7	91,6	0,0348
21	1	-1	1	87,1	89,7	-0,9140
22	1	0	-1	87,2	87,1	0,0193
23	1	0	0	85,1	83,7	0,3750
24	-1	0	0	84,2	79,4	1,3326
25	0	1	1	64,0	64,4	-0,1254
26	1	-1	-1	91,7	89,7	0,6970
27	0	0	-1	86,6	86,1	0,1443
Término	Coefficiente	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	Valor F	P
Constante	81,5					
T	2,132	81,79	1	81,79	5,54	0,0290
I	-9,045	1472,62	1	1472,62	99,69	0,0000
t	-4,543	371,55	1	371,55	25,15	0,0001
TI	2,961	105,20	1	05,20	7,12	0,0148
Tt	1,057	13,40	1	13,40	0,91	0,3523NS
It	-3,493	146,44	1	146,44	9,91	0,0051

^aTurbidez; ^bIntensidad de radiación; ^cTiempo de exposición. Los valores de T; I; y t que se muestran son los valores codificados (ver Tabla 7).
 GL, grados de libertad; NS, no significativo.
 Valor estadístico Durbin-Watson=2,4043.

Tabla 10. Efectos combinados de la turbidez, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la infectividad de los ooquistes de *C. parvum* evaluada mediante bioensayos en ratón.

Ensayo	T ^a	I ^b	t ^c	Valor observado	Valor esperado	Residual estandarizado
1	-1	1	0	66,7	59,2	1,0455
2	0	0	1	76,0	80,1	2,9024
3	-1	-1	-1	100	106,7	-1,0773
4	1	1	-1	87,9	91,4	-0,5031
5	0	-1	0	100	103,0	-0,3723
6	1	0	1	77,7	87,2	-1,4034
7	-1	-1	1	100	101,1	-0,1792
8	-1	1	-1	67,5	73,3	-0,8949
9	0	1	0	68,0	70,2	-0,2399
10	-1	0	1	75,0	73,0	0,2688
11	0	0	0	100	86,6	1,7015
12	1	1	1	73,3	71,1	0,3878
13	1	1	0	75,0	81,2	-0,8042
14	-1	-1	0	100	103,9	-0,5200
15	1	-1	0	100	102,2	-0,2905
16	-1	1	1	30,8	45,0	-2,2575
17	0	1	-1	75,0	82,3	-0,9622
18	0	-1	1	100	102,3	-0,3028
19	-1	0	-1	100	90,0	1,3947
20	0	-1	-1	100	103,8	-0,5076
21	1	-1	1	100	103,4	-0,5416
22	1	0	-1	100	96,1	0,5221
23	1	0	0	100	97,7	1,0456
24	-1	0	0	81,8	81,5	0,0455
25	0	1	1	58,0	58,0	0,0242
26	1	-1	-1	100	100,9	-0,1503
27	0	0	-1	100	93,1	0,8664
Término	Coficiente	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	Valor F	P
Constant	86,52					
T	5,0856	465,53	1	465,53	6,52	0,0189
I	-16,5428	4925,94	1	4925,94	69,03	0,0000
t	-6,4644	752,20	1	752,20	10,54	0,0040
TI	5,9458	424,24	1	424,24	5,95	0,0242
Tt	2,0083	48,40	1	48,40	0,68	0,4199NS
It	-5,6967	389,42	1	389,42	5,46	0,0300

^aTurbidez; ^bIntensidad de radiación; ^cTiempo de exposición. Los valores de T; I; y t que se muestran son los valores codificados (ver Tabla 7).
GL, grados de libertad; NS, no significativo.
Valor estadístico Durbin-Watson=1,5026.

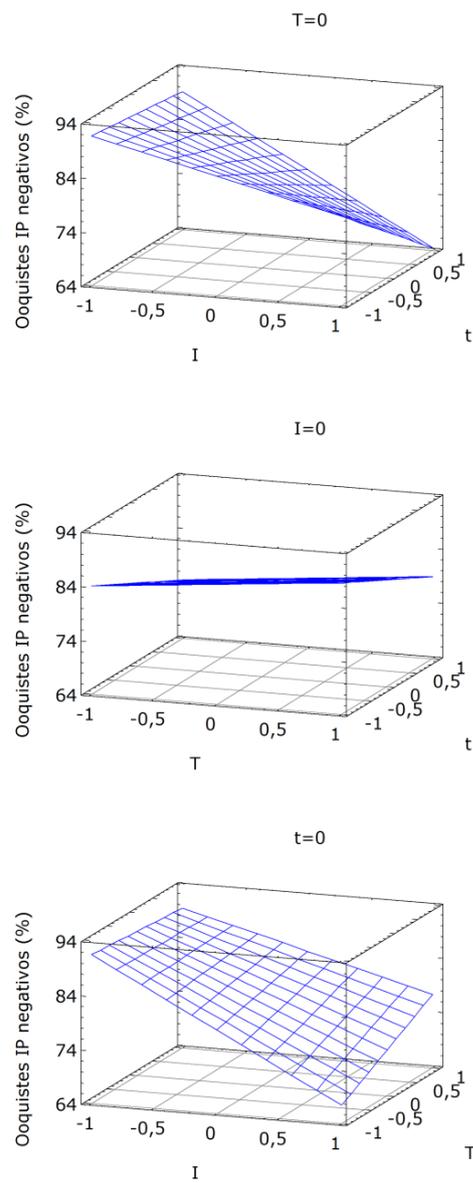


Figura 12. Superficies de respuesta definidas por la Ec. 9 mostrando los efectos que sobre la potencial viabilidad de *C. parvum* (porcentaje de ooquistes IP negativos) tienen la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición cuando uno de estos factores se mantiene en el valor central del dominio ($V_c=0$).

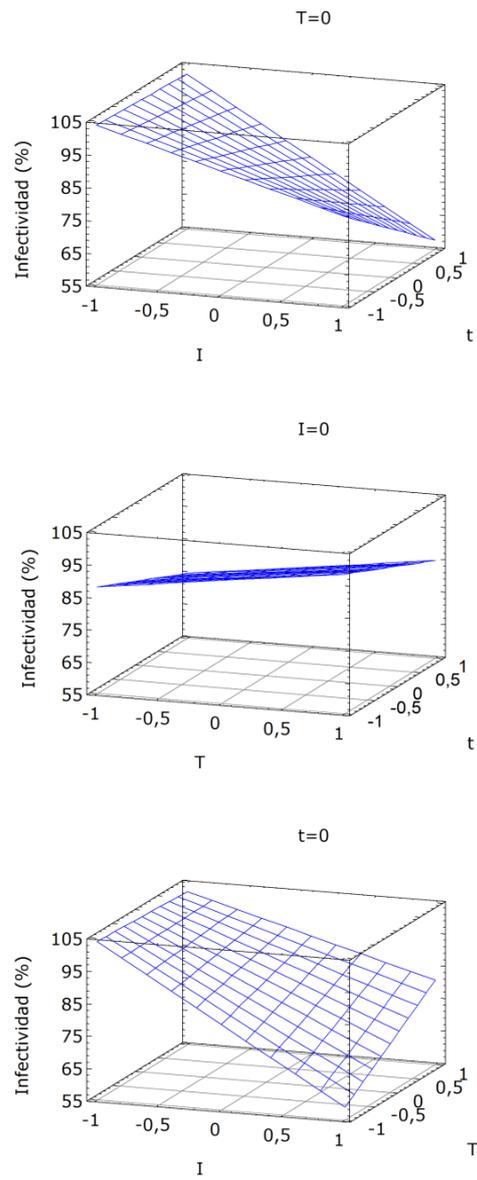


Figura 13. Superficies de respuesta definidas por la Ec. 10 mostrando los efectos que sobre la infectividad de *C. parvum* tienen la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición cuando uno de estos factores se mantiene en el valor central del dominio ($V_c=0$).

2. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO BOTELLAS PET

Durante los meses de julio y octubre de 2007, se llevaron a cabo en la PSA los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas experimentalmente con ooquistes de *C. parvum*. Los días durante los cuales se realizaron los ensayos fueron soleados y sin nubosidad. Los promedios diarios de radiación global y UV acumuladas (entre las 08:00-20:00 horas, hora local) fueron de $28,3 \pm 0,2$ MJ/m² y de $1037,1 \pm 21,0$ KJ/m², respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de 997,7 y 37,7 W/m², respectivamente (Figura 14). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de 19 °C y un máximo de 38 °C.

El aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios mostró una potencial viabilidad ooquistica del $91,6 \pm 3,3\%$ determinada mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP.

2.1. Resultados de la evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar

Botellas PET de 1,5 l de capacidad se llenaron con aguas de 0; 5; 100; y 300 UNF de turbidez, se contaminaron con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* y se expusieron a la radiación solar durante 4; 8; y 12 horas en uno de los tejados de las instalaciones de la PSA, coincidiendo la mitad de cada ensayo con el mediodía solar, aproximadamente 14:00 horas (hora local).

Los perfiles de temperatura media registrados en las muestras de agua con distintos niveles de turbidez durante los tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas se muestran en la Figura 15. Las temperaturas máximas del agua alcanzadas durante el estudio fueron de 49,7; 48,5; 46,3; y 45,9 °C en aguas con niveles de turbidez de 300; 100; 5; y 0 UNF, respectivamente. La temperatura máxima del agua en los controles de exposición en oscuridad fue de 44,5 °C. Las temperaturas registradas en las muestras de agua con distintos niveles de turbidez no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, excepto cuando se compararon las obtenidas en las muestras de agua más turbia (300 UNF) y el control de exposición en oscuridad ($P < 0,05$).

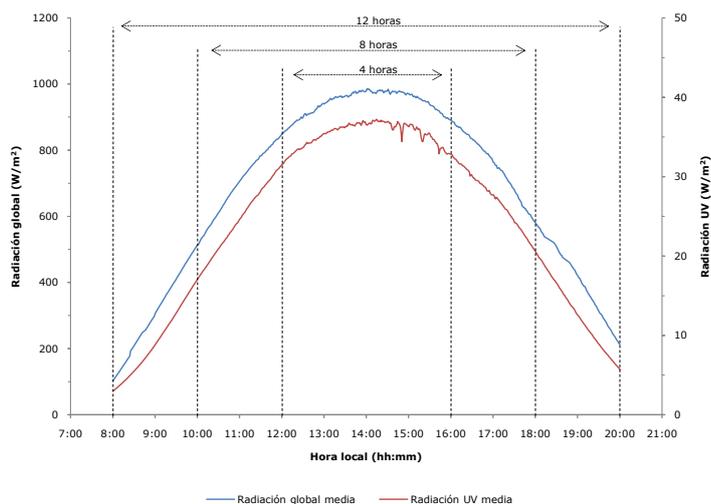


Figura 14. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de *C. parvum* utilizando botellas PET.

En la Figura 16, se muestran las cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con diferentes niveles de turbidez y expuestas en las botellas PET durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural. Se observó un descenso significativo en la potencial viabilidad ooquistica (ooquistes IP negativos) a medida que aumenta el tiempo de exposición, siendo este descenso más acusado en aguas con los menores niveles de turbidez ($P < 0,01$). Así, después de un tiempo de exposición de 4 horas y una dosis de radiación global de $13,5 \text{ MJ/m}^2$ (dosis de radiación UV de $509,2 \text{ KJ/m}^2$), la viabilidad ooquistica descendió de un valor inicial del aislado de 91,6% a 30,7; 46,0; 63,0; y 74,0% en las muestras de agua con 0; 5; 100; y 300 UNF, respectivamente. Las correspondientes viabilidades ooquisticas determinadas a un tiempo de exposición de 8 horas fueron de 21,9; 36,6; 43,7; y 54,1% para aguas con 0; 5; 100; y 300 UNF, respectivamente. Finalmente, la viabilidad ooquistica alcanzó valores de 11,5; 25,9; 41,5; y 52,8% para niveles de turbidez de 0; 5; 100; y 300 UNF, respectivamente, tras 12 horas de exposición y una dosis de radiación global de $28,3 \text{ MJ/m}^2$ (dosis de radiación UV de $1037,1 \text{ KJ/m}^2$). También, se comprobó que para tiempos de exposición de 8 y 12 horas, el descenso detectado en la viabilidad ooquistica para aguas muy turbias (100 y 300 UNF) es poco manifiesto en comparación con aguas claras. La viabilidad ooquistica detectada en el control de exposición en oscuridad fue de 83,3; 60,4; y 62,5% para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente.

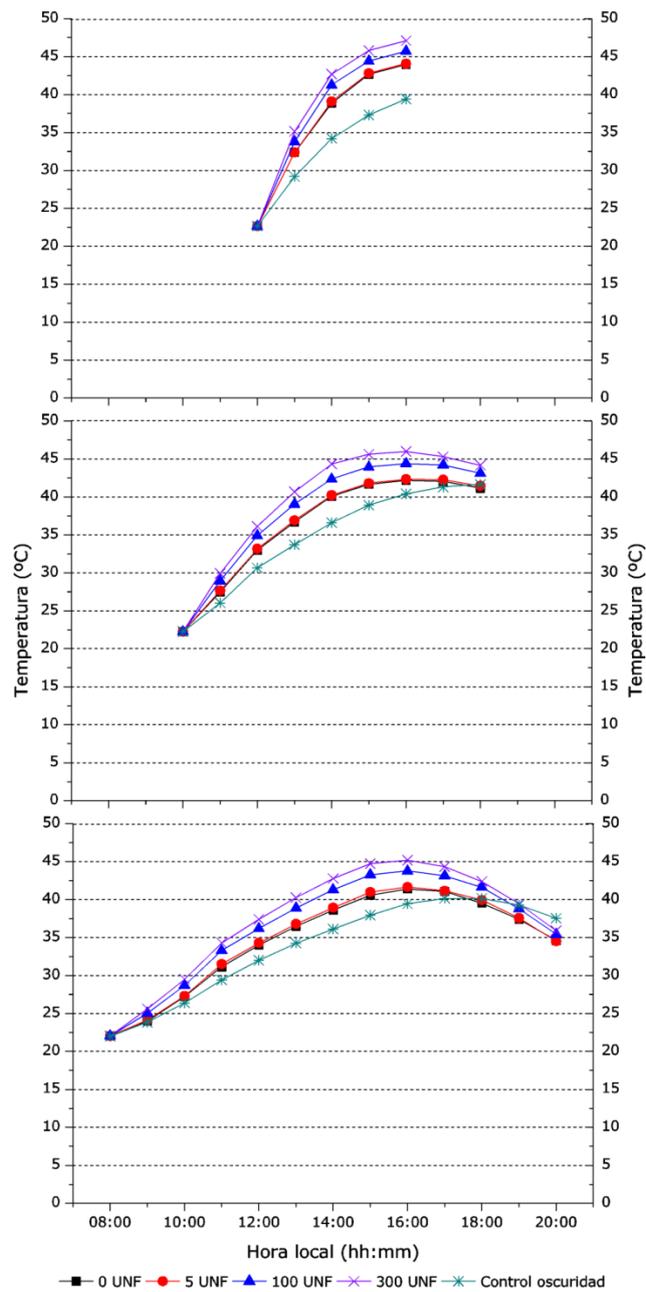


Figura 15. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural.

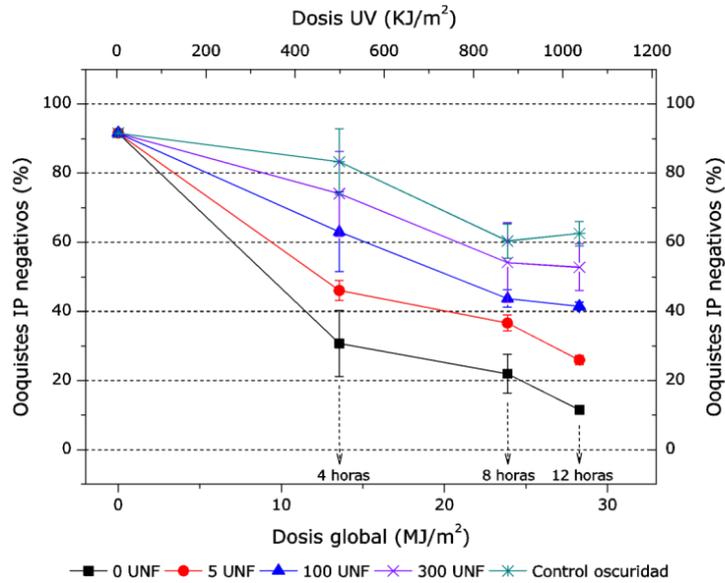


Figura 16. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural.

2.2. Resultados de la evaluación del efecto óptico de la radiación solar

Con el fin de determinar el efecto que el componente óptico de la radiación solar tiene por sí solo sobre la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum*, botellas PET de 1,5 l conteniendo aguas con los valores extremos de turbidez (0 y 300 UNF) y experimentalmente contaminadas con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum*, se expusieron a la radiación solar durante 4; 8; y 12 horas en un baño de agua a temperatura controlada (20-25 °C). Bajo estas condiciones, se observó que en muestras de agua clara la potencial viabilidad ooquistica (ooquistes IP negativos) desciende a medida que aumenta el tiempo de exposición, siendo este descenso estadísticamente significativo tras 8 y 12 horas de exposición (91,6% vs 69,7% y 40,7%, respectivamente; $P < 0,05$). Sin embargo, en aguas turbias y tras el máximo periodo de exposición, la potencial viabilidad ooquistica detectada fue del 78,9%. Por lo que respecta al control de exposición en oscuridad, las variaciones en la viabilidad ooquistica fueron mínimas (Figura 17).

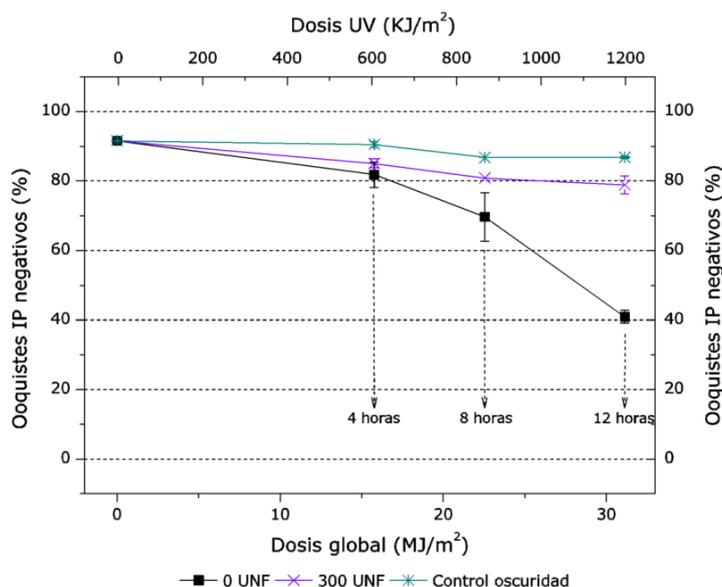


Figura 17. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con niveles de turbidez de 0 y 300 UNF contenidas en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural y a temperatura controlada (20-25 °C).

2.3. Resultados de la evaluación del efecto térmico de la radiación solar

Con el fin de evaluar el efecto que el componente térmico de la radiación solar ejerce por sí sólo sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*, utilizando un bloque seco de calor se simuló en el laboratorio los perfiles de temperatura media registrados en el interior de las botellas PET durante los estudios realizados en condiciones naturales (ver Figura 15).

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $88,1 \pm 1,0\%$ (ooquistes enteros, $92,7 \pm 1,9\%$; ooquistes IP negativos, $95,0 \pm 1,2\%$). La infectividad del aislado, determinada en un modelo murino lactante, fue del 100% y la intensidad media de infección del $4,6 \pm 1,9 \times 10^6$ ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado.

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global con respecto a los perfiles de temperatura media ensayados en los diferentes tiempos de exposición se muestran en la Figura 18. En el ensayo de 4 horas de exposición, la temperatura osciló entre un valor inicial de 22,7 °C hasta un valor de 45,7 °C registrado al final del ensayo. Durante

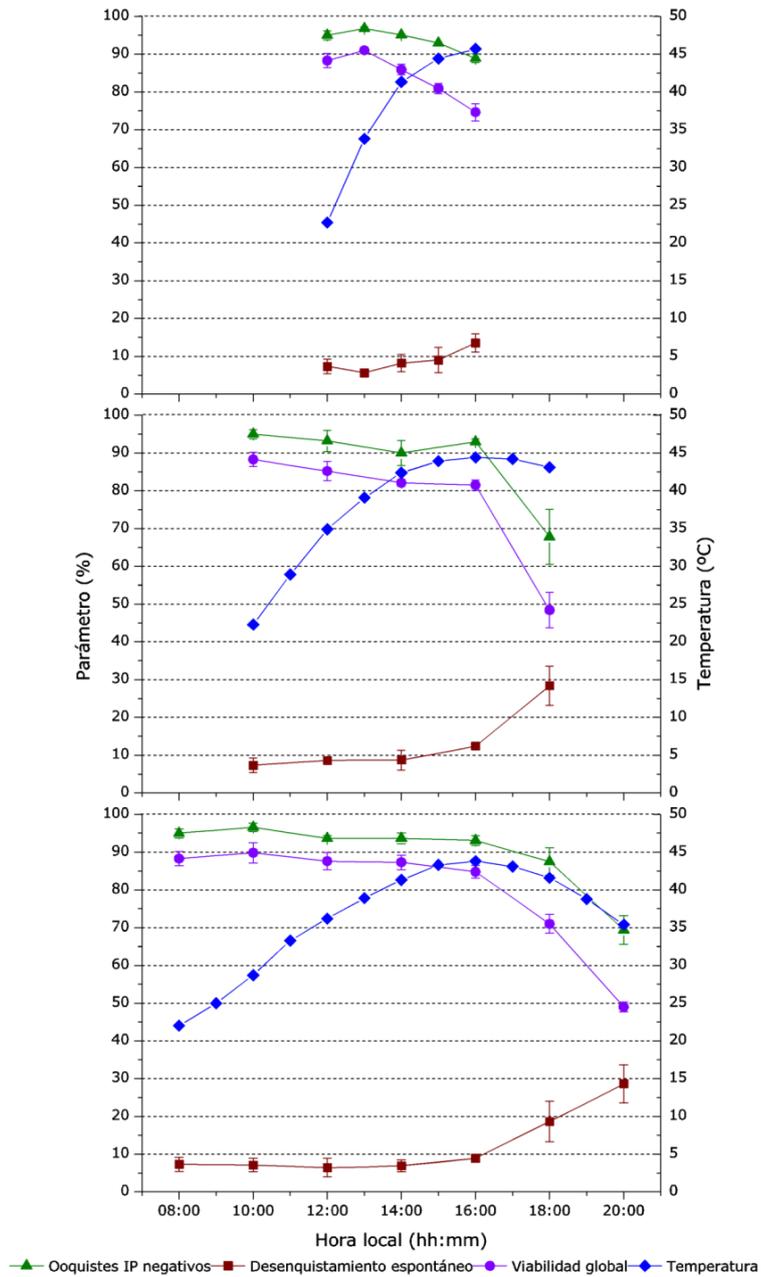


Figura 18. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en función de los perfiles de temperatura media registrados en botellas PET de 1,5 l expuestas durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar natural.

las tres primeras horas de exposición, los porcentajes de ooquistes IP negativos y de desenquistamiento espontáneo no mostraron diferencias significativas con los correspondientes valores iniciales del aislado ooquistico. Sin embargo, al final del ensayo se detectó un aumento significativo en ambos parámetros ($P<0,005$), y por lo tanto una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad global ($P=0,0002$).

Los resultados obtenidos en los ensayos de 8 y 12 horas de exposición no difirieron de forma significativa entre sí. Se observó una brusca y significativa disminución de la viabilidad global a partir de las 6 y 8 horas en los ensayos de 8 y 12 horas de exposición, respectivamente, coincidiendo esta reducción con la máxima temperatura alcanzada en ambos ensayos (44,4 y 43,8 °C, respectivamente). Al final de ambos ensayos, la viabilidad global disminuyó hasta un valor aproximado del 50%.

En la Tabla 11, se muestran los porcentajes de ooquistes IP negativos; de desenquistamiento espontáneo; de viabilidad global y de infectividad, así como las intensidades de infección, obtenidos todos ellos tras la exposición de los ooquistes de *C. parvum* a los perfiles de temperatura media durante 4; 8; y 12 horas. Se observó, tras 4 y 8 horas de exposición, un descenso significativo en los porcentajes de ooquistes IP negativos ($P=0,0003$), así como un aumento significativo en los porcentajes de ooquistes que se desenquistaron espontáneamente ($P<0,0001$), y consecuentemente, un descenso significativo en los valores de la viabilidad global ($P<0,0001$). Sin embargo, estos valores no experimentaron cambios significativos tras 12 horas de exposición. Por otra parte, los resultados obtenidos en el modelo murino lactante reflejan una disminución de la infectividad ooquistica y una reducción significativa en la intensidad de infección ($P<0,0001$), detectada ya tras el menor tiempo de exposición (4 horas).

Tabla 11. Resultados de la simulación de los perfiles de temperatura media registrados en el interior de las botellas PET sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*.

	Tiempo de exposición (h)			
	0	4	8	12
Ooquistes IP negativos (%)	95,0±1,2	88,9±1,2	67,8±7,3	69,4±3,8
Desenq. espontáneo (%) ^a	7,3±1,9	13,5±2,4	28,4±5,2	28,6±5,1
Viabilidad global (%) ^b	88,1±1,0	74,6±2,3	48,4±4,7	49,9±1,3
Infectividad (%)	100,0±0,0	85,0±15,0	63,4±3,4	75,3±15,5
Intensidad de infección ^c	4,6±1,9	0,6±0,5	0,7±0,5	0,9±0,4

^aVer Ec. 4; ^bVer Ec. 5; ^cNúmero de ooquistes×10⁶/totalidad del intestino homogenizado.

2.4. Estudio comparativo del efecto conjunto e independiente de los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*

En este apartado, se comparan los valores obtenidos mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP en los estudios de evaluación de los efectos conjunto e independiente de los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*, expresando los resultados como porcentajes de reducción de la potencial viabilidad ooquistica con respecto a los valores iniciales del aislado ooquistico utilizado (Tabla 12). Cuando se observan los resultados obtenidos tras la evaluación de los efectos óptico y térmico de la radiación solar, se comprueba un incremento en el porcentaje de reducción de la viabilidad ooquistica a medida que aumenta el tiempo de exposición. Así, se obtuvieron reducciones del 66,4; 76,0; y 87,5% en aguas claras (0 UNF) para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente. Cuando se expusieron a la radiación solar natural aguas con distintos niveles de turbidez (5; 100; y 300 UNF), aunque la viabilidad ooquistica también disminuyó, los porcentajes de reducción fueron inferiores. De esta forma, los porcentajes de reducción en aguas muy turbias (300 UNF) fueron del 19,2; 40,9; y 42,4% para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente.

Cuando se evalúa tan sólo el efecto del componente óptico, aunque también se observan reducciones en la viabilidad ooquistica, se obtienen valores inferiores. Porcentajes de reducción del 13,2; 41,2; y 55,3% se obtuvieron en aguas claras para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente. Sin embargo, para aguas con 300 UNF de turbidez, la reducción máxima hallada fue del 13,9% tras 12 horas de exposición. Al estudiar el efecto de los perfiles de temperatura media registrados en el interior de las botellas PET durante los estudios realizados en condiciones naturales, también se observan reducciones en la viabilidad ooquistica, principalmente a tiempos de exposición prolongados. De esta forma, se obtuvieron porcentajes de reducción del 6,4% tras 4 horas de exposición y del 28,6 y 26,9% después de 8 y 12 horas de exposición, respectivamente.

Considerando los resultados obtenidos durante la evaluación de los efectos de los componentes óptico y térmico, se comprueba un fuerte efecto sinérgico tras 4 horas de exposición, tanto en aguas claras como en aguas muy turbias. Así, cuando se determinaron ambos efectos, se observó una reducción en la viabilidad ooquistica del 66,4% en aguas de 0 UNF de turbidez, mientras que independientemente las reducciones fueron del 13,2 y 6,4%, respectivamente. El efecto sinérgico es menos notorio al aumentar los tiempos de exposición, no detectándose en aguas muy turbias tras 8 y 12 horas de exposición.

Tabla 12. Resultados del estudio comparativo de los efectos conjunto e independiente de los componentes óptico y térmico de la radiación solar sobre la viabilidad de los oocistos de *C. parvum*.

	Tiempo de exposición (horas)											
	4			8			12					
Turbidez (UNF)	0	5	100	300	0	5	100	300	0	5	100	300
Dosis global (MJ/m ²)		13,5			23,9				28,3			
Efecto óptico y térmico												
Reducción viabilidad (%)	66,4	49,7	31,2	19,2	76,0	59,9	52,2	40,9	87,5	71,7	54,7	42,4
Dosis global (MJ/m ²)		15,7			22,5				31,1			
Efecto óptico												
Reducción viabilidad (%)	13,2	ND	ND	8,1	41,2	ND	ND	12,0	55,3	ND	ND	13,9
Efecto térmico												
Reducción viabilidad (%)		6,4			28,6				26,9			
ND, no determinado.												

3. DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO REACTORES SOLARES EQUIPADOS CON CPC

3.1. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC

Durante el periodo comprendido entre el 15 de junio y el 10 de julio de 2008, se realizaron en la PSA los estudios de desinfección solar de aguas con distintos niveles de turbidez (0; 5; y 100 UNF) contaminadas experimentalmente con ooquistes purificados de *C. parvum* empleando reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con dos tipos de CPC de distinto FC de la radiación solar, CPC1 y CPC1,89.

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $95,3 \pm 1,6\%$ (ooquistes enteros, $95,7 \pm 1,9\%$; ooquistes IP negativos, $99,6 \pm 0,3\%$).

3.1.1. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1

Los días durante los que se realizaron los ensayos fueron soleados y con cierta nubosidad. Los valores promedio de radiación global y UV acumuladas (entre las 11:00-17:00 horas, hora local y en dos días consecutivos) fueron de $49,0 \pm 3,0 \text{ MJ/m}^2$ y $1500,0 \pm 120,0 \text{ KJ/m}^2$, respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de $1018,2$ y $38,4 \text{ W/m}^2$, respectivamente (Figura 19). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de $19,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y un máximo de $35,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Las temperaturas medias registradas en el interior de los reactores y monitorizadas cada hora se reflejan en la Figura 20. Los valores máximos de temperatura alcanzados en aguas de 0; 5; y 100 UNF fueron de $42,0$; $42,6$; y $47,0 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, registrándose todos ellos a las 4 horas de exposición (15:00 horas, hora local). Se comprobó que las temperaturas alcanzadas en aguas de 100 UNF fueron significativamente superiores a las registradas en aguas de 0 y 5 UNF ($P < 0,05$) para tiempos de exposición comprendidos entre 2-5 horas.

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global obtenidas en aguas de 0; 5; y 100 UNF a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 21. Se detectó un brusco y significativo descenso en el porcentaje de ooquistes potencialmente viables

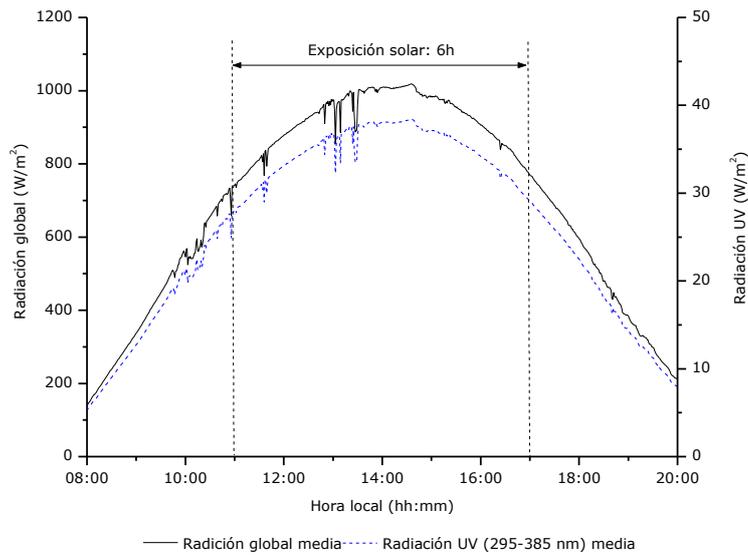


Figura 19. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con ooquistes de *C. parvum* utilizando reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1.

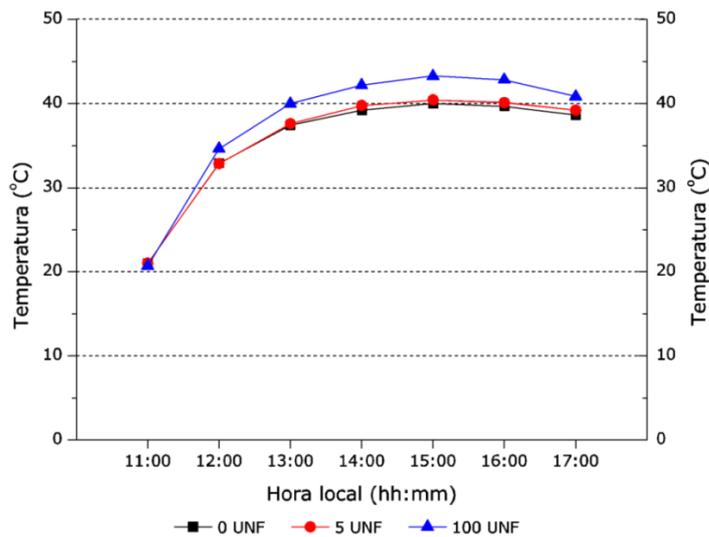


Figura 20. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1.

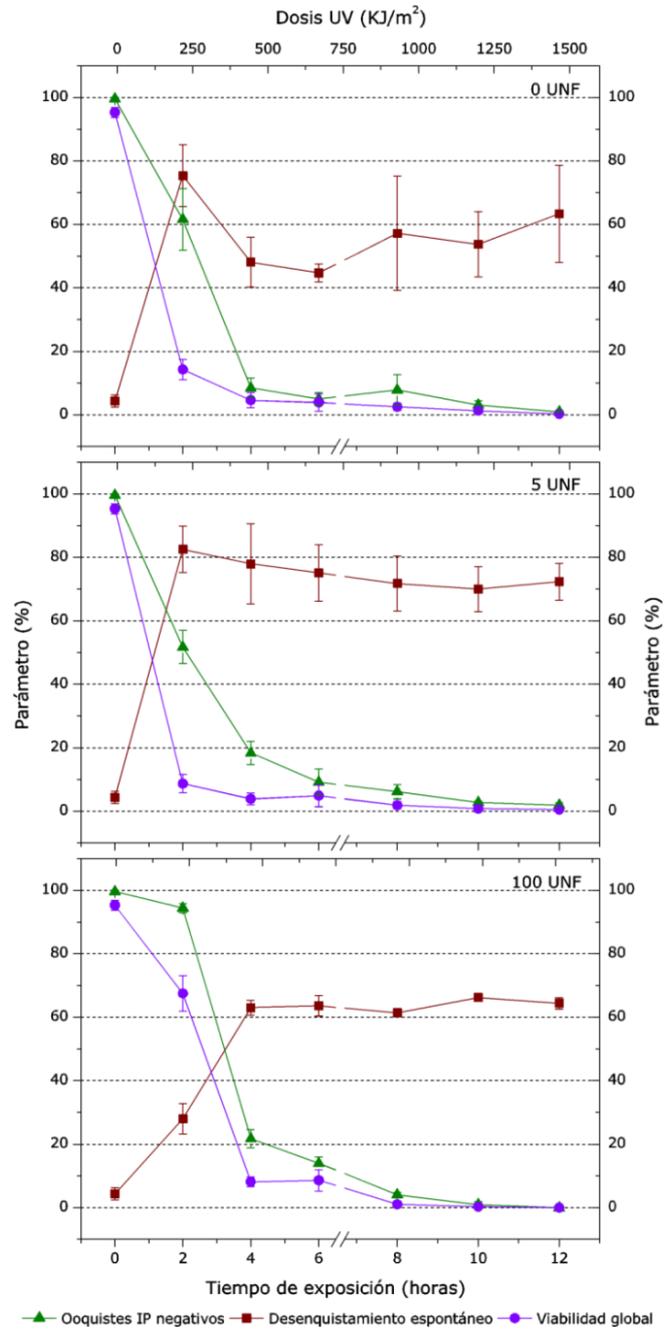


Figura 21. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1 y expuestas a la radiación solar natural durante 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas en dos días consecutivos.

(ooquistes IP negativos) durante las cuatro primeras horas de exposición en aguas de 0 UNF. Esta observación también se comprobó durante las 6 y 8 horas de exposición en aguas de 5 y 100 UNF, respectivamente ($P < 0,0001$). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en aguas de 0 y 5 UNF con respecto a los hallados en aguas de 100 UNF en las seis primeras horas de exposición ($P < 0,05$).

Por otra parte, se comprobó un fuerte y significativo incremento ($P < 0,0001$) en el número de ooquistes que se desenquistaron espontáneamente en aguas de 0 y 5 UNF tras 2 horas de exposición y tras 4 horas en aguas de 100 UNF, manteniéndose constante durante el resto del experimento. Además, se comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los porcentajes de desenquistamiento espontáneo determinados a lo largo de los ensayos en aguas con los distintos niveles de turbidez. Como consecuencia, se demostró un descenso significativo en la viabilidad global tras 4 horas de exposición ($P < 0,0001$). Así, los valores de viabilidad global fueron de $4,6 \pm 2,4\%$ (ooquistes enteros, $51,9 \pm 7,8\%$; ooquistes IP negativos, $8,5 \pm 3,1\%$); $3,9 \pm 1,9\%$ (ooquistes enteros, $22,0 \pm 12,7\%$; ooquistes IP negativos, $18,4 \pm 3,7\%$); y $8,1 \pm 1,6\%$ (ooquistes enteros, $37,0 \pm 3,3\%$; ooquistes IP negativos, $21,7 \pm 2,9\%$) en aguas de 0; 5; y 100 UNF, respectivamente. Al final de los ensayos, la viabilidad global se anuló en aguas de 100 UNF y fue prácticamente nula en aguas de 0 y 5 UNF ($0,3 \pm 0,0\%$ y $0,5 \pm 0,2\%$, respectivamente). Aunque se comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas de los valores del porcentaje de viabilidad global obtenidos en aguas de 0 y 5 UNF con respecto a los hallados en aguas de 100 UNF tras 2 horas de exposición ($P < 0,01$), éstas no fueron estadísticamente significativas a partir de la cuarta hora de exposición.

3.1.2. Resultados de la evaluación de reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1,89

Los días durante los cuales se realizaron los ensayos fueron soleados y con cierta nubosidad. Los valores promedio de radiación global y UV acumuladas (entre las 11:00-17:00 horas, hora local y en dos días consecutivos) fueron de $36,0 \pm 4,0 \text{ MJ/m}^2$ y $1369,0 \pm 150,0 \text{ KJ/m}^2$, respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de $953,4$ y $36,0 \text{ W/m}^2$, respectivamente (Figura 22). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de $21,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y un máximo de $40,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Las temperaturas medias registradas en el interior de los reactores y monitorizadas cada hora

se reflejan en la Figura 23. Los valores máximos de temperatura alcanzados en aguas con 0; 5; y 100 UNF fueron de 50,7; 49,3; y 58,2 °C, respectivamente, registrándose todos ellos a las 4 horas de exposición (15:00 horas, hora local). Se obtuvieron valores de temperatura significativamente superiores en aguas de 100 UNF en relación a los detectados en aguas de 0 y 5 UNF para tiempos de exposición comprendidos entre 1-4 horas ($P < 0,05$).

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global obtenidas en aguas de 0; 5; y 100 UNF a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 24. Se comprobó una fuerte disminución, estadísticamente significativa, del porcentaje de ooquistes IP negativos tras un tiempo de exposición a la radiación solar de 4 horas para los tres niveles de turbidez del agua ($P < 0,0001$), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de ooquistes IP negativos detectados en aguas de 0 y 5 UNF, pero sí entre éstos y los determinados en aguas de 100 UNF durante las primeras 8 horas de exposición ($P < 0,01$). Tras 10 horas de exposición a la radiación solar no se detectaron ooquistes IP negativos en aguas de 0 UNF. Por otra parte, se observó un fuerte y rápido incremento en el porcentaje de ooquistes que se desenquistaron espontáneamente tras 2 horas de exposición en aguas de 0 y 5 UNF ($P < 0,0001$), manteniéndose dicho valor prácticamente constante hasta el final del ensayo y presentando diferencias estadísticamente significativas entre los tres niveles de turbidez ensayados ($P < 0,0001$). Consecuentemente, se detectó un descenso estadísticamente significativo en la viabilidad global ooquistica tras un periodo de exposición de 4 horas ($P < 0,0001$). Así, los valores de viabilidad global fueron de $7,0 \pm 0,9\%$ (ooquistes enteros, $67,8 \pm 2,0\%$; ooquistes IP negativos, $10,4 \pm 1,7\%$); $4,8 \pm 1,5\%$ (ooquistes enteros, $47,3 \pm 2,4\%$; ooquistes IP negativos, $10,0 \pm 2,6\%$); y $13,0 \pm 0,0\%$ (ooquistes enteros, $73,7 \pm 4,7\%$; ooquistes IP negativos, $17,7 \pm 1,0\%$) en aguas de 0; 5; y 100 UNF, respectivamente, observándose diferencias estadísticamente significativas de los porcentajes de viabilidad global obtenidos en aguas de 0-5 UNF con respecto a los hallados en aguas de 100 UNF ($P < 0,01$). Tras 10 horas de exposición, la viabilidad global se anuló en aguas con el menor nivel de turbidez y fue prácticamente nula en aguas de 5 UNF a partir de las 8 horas de exposición ($0,5 \pm 0,5\%$). En aguas con el mayor nivel de turbidez, la viabilidad global obtenida tras 10 y 12 horas de exposición fue de $1,9 \pm 0,6\%$.

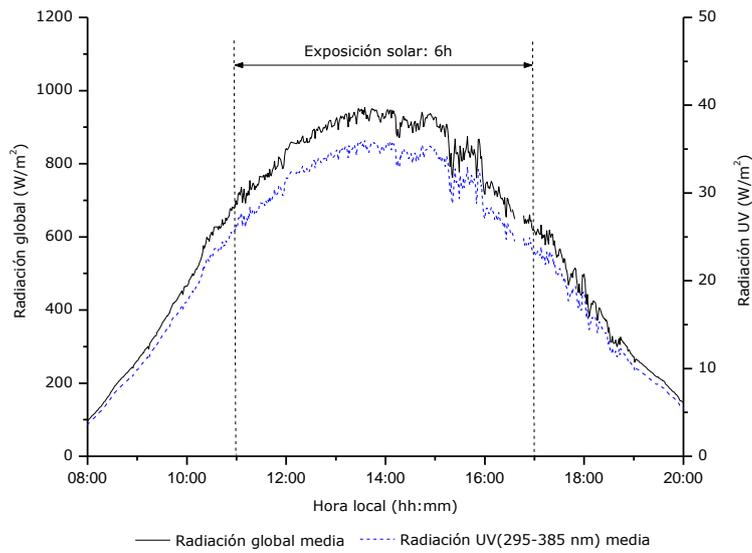


Figura 22. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con oquistes de *C. parvum* utilizando reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89.

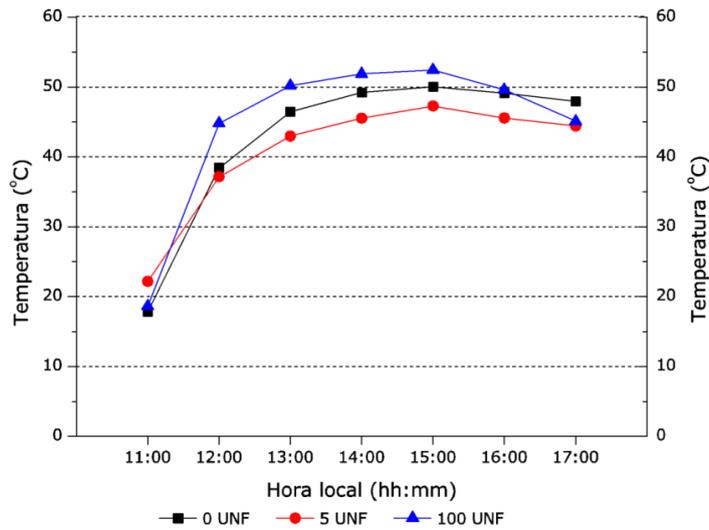


Figura 23. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89.

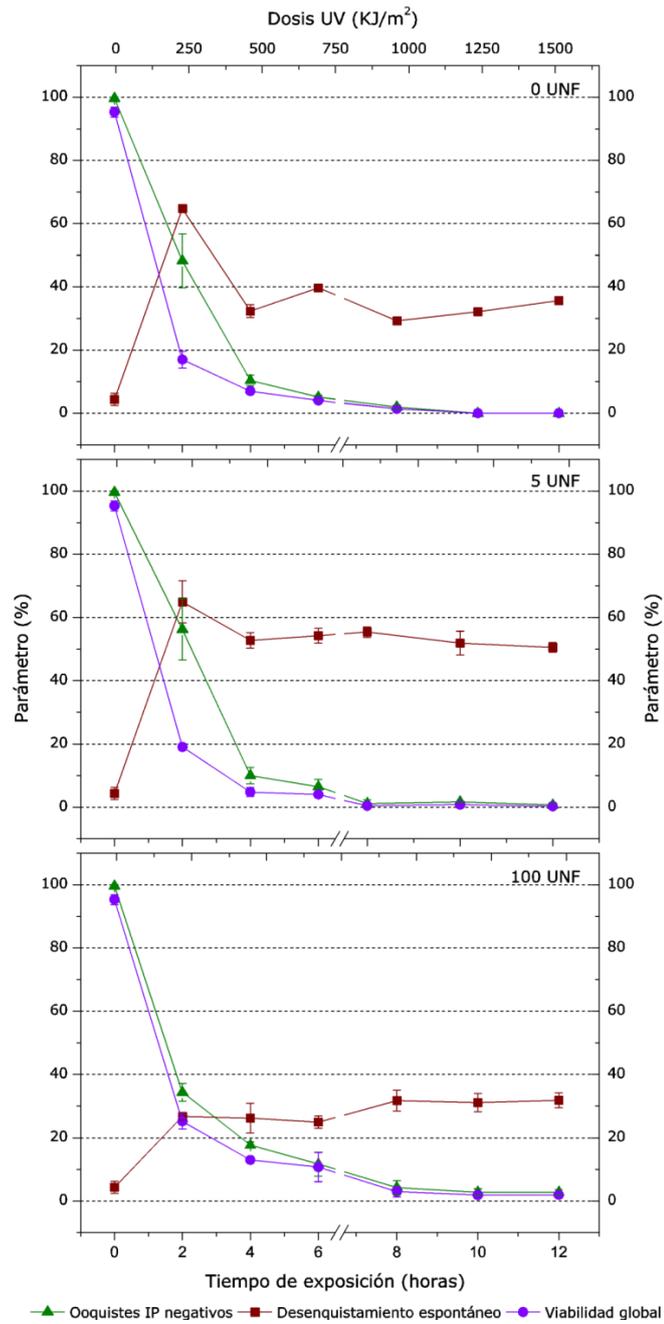


Figura 24. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en reactores solares de 2,5 l equipados con CPC1,89 y expuestos a la radiación solar natural durante 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas en dos días consecutivos.

3.2. Resultados de la evaluación de un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC

Durante el periodo comprendido entre el 23 de junio y 8 de julio de 2009, se realizaron en la PSA los estudios de desinfección solar de aguas con distintos niveles de turbidez (0; 5; y 30 UNF) contaminadas experimentalmente con ooquistes purificados de *C. parvum* empleando un reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC de FC de la radiación solar de 1. Los días durante los cuales se realizaron los ensayos fueron soleados y con cierta nubosidad. Los valores promedio de radiación global y UV acumuladas (entre las 10:00-18:00 horas, hora local) fueron de $36,0 \pm 5,0$ MJ/m² y $1370,0 \pm 120,0$ KJ/m², respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de 1278,0 y 48,2 W/m², respectivamente (Figura 25). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de 20,0 °C y un máximo de 39,0 °C. Las temperaturas medias registradas en el interior del reactor y monitorizadas cada hora se reflejan en la Figura 26. Los valores máximos de temperatura alcanzados en aguas con 0; 5; y 30 UNF de turbidez fueron de 52,6; 52,5; y 57,5 °C, respectivamente, registrándose todos ellos a las 7 horas de exposición (17:00 horas, hora local). Se determinaron valores de temperatura significativamente superiores en aguas de 30 UNF en comparación a los observados en aguas de 0 y 5 UNF para tiempos de exposición comprendidos entre 4-8 horas (14:00-18:00 horas, hora local) ($P < 0,05$).

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $92,1 \pm 0,9\%$ (ooquistes enteros, $96,6 \pm 1,8\%$; ooquistes IP negativos, $95,4 \pm 0,8\%$).

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global obtenidas en aguas de 0; 5; y 30 UNF a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 27. Se observó un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de ooquistes IP negativos en aguas de 0 UNF a partir de 4 horas de exposición (14:00 horas, hora local) y hasta el final de los ensayos, siendo esta disminución más pronunciada en el intervalo de tiempo comprendido entre las 4-6 horas de exposición (14:00-16:00 horas, hora local) ($P < 0,0001$). De igual forma, en aguas de 5 UNF se detectó una disminución significativa en el porcentaje de ooquistes IP negativos ($P < 0,001$), pero a partir de las 6 horas de exposición (16:00 horas, hora local). En aguas de 30 UNF también se observó una reducción significativa en el porcentaje de ooquistes IP negativos a partir de las 6 horas de exposición (16:00 horas, hora local), manteniéndose estos valores hasta el final del ensayo ($P < 0,005$). Al máximo

tiempo de exposición (18:00 horas, hora local), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de ooquistes IP negativos en aguas de 0 y 5 UNF, pero sí entre éstos y los detectados en aguas de 30 UNF ($P < 0,01$).

Por otra parte y aunque se comprobó un incremento en el porcentaje de ooquistes que se desenquistaron espontáneamente, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en aguas de 30 UNF de turbidez. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en aguas con los diferentes niveles de turbidez ensayados.

Finalmente, se comprobó una disminución significativa en los porcentajes de viabilidad global a partir de 4 horas de exposición (14:00 horas, hora local) en los tres niveles de turbidez ensayados ($P < 0,001$), presentando una evolución similar a la observada para los correspondientes porcentajes de ooquistes IP negativos. Así, a un tiempo de exposición de 4 horas, la viabilidad global fue de $69,6 \pm 6,5\%$ (ooquistes enteros, $84,5 \pm 7,9\%$; ooquistes IP negativos, $82,4 \pm 0,6\%$); $78,9 \pm 7,2\%$ (ooquistes enteros, $90,8 \pm 6,5\%$; ooquistes IP negativos, $86,8 \pm 2,5\%$); y $66,5 \pm 11,4\%$ (ooquistes enteros, $81,6 \pm 10,4\%$; ooquistes IP negativos, $81,2 \pm 3,8\%$) en aguas con 0; 5; y 30 UNF, respectivamente. Tras 8 horas de exposición, los porcentajes de viabilidad global detectados en aguas de 0 y 5 UNF de turbidez fueron de $21,8 \pm 3,1\%$ (ooquistes enteros, $90,6 \pm 5,6\%$; ooquistes IP negativos, $24,1 \pm 4,0\%$) y de $31,3 \pm 12,9\%$ (ooquistes enteros, $87,7 \pm 4,6\%$; ooquistes IP negativos, $35,8 \pm 15,2\%$), respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En aguas con el mayor nivel de turbidez, los porcentajes de viabilidad global se mantuvieron constantes a partir de las 6 horas de exposición y, tras 8 horas, este valor fue de $45,0 \pm 10,0\%$ (ooquistes enteros, $78,1 \pm 6,4\%$; ooquistes IP negativos, $57,4 \pm 8,1\%$), presentando diferencias estadísticamente significativas con los correspondientes porcentajes de viabilidad global detectados en aguas con el menor nivel de turbidez ($P < 0,05$).

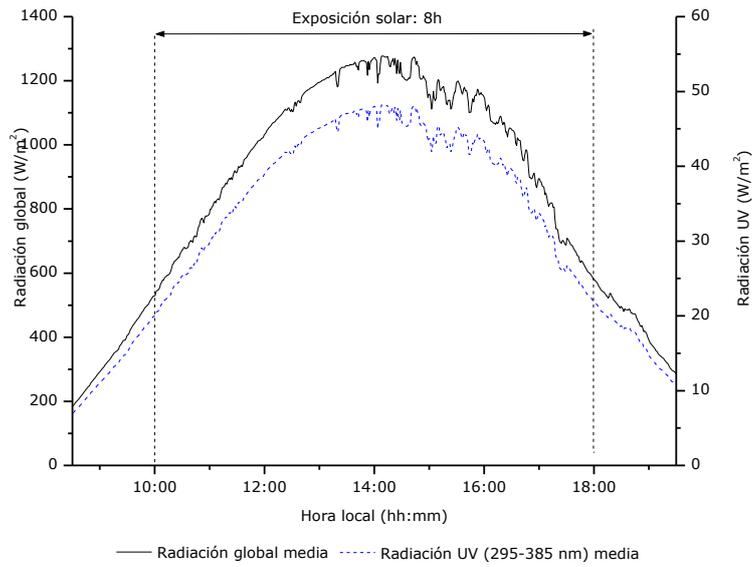


Figura 25. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas turbias contaminadas con oquistes de *C. parvum* utilizando un reactor solar de 25 l equipado con un CPC.

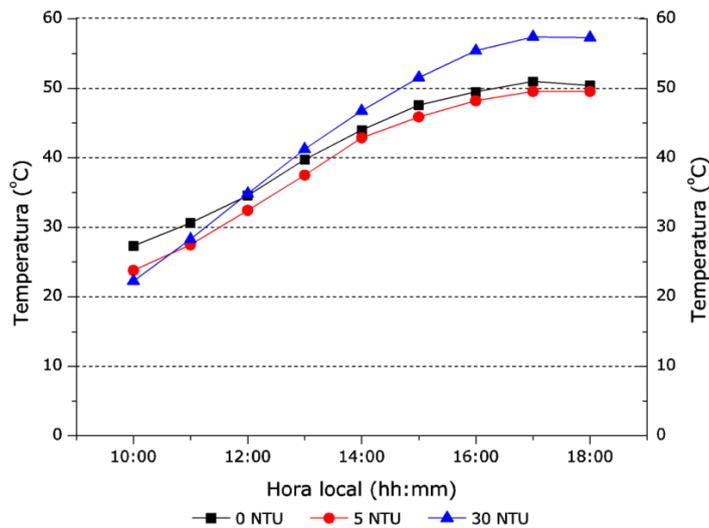


Figura 26. Perfiles de temperatura media registrados en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en un reactor solar de 25 l equipado con un CPC.

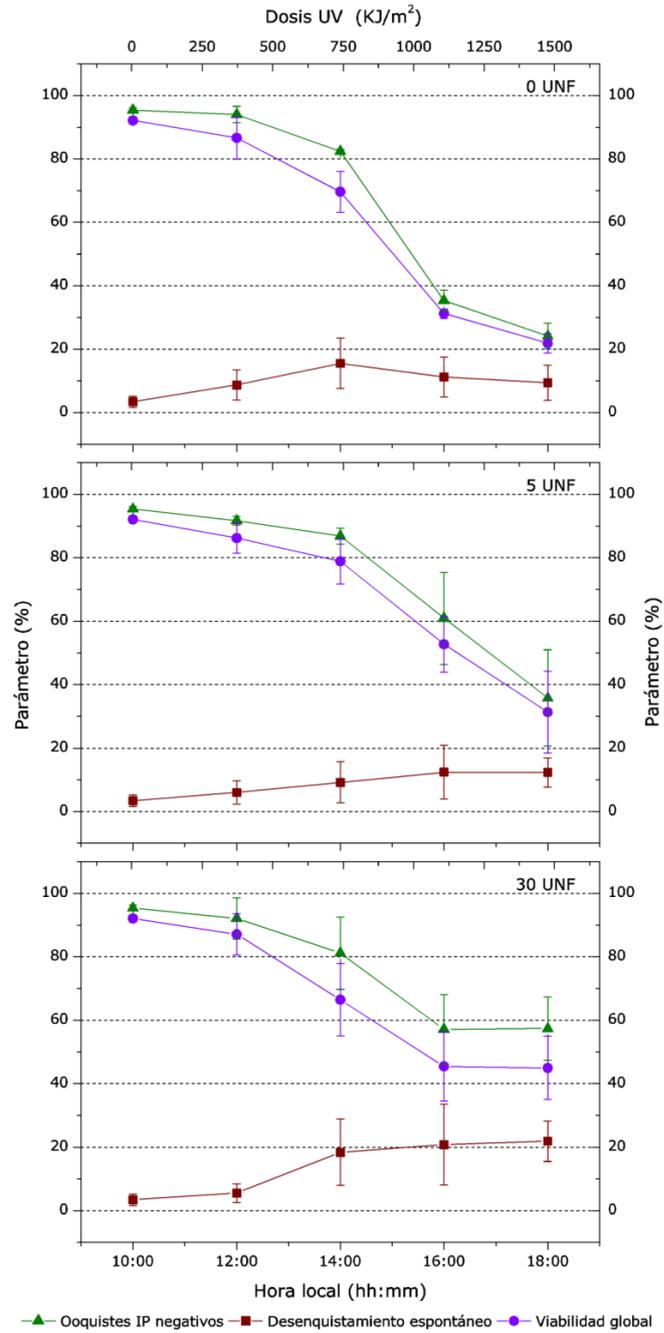


Figura 27. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas con distintos niveles de turbidez contenidas en un reactor solar de 25 l equipado con un CPC y expuesto a la radiación solar natural durante 8 horas.

3.3. Estudio comparativo de la eficacia de distintos reactores solares en la inactivación de los ooquistes de *C. parvum*

En este apartado, se comparan los valores obtenidos mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP en los estudios de evaluación de reactores solares de distinta capacidad equipados con CPC y los obtenidos empleando botellas PET. Los resultados se expresan como porcentajes de reducción de la potencial viabilidad ooquistica con respecto a los valores iniciales de los aislados de *C. parvum* utilizados en los distintos estudios.

Independientemente del reactor utilizado y de los niveles de turbidez ensayados, el análisis global de los datos pone de manifiesto que a medida que aumenta el tiempo de exposición disminuye la viabilidad ooquistica, siendo esta reducción más notoria en aguas con los menores niveles de turbidez. De igual forma, también se observa que a medida que aumenta la turbidez del agua son necesarios tiempos de exposición más prolongados para disminuir la viabilidad ooquistica (Tabla 13).

Los resultados obtenidos empleando los cuatro tipos de reactores solares demuestran unos mayores porcentajes de reducción de la viabilidad ooquistica cuando se emplean reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1 y CPC1,89, siendo significativamente mayores a los detectados con los otros dos reactores y ya a partir del menor tiempo de exposición (4 horas) ($P < 0,05$). Ambos reactores presentaron un patrón de inactivación ooquistica similar, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre sí, consiguiendo, al final de los ensayos, anular o prácticamente reducir a cero la viabilidad ooquistica en aguas con distintos niveles de turbidez. Los ensayos realizados empleando el reactor solar de 25 l de capacidad, tras 8 horas de exposición, no mostraron diferencias significativas con los determinados en botellas PET cuando aguas de 0 y 5 UNF de turbidez se expusieron a la radiación solar natural.

4. RESISTENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* A TEMPERATURAS ALCANZABLES EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN SOLAR DEL AGUA

Se evaluó la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* cuando se expusieron a temperaturas de 37; 40; 42; 44; 46; 48; y 50 °C durante periodos de 2; 4; 6; 8; 10; y 12 horas, calculándose al final de cada tiempo de exposición la viabilidad global ooquistica, previa determinación de los porcentajes de ooquistes IP negativos y de desenquistamiento espontáneo, y comprobando la infectividad en el modelo murino lactante tras el máximo tiempo de exposición.

Tabla 13. Resultados del estudio comparativo de la eficacia de distintos reactores solares en la inactivación de los oocistos de *C. parvum* en aguas con diferentes niveles de turbidez expuestas a la radiación solar natural.

Turbidez	Tiempo de exposición (horas)			Tiempo de exposición (horas)			Tiempo de exposición (horas)			Tiempo de exposición (horas)		
	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12
0 UNF	509,3	876,9	1037,1	493,8	959,6	1082,3	505,9	988,0	1525,2	742,9	1474,0	ND
Radiación UV acumulada (KJ/m ²)												
Reducción viabilidad (%)	66,4	76,0	87,4	91,5	92,1	99,0	89,6	98,1	100,0	13,6	74,7	ND
5 UNF	509,3	876,9	1037,1	482,5	954,6	1473,1	507,9	978,3	1479,4	743,2	1487,2	ND
Radiación UV acumulada (KJ/m ²)												
Reducción viabilidad (%)	49,7	59,9	71,6	81,5	93,9	98,0	90,0	98,8	99,3	9,0	62,5	ND
100 UNF	509,3	876,9	1037,1	550,7	987,0	1523,1	508,4	847,8	1485,2	ND	ND	ND
Radiación UV acumulada (KJ/m ²)												
Reducción viabilidad (%)	31,1	52,2	54,7	78,2	95,9	100,0	82,2	95,8	97,2	ND	ND	ND

A, botellas PET; B, reactor de 2,5 l equipado con CPC1; C, reactor de 2,5 l equipado con CPC1,89; D, reactor de 25 l equipado con un CPC. ND, no determinado



La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $83,3 \pm 2,4\%$ (ooquistes enteros, $91,2 \pm 6,2\%$; ooquistes IP negativos, $91,5 \pm 3,6\%$) y la infectividad comprobada mediante bioensayos en ratón fue del 100%, ofreciendo una intensidad media de infección de $5,1 \pm 0,5 \times 10^6$ ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado.

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global se muestran en la Figura 28. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la potencial viabilidad ooquistica (porcentaje de ooquistes IP negativos) cuando los ooquistes se expusieron a temperaturas de 37 y 40 °C. Sin embargo, y a partir de 6 horas de exposición a 42 °C, se comprobó un descenso significativo en el porcentaje de ooquistes IP negativos ($84,7 \pm 0,6\%$ vs $91,5 \pm 3,6\%$) ($P < 0,05$), siendo del $70,0 \pm 5,6\%$ tras 12 horas de exposición. Cuando los ooquistes de *C. parvum* se expusieron a temperaturas elevadas (44-50 °C), se alcanzaron, incluso a los menores tiempos de exposición, los valores más bajos en el porcentaje de ooquistes IP negativos ($P < 0,05$). Así, tras 4 horas de exposición a 50 °C, este valor fue de $58,3 \pm 1,5\%$ y en torno a un 50% tras el máximo tiempo de exposición (12 horas).

Por otra parte, las variaciones observadas en el desenquistamiento espontáneo mostraron dos perfiles diferentes. Los ooquistes expuestos a temperaturas de 37; 40; y 50 °C no experimentan cambios estadísticamente significativos en el fenómeno del desenquistamiento espontáneo durante las seis primeras horas del ensayo. Sin embargo, tras este periodo de exposición a 40 °C, se produce un incremento en el porcentaje de desenquistamiento espontáneo ($15,5 \pm 4,0\%$ vs $8,8 \pm 6,2\%$ correspondiente al valor inicial del aislado), que es más intenso tras 12 horas de exposición ($30,5 \pm 5,7\%$ vs $8,8 \pm 6,2\%$). A temperaturas intermedias, comprendidas entre 42-48 °C, se observó un incremento gradual en el porcentaje de desenquistamiento espontáneo a medida que aumenta el tiempo de exposición ($P < 0,05$), alcanzando un valor máximo de $53,8 \pm 12,4\%$ tras 12 horas de exposición a 46 °C.

Consecuentemente, los valores de viabilidad global ooquistica experimentaron un descenso estadísticamente significativo cuando los ooquistes se expusieron a valores de temperatura comprendidos entre 40-50 °C ($P < 0,05$), alcanzándose al final del ensayo un valor de $24,7 \pm 10,7\%$ cuando los ooquistes se expusieron a 46 °C.

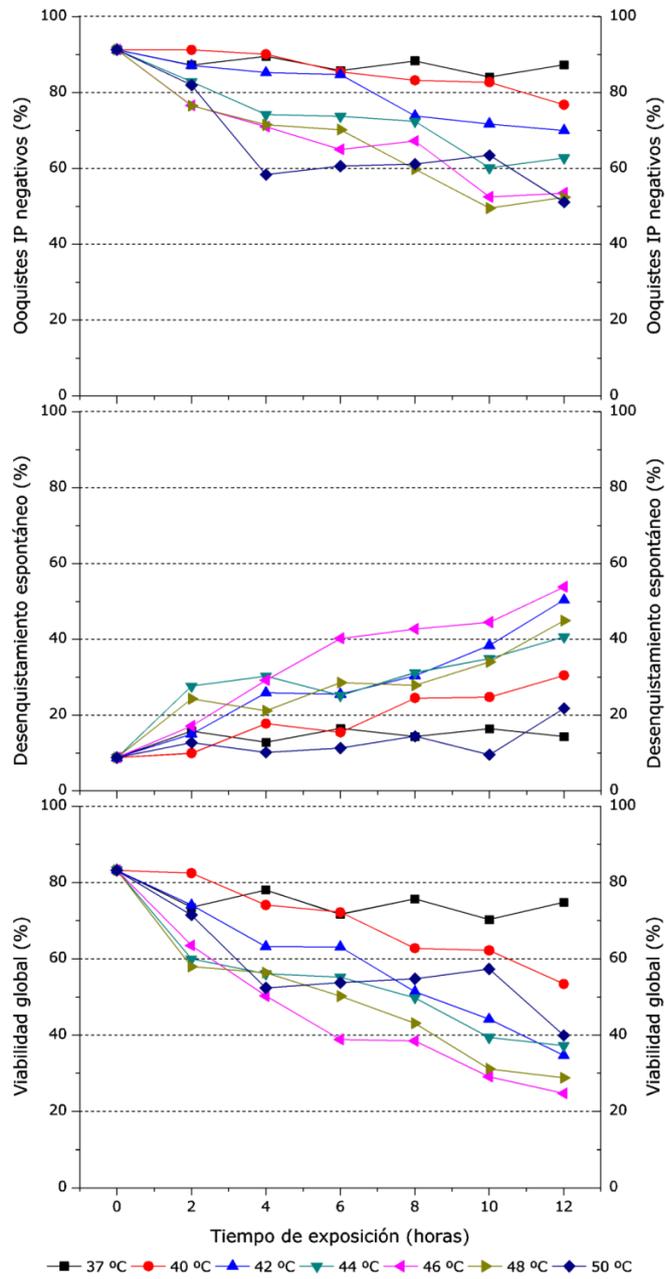


Figura 28. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* cuando se exponen a temperaturas alcanzables en los procesos de desinfección solar del agua durante periodos de 2; 4; 6; 8; 10; y 12 horas.

Los resultados de infectividad obtenidos en el modelo murino lactante con los ooquistes expuestos durante 12 horas a las diferentes temperaturas ensayadas, revelan un ligero descenso tras la exposición de los mismos a 42-44 °C y una brusca caída de la infectividad a 46 °C (19,4% vs 100%), anulándose a 48-50 °C. Por lo que respecta a la intensidad de infección, se observa que ésta disminuye a medida que aumenta la temperatura, experimentando un fuerte descenso cuando los ooquistes se exponen a temperaturas de 40-42 °C ($P < 0,05$), alcanzándose un valor de $0,2 \pm 0,1 \times 10^6$ ooquistes/totalidad intestino homogenizado a 46 °C (Figura 29).

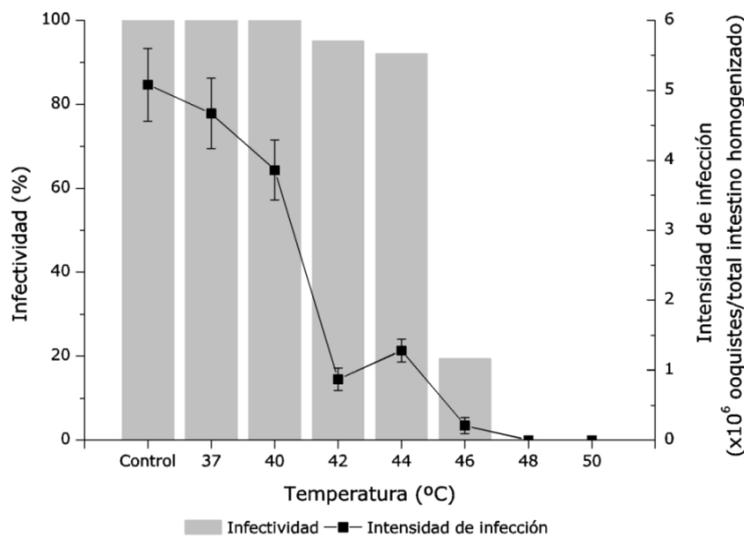


Figura 29. Evolución de la infectividad y de la intensidad de infección de los ooquistes de *C. parvum* tras 12 horas de exposición a temperaturas alcanzables en los procesos de desinfección solar del agua.

5. APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS EN LA DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM*

5.1. Resultados del empleo del fotocatalizador TiO_2

Durante los días 9 y 10 de julio de 2009, se realizaron en la PSA los estudios de desinfección solar de aguas experimentalmente contaminadas con ooquistes purificados de *C. parvum* empleando reactores solares de 14 l de capacidad equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO_2 . Los días durante los cuales se realizaron los ensayos presentaron cierta nubosidad. Los valores promedio de

radiación global y UV acumuladas (entre las 10:00-18:00 horas, hora local) fueron de $23,0 \pm 1,8$ MJ/m² y $897,2 \pm 29,6$ KJ/m², respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de 1058,7 y 42,1 W/m², respectivamente (Figura 30). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de 21,0 °C y un máximo de 31,0 °C. Las temperaturas medias registradas en el interior de los reactores y monitorizadas cada hora se reflejan en la Figura 31. Los valores máximos de temperatura alcanzados fueron de 38,4 °C (13:00 horas, hora local) y 37,6 °C (16:00 horas, hora local) en aguas contenidas en reactores en presencia y ausencia del fotocatalizador, respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores registrados durante los estudios.

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $92,5 \pm 1,2\%$ (ooquistes enteros, $97,2 \pm 1,6\%$; ooquistes IP negativos, $95,2 \pm 0,8\%$).

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global obtenidas en agua destilada en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO₂ a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 32. En ambas condiciones, se observó un descenso progresivo del porcentaje de ooquistes IP negativos. Al final de los ensayos los valores obtenidos fueron de $52,7 \pm 3,5\%$ y $56,8 \pm 5,9\%$ para muestras expuestas en los reactores con y sin fotocatalizador, respectivamente, valores significativamente inferiores al correspondiente valor inicial del aislado utilizado ($P < 0,0001$).

Cuando se valoró el fenómeno del desenquistamiento espontáneo se observó un incremento en el porcentaje de ooquistes desenquistados durante las primeras 4-6 horas de exposición, alcanzándose los valores máximos tras 4 horas de exposición en presencia del fotocatalizador ($20,7 \pm 4,3\%$; 14:00 horas, hora local) y tras 6 horas de exposición, en ausencia del mismo ($18,5 \pm 3,5\%$; 16:00 horas, hora local). No se observaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al valor inicial del aislado ($P < 0,0001$).

Como consecuencia, se observó una disminución en la viabilidad global ooquística, que mostró una trayectoria paralela en las muestras de agua ensayadas en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO₂. Así, para ambos ensayos, la viabilidad global ooquística experimenta un descenso progresivo a medida que transcurre el tiempo de exposición, siendo éste más acusado durante las dos primeras horas de exposición. Al final de los ensayos, los valores de viabilidad global alcanzados fueron de $44,2 \pm 4,2\%$ y de $48,5 \pm 4,7\%$ en presencia/ausencia del fotocatalizador, respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores, pero sí con respecto al valor inicial del aislado ($P < 0,0001$).

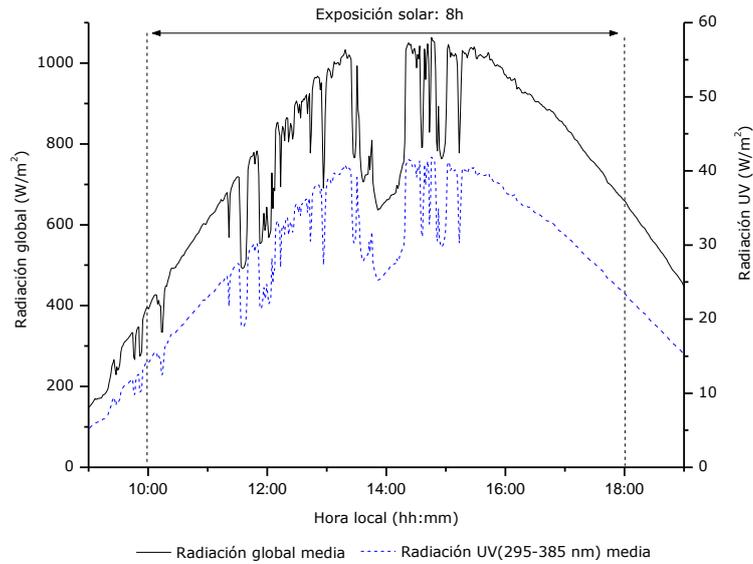


Figura 30. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum* utilizando reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO₂.

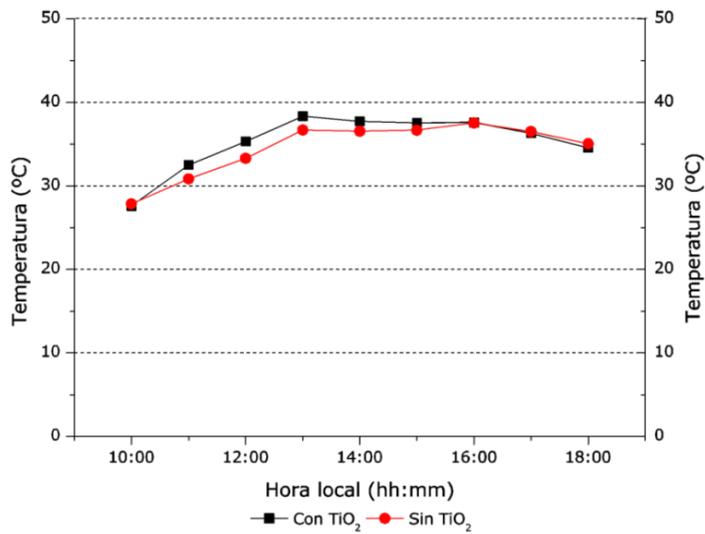


Figura 31. Perfiles de temperatura media registrados en aguas contenidas en reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO₂.

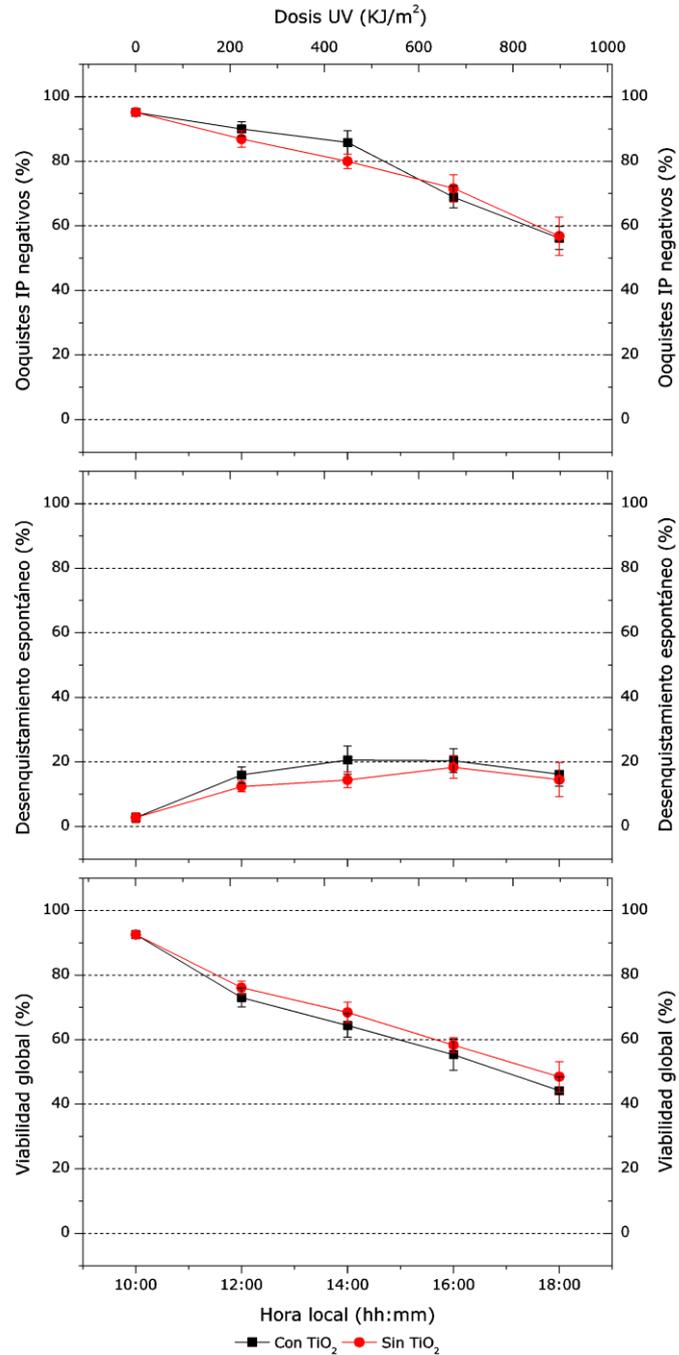


Figura 32. Cinéticas de inactivación de los oocistes de *C. parvum* en aguas contenidas en reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante en presencia/ausencia del fotocatalizador TiO₂ y expuestos a la radiación solar natural.

5.2. Resultados del empleo del oxidante H₂O₂

5.2.1. En condiciones naturales de radiación solar

Durante el periodo comprendido entre el 7-13 de julio de 2010, se realizaron en la PSA los estudios destinados a evaluar la utilización del H₂O₂ en la desinfección solar de aguas contaminadas experimentalmente con ooquistes purificados de *C. parvum*, empleando para ello reactores solares de 500 ml y una concentración de aproximadamente 500 mg/l de H₂O₂. Los días durante los cuales se realizaron los ensayos fueron soleados y con cierta nubosidad. Los valores promedio de radiación global y UV acumuladas (entre las 11:00-16:00 horas, hora local) fueron de 15,4±1,6 MJ/m² y 600,0±60,8 KJ/m², respectivamente. Los valores máximos de radiación global y UV registrados fueron de 1157,6 y 37,0 W/m², respectivamente (Figura 33). La temperatura ambiental osciló entre un valor mínimo de 24,5 °C y un máximo de 42,0 °C. Las temperaturas medias registradas en el interior de los reactores y monitorizadas cada hora se reflejan en la Figura 34. Los valores máximos de temperatura alcanzados fueron de 41,1; 40,6; 39,0; y 38,8 °C en aguas expuestas en reactores en presencia y ausencia de H₂O₂ y en los correspondientes controles de exposición en oscuridad, respectivamente. Se detectaron valores ligeramente superiores en las muestras expuestas a la radiación solar con respecto a los controles de exposición en oscuridad, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La evolución de la concentración de H₂O₂ determinada cada hora a lo largo del estudio mediante el método colorimétrico del TiOSO₄ se muestra en la Figura 35. Se comprobó una disminución en la concentración de H₂O₂ en las muestras expuestas a la radiación solar, siendo esta reducción estadísticamente significativa con respecto a las concentraciones determinadas en los correspondientes controles de exposición en oscuridad ($P < 0,05$). Así, la concentración de H₂O₂ disminuyó desde un valor inicial de 553,9±34,9 hasta 395,5±1,4 mg/l tras 5 horas de exposición a la radiación solar (16:00 horas, hora local).

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del 95,5±1,5% (ooquistes enteros, 97,5±1,5%; ooquistes IP negativos, 97,1±2,7%). Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global, obtenidas en agua destilada en presencia/ausencia de H₂O₂ a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 36. Se observó un descenso estadísticamente significativo ($P < 0,01$) en la potencial viabilidad ooquistica (porcentaje de ooquistes IP negativos) en muestras de agua expuestas a la radiación solar en presencia/ausencia de

H₂O₂ a partir de las 2,5 horas de exposición con respecto a los correspondientes controles de exposición en oscuridad. Al final del estudio (16:00 horas, hora local), se determinaron valores de $67,4 \pm 6,5$ y $78,1 \pm 4,2\%$ en muestras expuestas a la radiación solar en presencia/ausencia de H₂O₂, respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero sí con los correspondientes controles de exposición en oscuridad ($P < 0,05$).

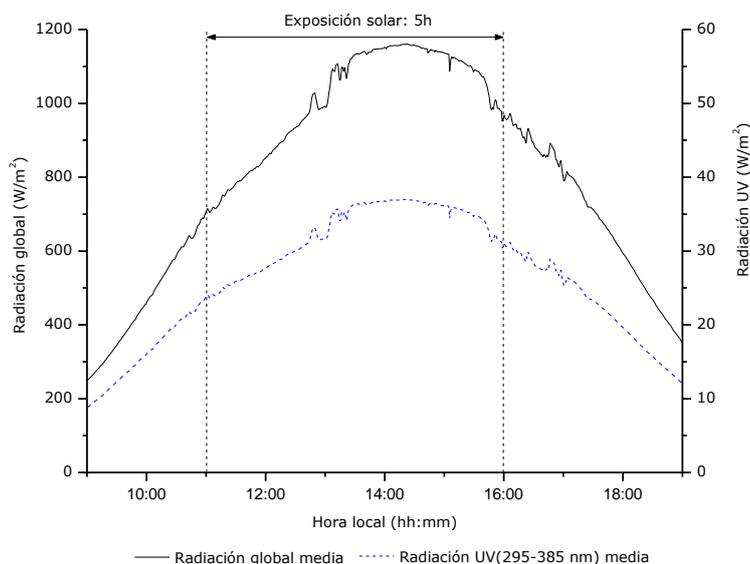


Figura 33. Representación gráfica de los valores medios de radiación global y UV registrados durante los días en los que se realizaron los estudios de desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum* utilizando reactores de 500 ml en presencia/ausencia del oxidante H₂O₂.

Por otra parte, se comprobó un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de ooquistes que se desenquistaron espontáneamente en las muestras expuestas a la radiación solar durante 5 horas en presencia/ausencia de H₂O₂, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero sí con respecto a los correspondientes controles de exposición en oscuridad ($27,1 \pm 14,8$ y $12,8 \pm 3,8\%$ vs $7,9 \pm 1,9$ y $4,5 \pm 2,0\%$, respectivamente) ($P < 0,05$).

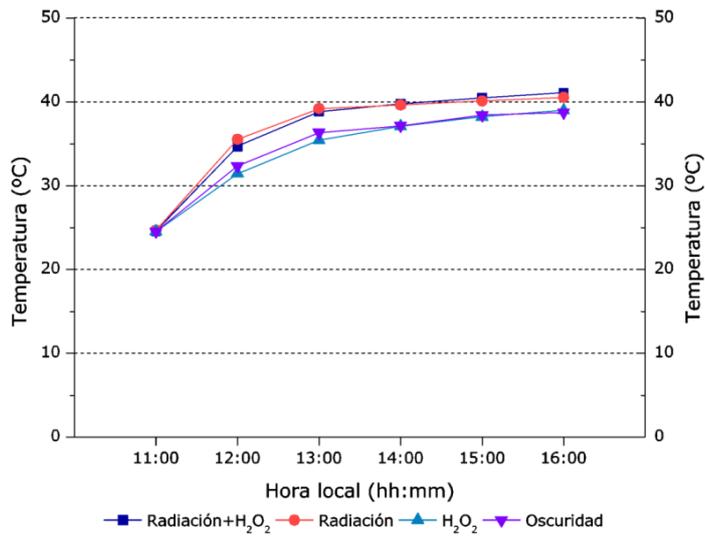


Figura 34. Perfiles de temperatura media registrados en el interior de reactores solares durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar el empleo del H₂O₂ en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.

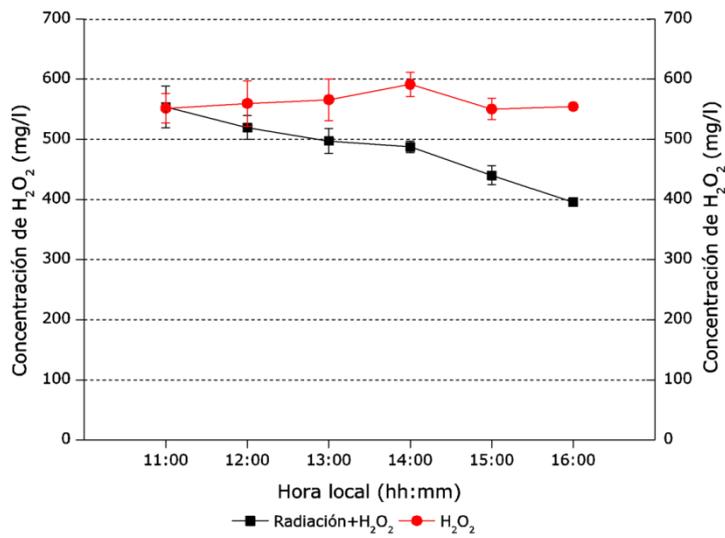


Figura 35. Evolución de la concentración de H₂O₂ durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar su empleo en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.

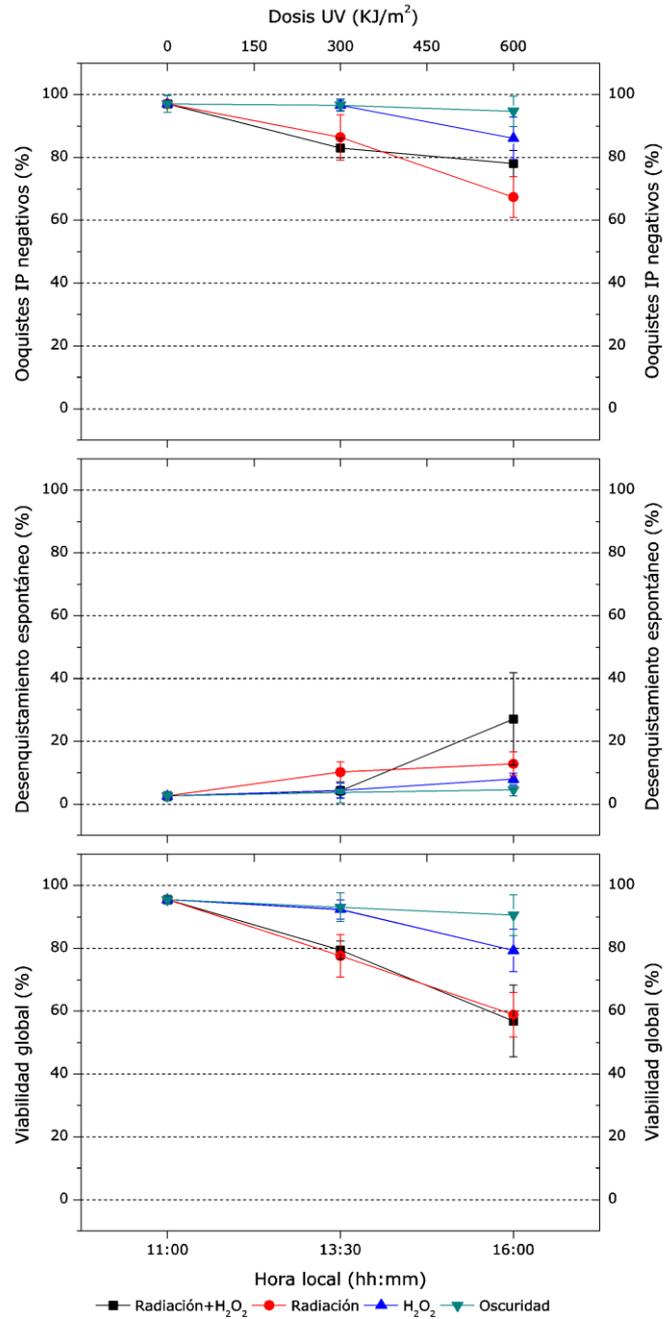


Figura 36. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas contenidas en reactores solares de 500 ml durante los ensayos realizados en condiciones naturales para evaluar el empleo del H₂O₂ en la desinfección solar de aguas.

Consecuentemente, se observó una progresiva disminución de la viabilidad global ooquistica en las muestras de agua expuestas a la radiación solar natural tanto en presencia como en ausencia de H_2O_2 , no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas a lo largo del estudio pero sí con respecto a los correspondientes controles de exposición en oscuridad ($P < 0,005$). En el control de exposición en oscuridad realizado en presencia de H_2O_2 , se observó tras 5 horas de exposición una reducción de la viabilidad global ooquistica, la cual fue estadísticamente significativa con respecto a los valores obtenidos en el correspondiente control de oscuridad sin H_2O_2 ($P < 0,05$). Así, al final del estudio, los porcentajes de viabilidad global calculados fueron de $56,9 \pm 11,4$ y $58,9 \pm 7,1\%$ vs $79,3 \pm 6,7$ y $90,6 \pm 6,5\%$ en las muestras de agua expuestas a la radiación solar en presencia/ausencia de H_2O_2 y los correspondientes controles de exposición en oscuridad, respectivamente.

5.2.2. En condiciones simuladas de radiación solar

Reactores solares de 25 ml conteniendo agua destilada contaminada experimentalmente con ooquistes purificados de *C. parvum* y una concentración de aproximadamente 500 mg/l de H_2O_2 , se expusieron en un simulador de la radiación solar durante un periodo máximo de 5 horas. De acuerdo con la información aportada por la Dra. Fernández Ibáñez de la PSA, se estableció una intensidad de radiación global de 350 W/m^2 (~33 W/m^2 de radiación UV), de forma que el valor promedio de radiación UV acumulada tras 5 horas de exposición fue de aproximadamente 594 KJ/m^2 . La temperatura de la cámara de exposición se reguló, manteniéndose en un valor máximo de 40 °C.

La evolución de la concentración de H_2O_2 determinada cada hora a lo largo del estudio mediante el método colorimétrico del $TiOSO_4$ se muestra en la Figura 37. Se comprobó una disminución en la concentración de H_2O_2 en las muestras expuestas a la radiación solar simulada, siendo esta reducción estadísticamente significativa con respecto a las concentraciones determinadas en los correspondientes controles en oscuridad ($P < 0,05$). La concentración de H_2O_2 disminuyó desde un valor inicial de $569,8 \pm 14,8$ mg/l hasta $481,4 \pm 11,7$ mg/l tras 5 horas de exposición en condiciones simuladas de radiación solar.

La viabilidad global del aislado de *C. parvum* utilizado en la realización de estos estudios y calculada de acuerdo con la Ec. 5 fue del $97,3 \pm 1,1\%$ (ooquistes enteros, $98,8 \pm 0,7\%$; ooquistes IP negativos, $98,5 \pm 0,8\%$); el desenquistamiento inducido calculado de acuerdo con la Ec. 6 fue del $93,7 \pm 3,3\%$; y la infectividad obtenida en el modelo murino lactante del 100% con una intensidad media de infección de $2,3 \pm 1,3 \times 10^6$ ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado.

Las evoluciones de la inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, del desenquistamiento espontáneo y de la viabilidad global, obtenidas en agua destilada en presencia/ausencia del oxidante H_2O_2 a los distintos tiempos de exposición se muestran en la Figura 38. Se observó, un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de ooquistes IP negativos en las muestras expuestas en presencia/ausencia de H_2O_2 a la radiación solar simulada tras 2,5 horas de exposición, siendo esta disminución más intensa en muestras de agua expuestas en presencia de H_2O_2 ($P < 0,001$). Tras el máximo periodo de exposición (5 horas), la potencial viabilidad ooquistística es prácticamente nula en muestras expuestas en presencia del oxidante ($0,3 \pm 0,7\%$), presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor obtenido en las muestras expuestas a la radiación solar simulada sin el oxidante ($11,2 \pm 3,2\%$) ($P < 0,05$).

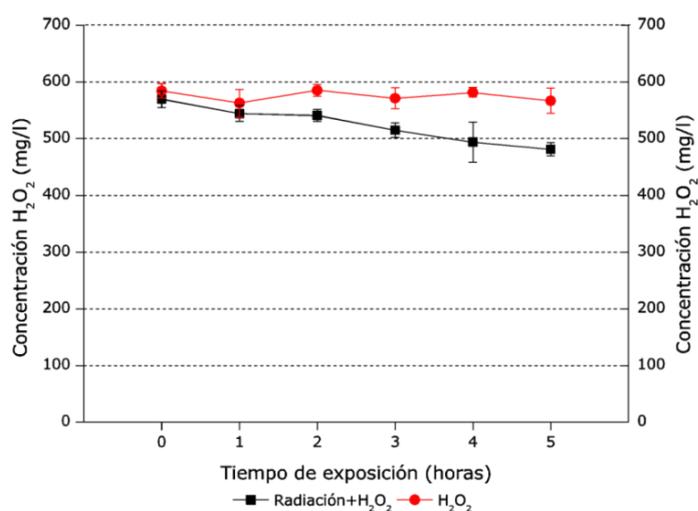


Figura 37. Evolución de la concentración de H_2O_2 durante los ensayos realizados en condiciones simuladas de radiación solar para evaluar su empleo en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.

Por otra parte, se comprobó un ligero incremento en el desenquistamiento espontáneo tras 2,5 horas de exposición en las muestras expuestas a la radiación solar simulada en ausencia del H_2O_2 ($5,4 \pm 1,7\%$ vs $1,2 \pm 0,7\%$), manteniéndose dichos valores hasta el final de los estudios ($5,7 \pm 2,9\%$). En el resto de los ensayos realizados no se observaron diferencias significativas con respecto al valor inicial del aislado utilizado.

La viabilidad global ooquistística presentó una evolución similar a la observada en el porcentaje de ooquistes IP negativos. Así, tras 2,5 horas de exposición, este parámetro disminuyó significativamente en muestras expuestas a la radiación solar simulada en

presencia/ausencia de H_2O_2 , siendo este descenso más acusado en las muestras expuestas en presencia del oxidante ($20,9 \pm 4,9\%$ vs $73,6 \pm 2,7\%$) y alcanzando valores próximos a cero al final de los ensayos ($0,3 \pm 0,7\%$) ($P < 0,01$). Sin embargo, tras el máximo periodo de exposición la viabilidad global ooquistica determinada en muestras sin H_2O_2 fue de $10,6 \pm 3,2\%$. Además, se observó una reducción en la viabilidad global tras 5 horas de exposición en el control de oscuridad realizado en presencia de H_2O_2 , mostrando diferencias estadísticamente significativas con los correspondientes valores obtenidos en el control en oscuridad y ausencia de H_2O_2 ($P < 0,05$).

La valoración del desenquistamiento inducido (Figura 39) demostró un brusco e importante descenso tras 2,5 horas de exposición en los ensayos realizados tanto en presencia como en ausencia de H_2O_2 , así como en el control de oscuridad en presencia del oxidante. Los porcentajes de desenquistamiento inducido obtenidos en estas condiciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Sin embargo, sí se detectaron diferencias con respecto a los correspondientes valores obtenidos en el control de oscuridad y ausencia de H_2O_2 ($P < 0,05$). Tras el máximo periodo de exposición, el porcentaje de desenquistamiento inducido determinado en muestras de agua expuestas a la radiación solar simulada en presencia de H_2O_2 fue de $2,3 \pm 1,0\%$ mientras que los valores obtenidos para el resto de los ensayos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los correspondientes valores obtenidos en el periodo anterior.

En la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos en los bioensayos realizados en ratones lactantes. Se observó que los ooquistes mantenidos en oscuridad originaron una prevalencia e intensidad de infección similar a las obtenidas en las camadas control. Descensos estadísticamente significativos, tanto en la infectividad como en la intensidad de infección, se observaron a los dos tiempos de exposición establecidos para ooquistes mantenidos en oscuridad pero en presencia de H_2O_2 ($P < 0,001$). Así, se obtuvieron prevalencias de 36,0 y 18,5% tras 2,5 y 5 horas de exposición, respectivamente, e intensidades de infección en torno a $0,05 \pm 0,1 \times 10^6$ ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado. En los ensayos realizados bajo radiación solar simulada en presencia/ausencia de H_2O_2 , se anuló la infectividad ooquistica, salvo en el estudio realizado en ausencia de H_2O_2 tras 2,5 horas de exposición. En este caso, la prevalencia obtenida fue de un 7,4% y la intensidad de infección de $0,009 \pm 0,04 \times 10^6$ ooquistes en la totalidad del intestino homogenizado.

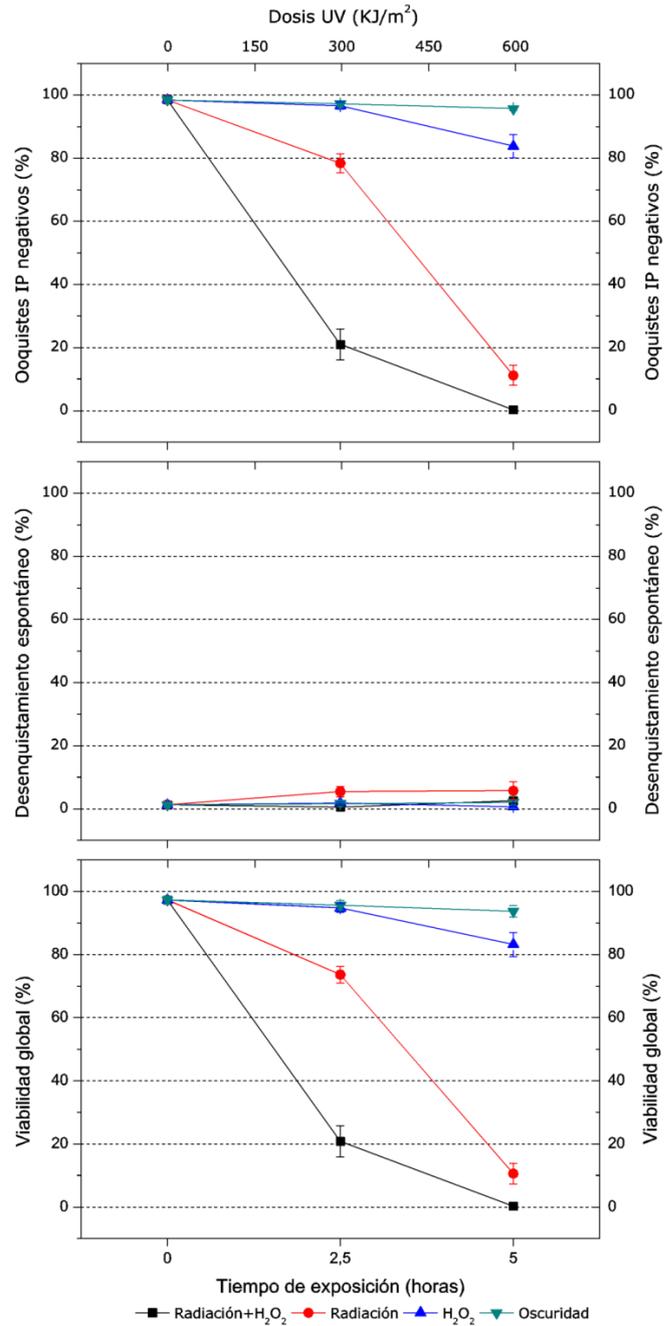


Figura 38. Cinéticas de inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en aguas contenidas en reactores solares de 25 ml durante los ensayos realizados en condiciones simuladas de radiación solar para evaluar el empleo del H₂O₂ en la desinfección solar de aguas.

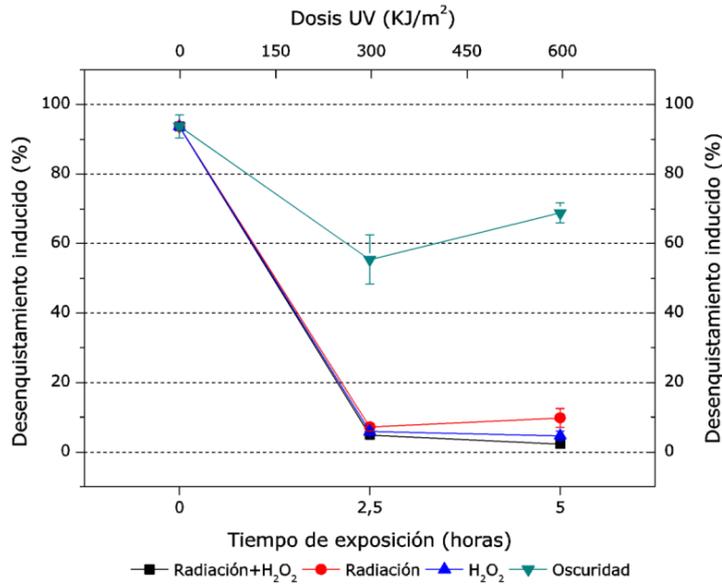


Figura 39. Efecto del H₂O₂ sobre el desenquistamiento inducido de los ooquistes de *C. parvum* en condiciones simuladas de radiación solar.

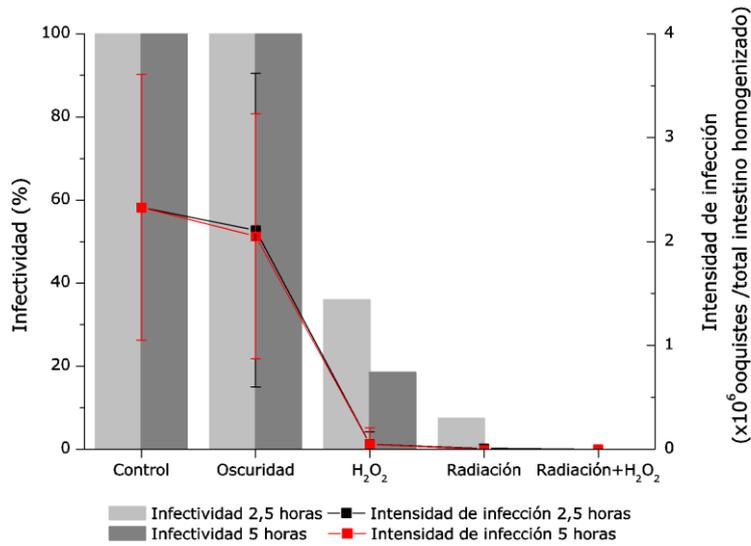


Figura 40. Efecto del H₂O₂ sobre la infectividad de los ooquistes de *C. parvum* en condiciones simuladas de radiación solar.

DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas que afectan a la humanidad y que se prevee se acentúe en un futuro próximo, es la cada vez más limitada disponibilidad de los recursos hídricos. Como factores responsables de esta situación sobresalen el crecimiento demográfico y el cambio climático experimentados en estas últimas décadas, sin excluir la gestión inadecuada del agua y el incremento del consumo por parte de los países industrializados. Datos aportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) establecen que en el sector agrícola se emplea un 70% del agua dulce disponible a nivel mundial, alcanzando un valor del 95% en los países en vías de desarrollo (se estima un promedio de 2-5 l para satisfacer las necesidades hídricas por persona y día frente a 2000-5000 l para producir los correspondientes requerimientos nutricionales). Ante esta situación, diversos organismos internacionales propugnan la política de la no utilización de recursos hídricos de mayor calidad en usos que pudiesen admitir el empleo de agua con propiedades más bajas, promoviendo de esta forma una mejor gestión de este preciado y limitado recurso (FAO, 2011).

Por otra parte, la enfermedad diarreica (la sexta causa de mortalidad a nivel mundial) se relaciona frecuentemente con el consumo de agua contaminada. En África, Asia, Sudamérica y la región del Caribe, aproximadamente 1000 millones de personas, sobre todo en zonas rurales, no disponen de acceso a agua de bebida limpia (OMS/UNICEF, 2000). Recientemente, la OMS y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) reclamaron la necesidad de mejorar la calidad del agua de bebida y el establecimiento de una sanidad básica con el fin de disminuir la mortalidad infantil y combatir el principal mecanismo de transmisión de las enfermedades diarreicas (OMS/UNICEF, 2005).

Es bien conocido que la radiación solar es un agente genotóxico, siendo las radiaciones UV-A y UV-B los más importantes componentes del espectro electromagnético responsables de daños biológicos y mutagénicos (Ravanat y col., 2001). Aunque la radiación de longitud de onda corta puede alterar la mayoría de las macromoléculas, entre las que se incluyen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, diferentes estudios demostraron que el daño en la estructura y función del ADN es el principal mecanismo responsable del daño celular y consiguiente pérdida de la viabilidad (Malloy y col., 1997; Friedberg y col., 2006).

El diseño factorial 2×3 de primer orden utilizado en el estudio realizado bajo condiciones simuladas de radiación solar con el objetivo de evaluar los efectos combinados de la turbidez del agua, la intensidad de la radiación solar y el tiempo de exposición sobre la

supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* en agua de bebida, demostró que los tres parámetros independientemente, así como las interacciones intensidad de radiación-tiempo de exposición y nivel de turbidez-intensidad de radiación son factores que influyen de forma estadísticamente significativa sobre la viabilidad e infectividad de este enteropatógeno de transmisión hídrica. Las ecuaciones empíricas obtenidas con los distintos parámetros evaluados demostraron que el mayor coeficiente con signo negativo correspondió a la intensidad de radiación. Se observó que, independientemente del tiempo de exposición y del nivel de turbidez, la menor intensidad de radiación evaluada (200 W/m^2 , correspondiente a días totalmente nublados en áreas ecuatoriales) no ejerció una influencia estadísticamente significativa sobre la supervivencia ooquistica. Por el contrario, el porcentaje de ooquistes IP negativos (potencialmente viables) y la infectividad, determinada en el modelo murino lactante, tienden a disminuir cuando las muestras hídricas se expusieron a una intensidad de radiación $\geq 600 \text{ W/m}^2$ (correspondiente a días parcialmente nublados en áreas ecuatoriales). A la máxima intensidad de radiación evaluada (900 W/m^2 , correspondiente a días soleados) se observaron descensos estadísticamente significativos en la potencial viabilidad e infectividad ooquisticas, tanto para los distintos niveles de turbidez como para los diferentes tiempos de exposición ensayados. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con las recomendaciones del Centro Mundial de Referencia del método SODIS, el cual establece que un área geográfica es adecuada para la aplicación de esta técnica cuando recibe entre 3-5 horas de radiación solar superior a 500 W/m^2 (EAWAG, 2011).

Además, en aquellas zonas geográficas en las que la OMS recomienda el empleo del método SODIS como una técnica alternativa para mejorar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano, los valores de turbidez varían en un amplio rango. Por ejemplo, en Kenia y dependiendo de las condiciones climáticas y el momento de la recogida del agua, la turbidez puede variar entre 5-2000 UNF en un mismo día (Joyce y col., 1996). Estos autores demostraron que en muestras de agua con niveles de turbidez superiores a 200 UNF tan sólo un 1% de la radiación UV incidente penetra más allá de 2 cm de la superficie. De todas formas, Conroy y col. (1999) observaron una reducción en el riesgo de enfermedades diarreicas en niños de la etnia Masái que habían consumido agua con niveles de turbidez superiores a 200 UNF y previamente expuesta a la luz solar. A este respecto, en el estudio experimental realizado se comprobó que la disminución de la infectividad de los ooquistes de *C. parvum* comienza a manifestarse tras 8 horas de exposición a una intensidad de radiación de 600 W/m^2 en aguas con el menor nivel de turbidez ensayado (5 UNF) mientras que son necesarios tiempos de exposición más prolongados para muestras de 100 y 300 UNF.

En un reciente estudio llevado a cabo bajo condiciones naturales y durante días con distinta intensidad de radiación solar, King y col. (2008) observaron una rápida inactivación de los ooquistes de *C. parvum* en agua (>90% de inactivación en la primera hora). Sin embargo, en nuestro trabajo realizado bajo condiciones simuladas, comprobamos que la capacidad infectante de los ooquistes puede mantenerse en aguas turbias tras la exposición de las mismas durante 12 horas a la máxima intensidad de radiación ensayada.

Las ecuaciones obtenidas son válidas para predecir la potencial viabilidad e infectividad de los ooquistes de *C. parvum* en el rango de condiciones ensayadas. El cálculo mediante ambas ecuaciones de los niveles de potencial viabilidad e infectividad ooquísticas demuestra que ambos valores están bien correlacionados, aunque la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP sobreestima la infectividad cuando ésta es menor del 100%. Teniendo en cuenta que los ensayos se realizaron a temperatura controlada (no superior a los 30 °C), para extrapolar estas ecuaciones a condiciones de campo es necesario la realización de estudios complementarios ya que los valores de temperatura que se pueden alcanzar durante la aplicación del método SODIS varían en función de la temperatura ambiente, topografía y microclima, estación del año y turbidez del agua (EAWAG, 2011).

Con tal fin, se llevaron a cabo estudios en la PSA, el mayor centro de investigación, desarrollo y ensayos de Europa dedicado a las tecnologías solares, en dónde se aplicó la técnica SODIS utilizando botellas PET y aguas turbias contaminadas experimentalmente con ooquistes purificados de *C. parvum*. En estos estudios, la eficacia del método SODIS se evaluó determinando la potencial viabilidad ooquística mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, indicador de la integridad de la pared ooquística (Campbell y col., 1992). Este método, relativamente económico, de rápida y sencilla ejecución, proporciona datos iniciales útiles en la investigación de la influencia de factores ambientales en la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., aunque es reconocido el hecho de que sobreestima la infectividad ooquística en comparación con los cultivos celulares o los bioensayos en modelos murinos. Por esta razón, los valores de viabilidad ooquística que se obtengan serán conservadores al corresponder a valores más bajos de infectividad (Robertson y Gjerde, 2007).

Los resultados hallados en este trabajo realizado bajo condiciones de campo demuestran que la potencial viabilidad ooquística se reduce progresivamente a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación solar, detectándose el máximo porcentaje de reducción tras 12 horas de exposición en agua destilada (0 UNF)(87,4%). Al igual que en los estudios anteriores, se observó que el incremento de la turbidez disminuye la acción de

la radiación solar. Así, a medida que aumenta el nivel de turbidez e independientemente del tiempo de exposición, se comprobó la ausencia de reducciones considerables en la viabilidad ooquistica. De esta forma y cuando empleamos aguas con el mayor nivel de turbidez (300 UNF), la viabilidad se redujo tan sólo un 19,2% después de 4 horas de exposición y en torno al 40% tras 8 y 12 horas de exposición.

Otro aspecto a tener en cuenta durante la aplicación del método SODIS es la elevación de la temperatura del agua como consecuencia de la radiación infrarroja del espectro solar, un factor crítico que determina la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el ambiente (King y Monis, 2007; Peng y col., 2008). Además, es conocido que cuando la temperatura ambiental supera los 20 °C puede favorecerse la eficacia de la técnica SODIS (EAWAG, 2011), describiéndose un fuerte efecto sinérgico entre los componentes óptico y térmico de la radiación solar a temperaturas superiores a los 45 °C (Wegelin y col., 1994; McGuigan y col., 1998). Sin embargo, en pruebas de campo realizadas en diferentes regiones geográficas, se comprobó que temperaturas superiores a 45 °C se alcanzan con muy poca frecuencia en áreas montañosas debido a su orografía, a la existencia de altos niveles de nubosidad y a temperaturas inferiores a las que se registran en altitudes más bajas (EAWAG, 2011). Por este motivo, se realizó un ensayo a temperatura controlada (20-25 °C) utilizando aguas con los niveles extremos de turbidez (0 y 300 UNF) para así, determinar el efecto que por sí solo tiene el componente óptico de la radiación solar sobre la potencial viabilidad ooquistica. Los resultados demostraron que la máxima reducción de la viabilidad ooquistica se produjo en agua clara (0 UNF) tras 12 horas de exposición (55,3%), mientras que en aguas muy turbias no rebasó el 13,9%, valores ambos significativamente inferiores a los obtenidos cuando no se reguló la temperatura.

Por otra parte, se evaluó experimentalmente el efecto que sobre la viabilidad e infectividad ooquisticas ejercen los perfiles de temperatura registrados en el interior de las botellas PET durante los ensayos realizados bajo condiciones de campo. Los resultados obtenidos tras los distintos tiempos de exposición demostraron un aumento significativo en el porcentaje de ooquistes que incorporaron el colorante vital fluorogénico IP (máximo en torno al 30%), así como un descenso de la infectividad y una disminución, también significativa, en la intensidad de infección determinada en el modelo murino lactante y observada ya al menor tiempo de exposición ($0,6 \pm 0,5$ vs $4,6 \pm 1,9$). Además, se comprobó que tiempos de exposición superiores a 8 horas no influyen significativamente sobre la viabilidad e infectividad ooquisticas.

Una observación realizada durante los estudios de campo fue la existencia del fenómeno de desenquistamiento espontáneo, previamente descrito por Smith y col. (2005). Dicho fenómeno consiste en que, en un pequeño porcentaje, los esporozoítos de *C. parvum* pueden desenquistarse cuando los ooquistes se incuban a 37 °C en ausencia de cualquier otro estímulo, haciendo por tanto imposible su supervivencia al encontrarse en un ambiente diferente al que le ofrecería un hospedador susceptible. Teniendo en cuenta que bajo condiciones de campo la temperatura superó los 37 °C durante aproximadamente 2,5; 6 y 7 horas en los ensayos de 4; 8 y 12 horas de exposición, respectivamente, la simulación de los perfiles de temperatura demostró un aumento significativo en el porcentaje de desenquistamiento espontáneo con respecto al determinado en el aislado inicial. Este resultado podría estar favorecido no sólo por el incremento de la temperatura sino también por el efecto combinado de ésta con largos periodos de exposición. Así, se justificarían los similares porcentajes de desenquistamiento obtenidos al final de los ensayos de 8 y 12 horas y que fueron significativamente superiores al obtenido durante el menor periodo de exposición.

Por otro lado, en un estudio realizado por Widmer y col. (2007) sobre la influencia de distintos factores en el desenquistamiento de ooquistes de distintas especies del género *Cryptosporidium*, se observó que la temperatura es un factor que favorece el desenquistamiento de *C. muris*, especie de localización gástrica, pero no el de *C. parvum*. Por tanto, los autores sugieren que la temperatura elevada por sí sola no es un factor esencial para el desenquistamiento de las especies de localización intestinal. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio llevado a cabo con un aislado de *C. parvum* demuestran que las altas temperaturas (por encima de 40 °C) estimulan el proceso de desenquistamiento espontáneo al obtener valores en torno a un 28% al final de los ensayos de 8 y 12 horas de exposición, porcentajes significativamente superiores al determinado inicialmente en el aislado empleado.

Además, el efecto de la temperatura podría justificar el descenso en la viabilidad ooquistica detectado en el control de exposición en oscuridad durante los ensayos realizados con botellas PET y bajo condiciones naturales, ante las altas temperaturas alcanzadas en el interior de las botellas expuestas en contacto con el tejado del laboratorio (máximo de 44,9 °C). De esta forma, no se observó una reducción en la viabilidad ooquistica en el correspondiente control de oscuridad cuando el ensayo se realizó a temperatura controlada.

Por otra parte y considerando los porcentajes de reducción de la viabilidad ooquística obtenidos durante la evaluación experimental del efecto térmico, junto con los correspondientes valores determinados en el estudio del componente óptico de la radiación solar, demuestran la existencia de un sinergismo entre ambos efectos. Así, los respectivos valores de reducción de la viabilidad ooquística obtenidos tras la exposición de agua en botellas PET fueron superiores al valor resultante de la suma de los valores obtenidos tras la evaluación independientemente de los efectos óptico y térmico. Aunque este sinergismo se observó a los tres tiempos de exposición ensayados para aguas de 0 UNF de turbidez, es más notorio en el ensayo de 4 horas de exposición, tanto para aguas claras como muy turbias.

Desde un punto de vista óptico, cuando las botellas PET se exponen al sol, tan sólo la parte superior recibe la radiación, por lo que una importante fracción de la misma no alcanza el agua a tratar, impidiéndose, por tanto, que los microorganismos sean irradiados. El diseño de los CPC garantiza que toda la superficie del reactor sea iluminada al concentrar tanto la radiación directa como la difusa, sin necesidad de su reorientación en función del movimiento del sol a lo largo del día. Así, se comprobó que el empleo de reactores solares equipados con CPC representa una excelente alternativa para mejorar la eficacia del método SODIS en la desinfección de agua de bebida contaminada con las formas infectantes de *C. parvum* ya que, no sólo permiten tratar mayores volúmenes de agua y reducir el tiempo de exposición, sino que también con alguno de los colectores ensayados se consiguió anular la viabilidad ooquística.

De esta forma, los resultados de viabilidad ooquística obtenidos en aguas con niveles de turbidez de 0 y 5 UNF contenidas en el reactor de metacrilato de 25 l de capacidad equipado con un CPC de $FC=1$ tras 8 horas de exposición, son similares a los hallados utilizando las botellas PET (24,1% vs 22,0% y 35,8% vs 36,7% para aguas de 0 y 5 UNF, respectivamente). Además, las viabilidades ooquísticas determinadas en las mismas condiciones fueron significativamente inferiores cuando se utilizaron reactores de vidrio borosilicatado de 2,5 l. Así, para el reactor equipado con el CPC1, la viabilidad ooquística tras 8 horas de exposición fue del 7,9% para aguas de 0 UNF y del 6,1% para aguas de 5 UNF. Cuando se utilizó el reactor equipado con el CPC1,89, estos valores se redujeron considerablemente siendo del 1,9 y 1,2%, respectivamente.

Kehoe y col. (2001) plantearon la posibilidad de que el volumen del reactor afectase a la eficacia del método SODIS al considerar que la penetración de la radiación puede variar con el diámetro del reactor utilizado y que los cambios de la temperatura están condicionados por el volumen de la columna de agua. Sin embargo, los autores no

comprobaron diferencias significativas en la dinámica de inactivación de *E. coli* al exponer volúmenes de 0,5 y 1,5 l de agua a la luz solar. En nuestro estudio, cuando analizamos los resultados obtenidos con el reactor de 25 l y los hallados utilizando reactores de 2,5 l, equipados ambos con un CPC de FC=1, sí observamos que el volumen expuesto a la radiación solar influye negativamente en la eficacia de la técnica. Así, tras 8 horas de exposición se obtuvieron porcentajes de viabilidad global de 21,8% vs 2,5% y 31,3% vs 1,9% para aguas de 0 y 5 UNF, respectivamente. De igual forma, cuando comparamos los resultados de viabilidad ooquística obtenidos tras 4 horas de exposición utilizando botellas PET y el reactor de 25 l de capacidad se detectaron porcentajes inferiores de viabilidad ooquística en aguas expuestas en las botellas (30,8% vs 82,4% y 46,1% vs 86,8% para aguas de 0 y 5 UNF, respectivamente), tendiendo éstos a igualarse tras 8 horas de exposición.

Por otra parte, la radiación UV-A que alcanza el sistema también está condicionada por la transmitancia del reactor y la reflectividad del espejo (Navntoft y col., 2008). Por lo que respecta a la transmitancia, los tubos de vidrio borosilicatado de 2,5 l evaluados transmiten entre el 89-90% de la radiación UV-A (región 320-400 nm), así como un 45% de la radiación UV-B (región 280-320 nm). Sin embargo, el reactor de 25 l, fabricado con metacrilato, es opaco a la luz UV-B y transmite un menor porcentaje de la radiación UV-A de forma similar al material del que están constituidas las botellas PET (Ubomba-Jaswa y col., 2010).

En cuanto a la reflectividad del espejo, ésta puede variar en función del material utilizado en su construcción, siendo en la mayoría de los casos superior al 80% (Rabl y col., 1979). Las láminas de aluminio anodizado de los CPC evaluados presentan una reflectividad del 87% para la radiación UV-A y del 90% para las regiones visible e infrarroja del espectro solar. La principal ventaja de estos sistemas es que reflejan la radiación UV-A (directa y difusa) que llega a la superficie terrestre incluso en días con nubosidad, por lo que la radiación solar puede alcanzar el agua y actuar sobre los microorganismos presentes (Navntoft y col., 2008). Debido a que el método SODIS se emplea bajo condiciones naturales, un problema que se plantea es el deterioro del material de la superficie reflectante. Navntoft y col. (2008) realizaron un estudio con el fin de evaluar la influencia que la degradación del espejo tiene sobre la eficacia de la técnica SODIS, utilizando para ello reactores de vidrio borosilicatado sobre colectores que habían sido empleados durante tres años consecutivos. Los autores comprobaron que tras el tiempo transcurrido no se detectaron descensos significativos en la reflectividad.

Durante la realización de los ensayos con los distintos tipos de colectores, también se monitorizó cada hora la temperatura registrada en el interior de los reactores. Al evaluar la eficacia de los reactores de 2,5 l de capacidad equipados con CPC de diferente FC, comprobamos un incremento en la temperatura del agua, que fue ligeramente superior en aguas turbias (100 UNF). Como se comentó anteriormente, la turbidez del agua es un reconocido factor limitante de la eficacia de la técnica SODIS al atenuar la penetración de la radiación UV-A (Joyce y col., 1996; Kehoe y col., 2001), habiéndose comprobado en el estudio realizado con botellas PET bajo condiciones de campo. Sin embargo, los resultados obtenidos con ambos sistemas de concentración de la radiación solar demuestran que la turbidez no influyó negativamente en la eficacia del proceso, al detectar valores de viabilidad próximos a cero, incluso en aguas con el mayor nivel de turbidez.

Teniendo en cuenta que esta tecnología está destinada a países sin recursos económicos y partiendo de la base de que el coste de las botellas PET es prácticamente nulo, en la construcción de estos sistemas se deberán considerar los siguientes aspectos: i) minimizar el coste de los materiales; ii) que presenten alta resistencia a las condiciones ambientales; y iii) que requieran un escaso mantenimiento. Según información aportada por el personal implicado en el diseño de estos colectores (Dra. Fernández Ibáñez de la PSA y Dr. Navntoft de la Comisión Nacional de Energía Atómica de Argentina), se estima que el coste de un prototipo de estos sistemas es del orden de 200 dólares USA y, asumiendo que la vida media del mismo es de unos 10 años, se calcula que un litro de agua tratada representa un gasto de 0,002 dólares USA. Esta tecnología implica una inversión superior a la que suponen el empleo de las botellas PET y los filtros de cerámica (<0,001 dólares USA/l). Sin embargo, tiene un coste similar a los filtros de arena y es más económico que el sistema de tratamiento mediante coagulación/cloración, el cual supone un gasto superior a 0,01 dólares USA/l (OMS, 2007; Sobsey y col., 2008; Ubomba-Jaswa y col., 2010).

Como se ha comentado a lo largo de este apartado, la temperatura es un factor abiótico clave que afecta a la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* en el ambiente (King y Monis, 2007). En una reciente revisión sobre los efectos de la temperatura en la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* presentes en el agua, en el suelo y en las heces, Peng y col. (2008) concluyen que la temperatura puede ser el factor abiótico más determinante para la supervivencia ooquistica en el ambiente. Los estudios incluidos en esta revisión se clasificaron en los que se ensayaron temperaturas de congelación, otros en los que la temperatura osciló entre 0 y 37 °C, y aquéllos en los que se utilizaron temperaturas superiores a 45 °C. Los tiempos de exposición variaron entre uno o varios minutos para temperaturas elevadas y semanas e incluso meses para temperaturas de congelación y ambientales. De esta forma, los resultados del estudio de resistencia de los ooquistes de *C. parvum* a temperaturas alcanzables durante los procesos de

desinfección solar del agua (37-50 °C) demostraron la fuerte influencia que este factor tiene en el fenómeno del desenquistamiento espontáneo y por lo tanto en la viabilidad e infectividad ooquisticas. Así, un alto porcentaje de ooquistes se desenquistaron en agua destilada expuesta durante diferentes periodos de tiempo a temperaturas comprendidas entre 40-48 °C, siendo más notable cuando la temperatura se mantuvo a 46 °C.

La aplicación de la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP demostró que cuando las suspensiones ooquisticas se expusieron a temperaturas superiores a 44 °C durante más de 4 horas, el porcentaje de ooquistes que incorporó dicho colorante aumentó a valores comprendidos entre un 25-50%, comparado con el 8,7% del aislado inicial. Los incrementos en la temperatura no sólo aumentan la permeabilidad de la pared ooquistica (Jenkins y col., 1997) sino que también pueden desnaturalizar proteínas esenciales para la supervivencia de *Cryptosporidium* y afectar al metabolismo energético de los ooquistes. Fayer y col. (1998) demostraron que la capacidad de los ooquistes para iniciar la infección está íntimamente relacionada con las reservas energéticas de carbohidratos en forma de amilopectina, la cual se consume en relación directa con los valores de temperatura ambiental. Los autores también concluyen que la amilopectina constituye la reserva energética necesaria para el desenquistamiento y la posterior invasión de la célula hospedadora por los esporozoítos, y que, cuando su contenido desciende por debajo de niveles críticos, los esporozoítos carecen de suficiente energía para iniciar la invasión celular (Vetterling y Doran, 1969). Por otra parte, King y col. (2005) establecieron una estrecha relación entre la infectividad ooquistica y la concentración del nucleótido adenosín trifosfato (ATP), demostrando que la inactivación del parásito a temperaturas elevadas está en función de una mayor actividad metabólica del ooquiste. Esta observación podría explicar el hecho de que los porcentajes de desenquistamiento espontáneo obtenidos a 50 °C fueran ligeramente inferiores o similares a los obtenidos a 37 °C. Sin embargo, el porcentaje de ooquistes que incorporaron el colorante IP después de 4 horas de exposición a 50 °C fue considerablemente mayor al observado a 37 °C (41,6% vs 10,4%). Además, a la temperatura máxima ensayada y al mayor tiempo de exposición evaluado (50 °C, 12 horas), se observó que los ooquistes estaban colapsados y adheridos entre sí formando acúmulos.

Por otra parte, Jenkins y col. (2003) demostraron que los ooquistes de *C. parvum* almacenados en agua a 15 °C durante 7 meses son capaces de infectar a ratones y cultivos celulares, incluso cuando la concentración de amilopectina es extremadamente baja. Así, en nuestro estudio se consiguió implantar la infección en el modelo murino lactante tras la exposición de los ooquistes a 48 °C durante 8 horas, aunque a intensidades de infección muy bajas. Sin embargo, la exposición durante 12 horas a esta temperatura anuló completamente la infectividad ooquistica.

La viabilidad global ooquistica disminuyó a medida que la temperatura y el tiempo de exposición aumentaron, alcanzándose el menor valor tras la exposición de los ooquistes a 46 °C durante 12 horas (24,7%). Este descenso se debió fundamentalmente al alto porcentaje de ooquistes desengquistados (53,8%), ya que la incorporación del colorante vital fluorogénico IP por los ooquistes intactos fue de un 46,5%. A temperaturas superiores a 46 °C se observó un ligero incremento en el número de ooquistes permeables al IP; sin embargo, los niveles de desengustamiento descendieron significativamente, posiblemente debido al daño causado por las altas temperaturas. No obstante, los resultados obtenidos en las infecciones experimentales demostraron una prevalencia del 19,4% en ratones inoculados con los ooquistes expuestos a 46 °C durante 12 horas, mientras que la infectividad se anuló a partir de los 48 °C. Estas diferencias entre los valores de viabilidad global e infectividad ooquisticas pueden ser consecuencia del carácter conservador del método de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP o de otros daños causados por las altas temperaturas y no detectados con la metodología aplicada.

Las propiedades fotocatalíticas que presenta el TiO₂ permiten su utilización en numerosas aplicaciones, siendo una de las principales la eliminación de componentes orgánicos contaminantes del agua. Recientemente, ha aumentado el interés de su empleo con fines de desinfección de superficies, aire y agua (Chong y col., 2010; Gamage y Zhang, 2010). Esta actividad desinfectante del TiO₂ ha sido comprobada frente a un amplio rango de virus bacteriófagos, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos unicelulares y filamentosos y protozoos. Sin embargo, ciertos estados de desarrollo de estos organismos, concretamente las endosporas bacterianas, las esporas fúngicas y los ooquistes/quistes de protozoos, son generalmente más resistentes que las formas vegetativas, posiblemente debido a un mayor grosor de la pared celular (Foster y col., 2011).

Diversos estudios realizados a escala de laboratorio demostraron la eficacia de la desinfección fotocatalítica frente a *Cryptosporidium*. Otaki y col. (2000) reportan la inactivación de los ooquistes al utilizar TiO₂ inmovilizado y aplicar radiaciones UV-A y UV-C, comprobando una inactivación ooquistica significativamente más rápida cuando se emplea la radiación UV-C y sugiriendo un mecanismo sinérgico de desinfección. Posteriormente, Curtis y col. (2002) describen una reducción del 26% en la viabilidad de *C. parvum* tras la exposición durante una hora a la radiación UV-A en el interior de un fotorreactor que contenía electrodos de Ti/TiO₂. Recientemente, diversos trabajos demuestran, no sólo el efecto sinérgico entre la radiación UV y el TiO₂, sino también la notable mejora que implica la presencia de hipoclorito sódico a muy bajas concentraciones (Ryu y col., 2008; Navalón y col., 2009). Además, Sunnotel y col. (2010) comprueban unos porcentajes de inactivación ooquistica del 73,7-78,4% tras 3 horas de exposición a la radiación UV-A en presencia de TiO₂ inmovilizado.

Bajo condiciones naturales de radiación solar y utilizando reactores de vidrio borosilicatado de 2 ml de capacidad conteniendo un soporte flexible de plástico sobre el que se inmovilizaron partículas de TiO_2 , Méndez-Hermida y col. (2007) comprobaron una mayor eficacia desinfectante frente a *C. parvum* en presencia de este fotocatalizador. Así, tras 8 y 16 horas de exposición a la radiación solar natural en días nublados, se comprobó que la viabilidad ooquistica se redujo desde un valor inicial del 98,3% al 37,7 y 11,7% vs 81,3 y 33,0% en presencia/ausencia del fotocatalizador, respectivamente. Los autores observaron la existencia de variaciones morfológicas en la pared ooquistica similares a las detectadas en estudios previos y responsables en algunos casos de un desenquistamiento espontáneo (McGuigan y col., 2006). Esta observación fue también confirmada por Sunnotel y col. (2010), quienes detectan mediante microscopía electrónica de barrido la rotura de la línea de sutura de la pared ooquistica y justifican así la existencia de ooquistes vacíos tras la exposición al tratamiento fotocatalítico. Además, Méndez-Hermida y col. (2007) sugieren que los daños experimentados en la pared ooquistica y revelados por un incremento en su permeabilidad pueden facilitar la penetración de productos con alto poder oxidante derivados de la exposición a la radiación UV.

En nuestro estudio, en el que se evaluó el uso del fotocatalizador TiO_2 en la desinfección solar de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum* mediante reactores solares equipados con un CPC1 en modo recirculante, se observó que tras el máximo tiempo de exposición (8 horas), los valores de potencial viabilidad ooquistica no presentaron diferencias estadísticamente significativas en presencia/ausencia del fotocatalizador ($52,7 \pm 3,5\%$ vs $56,8 \pm 5,9\%$). Además, tampoco se observaron diferencias cuando se valoró el fenómeno del desenquistamiento espontáneo y, consecuentemente, en los valores de viabilidad global calculados. Este resultado podría justificarse por la demostrada eficacia de los reactores equipados con CPC frente a *Cryptosporidium*, enmascarando tal vez el efecto de la desinfección fotocatalítica con TiO_2 observado por otros autores, ya que en los días en los que se realizaron los ensayos y, a pesar de presentar ciertos periodos de nubosidad, se registraron valores de radiación global muy elevados (995 W/m^2). Sin embargo, en estudios previos, cuando se emplearon los mismos reactores solares equipados con CPC pero sin el fotocatalizador, los valores de viabilidad global ooquistica obtenidos fueron inferiores. Este hecho puede ser debido a unas mejores condiciones atmosféricas que permitieron alcanzar no sólo valores elevados de radiación solar, sino también un incremento notable de la temperatura del agua en el interior de los reactores. También, no se debe obviar el hecho de que el agua sometida a la desinfección solar en estos últimos estudios se encontraba en modo estático, a diferencia de aquellos en los que se evaluó el empleo de TiO_2 , en los que la recirculación del agua disminuye el tiempo de permanencia de los ooquistes en la parte iluminada del sistema. Así, Rincón y

Pulgarin (2004) y Fernández y col. (2005) comprobaron que cuando se emplean reactores solares equipados con CPC en modo recirculante similares al utilizado en nuestro estudio, no se consigue una desinfección total al comprobar la existencia de un recrecimiento de *E. coli* K-12, hecho que atribuyen a la existencia de zonas de sombra en el sistema.

Otra estrategia planteada en estos últimos años con el fin de acelerar el proceso de desinfección solar del agua es la incorporación de ciertos aditivos fácilmente disponibles, económicos y, por supuesto, seguros, entre los que se encuentra el H_2O_2 . Todas las células vivas están expuestas a H_2O_2 intracelular como consecuencia de su propio metabolismo y cuya concentración se mantiene estable en función de su velocidad de producción, de su difusión en el espacio citosólico y/o matriz mitocondrial y por la eliminación por ciertos compuestos antioxidantes y enzimas específicas como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión S-transferasa (Entrala y col., 1997; Cadenas y Davies, 2000). La introducción de H_2O_2 exógeno supone un aporte extra de productos altamente oxidantes.

Se demostró que la administración de compuestos antioxidantes a animales experimentalmente infectados con *C. parvum* agrava la infección (Leicht y He, 1999; Gookin y col., 2005). Este hecho sugiere que la actividad antioxidante puede desempeñar un importante papel en la supervivencia intracelular y en la patogenicidad de *C. parvum* mediante la protección de la acción de las ROS generadas durante los procesos de inflamación. Sin embargo, son escasos los conocimientos relacionados con los mecanismos implicados en esta actividad.

Entrala y col. (1997) realizaron un amplio estudio sobre las enzimas antioxidantes presentes en los oocistos de *C. parvum*. Estos autores detectaron una actividad superóxido dismutasa termoestable que atribuyeron a la presencia de compuestos antioxidantes, como el manitol o el α -tocoferol. Además, observaron una actividad consecuente con la presencia de una enzima superóxido dismutasa dependiente de hierro. Esta actividad superóxido dismutasa fue inicialmente descrita por Ogunkolade y col. (1993) al observar ciertas bandas electroforéticas en geles de almidón y, recientemente, Kang y col. (2008) identificaron un gen mitocondrial que codifica una enzima superóxido dismutasa dependiente de hierro, caracterizando las propiedades bioquímicas de la proteína recombinante. Es probable que esta enzima mitocondrial desempeñe un papel primario en la supervivencia del parásito mediante la eliminación del exceso de radicales superóxido generados en la mitocondria. Aunque estos radicales no atraviesan la membrana celular, en el caso de que penetrase H_2O_2 exógeno, éste reaccionaría con el hierro u otros componentes celulares, generando un estrés oxidativo interno (Ohno y Gallin, 1985).

Por otra parte, Entrala y col. (1997) no observaron una actividad catalasa específica de una enzima. Sin embargo, detectaron en la fracción insoluble de un extracto obtenido a partir de ooquistes de *C. parvum* una actividad catalasa inespecífica termoestable en presencia de H_2O_2 , sugiriendo la existencia de procesos químicos de oxidación de sustratos endógenos por parte de H_2O_2 . A este respecto, es interesante mencionar que en un estudio previo, Entrala y col. (1995) observaron una alteración de las características de tinción de los ooquistes de *C. parvum* tras la exposición de los mismos a este oxidante. Además, y también en la fracción insoluble, se detectó un consumo de H_2O_2 dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) a niveles similares a los observados en otros protozoos parásitos en los que este sistema de destoxificación es más importante que la actividad específica de la enzima catalasa (Fairfield y col., 1988; Emtage y Bremner, 1993; Entrala y col., 1997).

Recientemente, Lee y col. (2011) detectaron un incremento en la expresión de la enzima tiorredoxin peroxidasa cuando los ooquistes de *C. parvum* se expusieron a dosis elevadas de radiación gamma. Las tiorredoxin peroxidases pertenecen a la superfamilia de las peroxirredoxinas, la cual contiene enzimas antioxidantes altamente conservadas e implicadas en la eliminación de peróxidos (McGonigle y col., 1998). La posterior caracterización de esta enzima reveló una mayor actividad antioxidante en *Cryptosporidium* con respecto a la que presenta en otros organismos parásitos (Joung y col., 2011).

Por lo que respecta al empleo de H_2O_2 en los procesos de desinfección solar del agua, Sichel y col. (2009), utilizando reactores solares de vidrio borosilicatado de 500 ml, comprobaron la inactivación de esporas de *F. solani* tras 2 horas de exposición a la radiación solar natural en presencia de H_2O_2 a una concentración de 500 mg/l, observando también un cierto efecto tras 5 horas en oscuridad. Recientemente, Polo-López y col. (2011) detectan, empleando los mismos reactores solares, este efecto fungicida a concentraciones inferiores de H_2O_2 (10 mg/l) tras 3 horas de exposición a la radiación solar.

En nuestro estudio, llevado a cabo bajo las mismas condiciones y utilizando una concentración de H_2O_2 de 500 mg/l, si bien detectamos una cierta acción del H_2O_2 sobre los ooquistes de *C. parvum* en ausencia de radiación, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad global ooquistica cuando se exponen a la radiación solar natural, a pesar de comprobar un descenso progresivo en la concentración de H_2O_2 . Sin embargo, se observó la existencia de numerosos ooquistes que no incorporaron el colorante vital fluorogénico IP pero mostraron importantes alteraciones morfológicas que cuestionaron su viabilidad.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos realizados bajo condiciones simuladas de radiación solar empleando reactores de vidrio borosilicatado de 25 ml demostraron una disminución significativa de la viabilidad global ooquistica tras 2,5 y 5 horas de exposición en presencia de H₂O₂. Este descenso se atribuye fundamentalmente al incremento del número de ooquistes que incorporaron el colorante vital fluorogénico IP, ya que los valores correspondientes al fenómeno de desenquistamiento espontáneo no mostraron notables diferencias con respecto a los del aislado de *C. parvum* utilizado.

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas durante los ensayos de campo, en el estudio llevado a cabo bajo condiciones simuladas de radiación solar se valoró el desenquistamiento inducido provocado por la acción de ciertos estímulos que simulan las condiciones del hospedador y que proporcionan valores de viabilidad ooquistica. De esta forma, pudimos comprobar un descenso significativo en el porcentaje de ooquistes desenquistados tras 2,5 horas en presencia de H₂O₂ y en oscuridad, ofreciendo valores muy similares a los obtenidos cuando los ooquistes se expusieron a la radiación solar simulada, tanto en presencia como en ausencia del oxidante.

La inhibición del desenquistamiento de *C. parvum* tras el tratamiento de los ooquistes con bajas concentraciones de H₂O₂ fue comprobada previamente por Kniel y col. (2003). Es conocido que ciertas proteasas están implicadas en los procesos de desenquistamiento y, al menos, en un primer paso de la invasión celular por parte del parásito. Así, durante la incubación de los ooquistes de *C. parvum* a 37 °C se observó un incremento en la concentración de proteasas de tipo cisteína y serina, por lo que se sospecha su intervención en la rotura de proteínas de la pared ooquistica y consecuentemente en el desenquistamiento (Forney y col., 1996a, 1996b). El aminoácido cisteína es altamente reactivo y susceptible a procesos de oxidación debido a su grupo sulfidrilo. El hecho de que el H₂O₂ oxide grupos sulfidrilo podría inhibir el desenquistamiento de *C. parvum* al afectar a proteasas de tipo cisteína previamente identificadas e implicadas en el desenquistamiento.

Kniel y col. (2004) comprobaron, utilizando una concentración igual a la empleada en el presente estudio y manteniendo la temperatura a 4 °C, una reducción de hasta el 22,2% en el porcentaje de desenquistamiento inducido al cabo de 2 horas. En nuestros ensayos tras un tiempo de exposición ligeramente superior (2,5 horas), los porcentajes de desenquistamiento inducido obtenidos fueron notablemente inferiores (5,8±0,8%). Esta diferencia puede ser debida a la temperatura mantenida durante la exposición a la radiación solar simulada (alrededor de 40 °C), temperatura que podría favorecer la formación de ROS al aumentar la velocidad de fotólisis del H₂O₂. Sin embargo, es sorprendente el hecho de que Kniel y col. (2004) no observen estados de desarrollo de *Cryptosporidium* en

monocapas de células HCT-8. Resultados más coherentes con el porcentaje de desenquistamiento inducido se obtuvieron en nuestro trabajo utilizando el modelo murino lactante. De esta manera, se comprobaron reducciones significativas tanto en la infectividad como en la intensidad de infección con respecto a los correspondientes valores obtenidos con el aislado control. Otros trabajos realizados a temperaturas que oscilaron ente 22-24 °C y empleando concentraciones de H₂O₂ muy superiores a la utilizada en nuestros estudios (6% vs 0,05%) demuestran la anulación de la infectividad ooquistica, tanto en monocapas celulares como en bioensayos en ratón, tras 4-13 minutos de incubación (Weir y col., 2002; Alum y col., 2011). Finalmente, en el presente trabajo la combinación de la radiación solar simulada y el H₂O₂ originó los menores valores de desenquistamiento inducido y anuló prácticamente la infectividad ooquistica tras 2,5 horas de exposición, demostrando una mejora del método SODIS al reducir notablemente el tiempo de exposición necesario para lograr la inactivación de los ooquistes de *C. parvum*.

CONCLUSIONES

Primera

La valoración conjunta, bajo condiciones simuladas de radiación solar y temperatura controlada, de los efectos de la turbidez del agua, la intensidad de radiación y el tiempo de exposición sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* durante los procesos de desinfección solar del agua de bebida demostró, en el intervalo de valores considerados, que la intensidad de radiación, el tiempo de exposición y su interacción son factores limitantes de la misma, siendo necesarias intensidades de radiación iguales o superiores a 600 W/m² para disminuir significativamente la infectividad ooquistica.

Segunda

La aplicación del método SODIS a aguas turbias contaminadas experimentalmente con ooquistes de *C. parvum* contenidas en botellas PET disminuyó significativamente la supervivencia de este enteropatógeno de referencia, por lo que su empleo puede reducir la difusión hídrica de la cryptosporidiosis y de otras protozoosis intestinales en aquellas zonas geográficas que presenten las condiciones ambientales requeridas para su utilización.

Tercera

Independientemente de la radiación solar, la temperatura desempeña un importante papel en la inactivación de los ooquistes de *C. parvum* durante la aplicación del método SODIS al inducir un desenquistamiento espontáneo y afectar consecuentemente a la supervivencia ooquistica. Por tanto, se aconseja que cuando en estudios de campo se utilicen técnicas de desenquistamiento inducido para evaluar la viabilidad ooquistica, se valore previamente este fenómeno que puede desencadenarse cuando la temperatura del agua supera los 37 °C.

Cuarta

El empleo de reactores solares equipados con CPC en la desinfección de aguas contaminadas con ooquistes de *C. parvum* mejora significativamente la eficacia del método SODIS, ya que no solo ofrece la posibilidad de tratar un mayor volumen de agua y reducir el tiempo de exposición, sino que, en algunos casos, minimiza el efecto negativo de la turbidez. Por tanto, esta tecnología representa una alternativa para mejorar la calidad microbiológica del agua de bebida a nivel domiciliario en países en vías de desarrollo. Además, la inversión económica requerida se encuentra entre los márgenes de coste establecidos para otros métodos aconsejados por la OMS.

Quinta

La exposición de los ooquistes de *C. parvum* durante diferentes periodos de tiempo a temperaturas alcanzables en los procesos de desinfección solar del agua demuestra la elevada resistencia que presenta este enteropatógeno de transmisión hídrica, ya que son necesarios valores de temperatura superiores a 46 °C para anular la infectividad ooquistica.

Sexta

A pesar de los elevados valores de desenquistamiento espontáneo y de las alteraciones observadas en la integridad de la pared y morfología ooquisticas tras la exposición de las formas infectantes de *C. parvum* a temperaturas alcanzables durante los procesos de desinfección solar del agua, se comprobó la existencia de un reducido número de formas parasitarias con capacidad para implantar la infección en el modelo murino lactante, evidenciándose por tanto la baja dosis infectante de este enteropatógeno hídrico.

Séptima

La desinfección fotocatalítica utilizando TiO₂ inmovilizado y empleando reactores solares equipados con CPC en modo recirculante no ofreció mejoras significativas con respecto a los correspondientes controles, cuya eficacia también fue inferior a la obtenida con los mismos reactores en modo estático. Este hecho puede ser debido a que la recirculación del agua conlleva un descenso del tiempo de permanencia de los ooquistes de *C. parvum* en la parte iluminada del sistema y a que, tal vez, la demostrada efectividad de los CPC enmascare la propia acción del fotocatalizador.

Octava

La aplicación de técnicas de desenquistamiento inducido e infectividad permitió comprobar la mejora que supone la incorporación del H₂O₂ en los procesos de desinfección solar del agua de bebida, al reducir el tiempo de exposición necesario para inactivar las formas infectantes de *C. parvum*. De esta forma, se demostró que los ooquistes que presentaron alteraciones morfológicas importantes observadas bajo condiciones de campo eran inviables a pesar de no incorporar el colorante vital fluorogénico IP.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Alrub, S.M.; Abusada, G.M.; Farraj, M.A. y Essawi, T.A. 2008. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in children with diarrhoea in the West Bank, Palestine. *Journal of Infection in Developing Countries*, **2**: 59-62.

Acra, A.; Raffoul, Z. y Karahagopian, Y. 1984. Solar disinfection of drinking water and oral rehydration solutions- Guidelines for household application in developing countries. <http://almashriq.hiof.no/lebanon/600/610/614/solar-water/unesco/>. Accedido 16 de noviembre de 2011.

Acra, A.; Jurdi, M.; Mu´allem, H.; Karahagopian, Y. y Raffoul, Z. 1990. Water disinfection by solar radiation, assessment and application. <http://almashriq.hiof.no/lebanon/600/610/614/solar-water/idrc/>. Accedido 16 de noviembre de 2011.

Adam, A.A.; Hassan, H.S.; Shears, P. y Elshibly, E. 1994. *Cryptosporidium* in Khartoum, Sudan. *East African Medical Journal*, **71**: 745-746.

Adán Delgado, M.C., 2008. Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO₂ y Fe-TiO₂ para la degradación de compuestos aromáticos en medio acuoso empleando luz solar. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 245 pp.

Adegbola, R.A.; Demba, E.; De Veer, G. y Todd, J. 1994. *Cryptosporidium* infection in Gambian children less than 5 years of age. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **97**: 103-107.

Adjei, A.; Lartey, M.; Adiku, T.K.; Rodrigues, O.; Renner, L.; Sifah, E.; Mensah, J.D.; Akanmori, B.; Otchere, J.; Bentum, B.K. y Bosompem, K.M. 2003. *Cryptosporidium* oocysts in Ghanaian AIDS patients with diarrhoea. *East African Medical Journal*, **80**: 369-372.

Adjei, A.A.; Armah, H.; Rodrigues, O.; Renner, L.; Borketey, P.; Ayeh-Kumi, P.; Adiku, T.; Sifah, E. y Lartey, M. 2004. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **57**: 216-219.

Ajjampur, S.S.; Liakath, F.B.; Kannan, A.; Rajendran, P.; Sarkar, R.; Moses, P.D.; Simon, A.; Agarwal, I.; Mathew, A.; O'Connor, R.; Ward, H. y Kang, G. 2010. Multisite study of cryptosporidiosis in children with diarrhea in India. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2075-2081.

Alum, A.; Rubino, J.R. y Khalid Ijaz, M. 2011. Comparison of molecular markers for determining the viability and infectivity of *Cryptosporidium* oocysts and validation of molecular methods against animal infectivity assay. *International Journal of Infectious Diseases*, **15**: e197-e200.

Álvarez-Pellitero, P. y Sitjà-Bobadilla, A. 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1007-1021.

Álvarez-Pellitero, P.; Quiroga, M.I.; Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Palenzuela, O.; Padrós, F.; Vázquez, S. y Nieto, J.M. 2004. *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**: 133-145.

Alyousefi, N.A.; Mahdy, M.A.; Mahmud, R. y Lim, Y.A. 2011. Factors associated with high prevalence of intestinal protozoan infections among patients in Sana'a City, Yemen. *PLoS One*, **6**: e22044, 7 pp.

Amadi, B.; Kelly, P.; Mwiya, M.; Mulwazi, E.; Sianongo, S.; Changwe, F.; Thomson, M.; Hachungula, J.; Watuka, A.; Walker-Smith, J. y Chintu, C. 2001. Intestinal and systemic infection, HIV, and mortality in Zambian children with persistent diarrhea and malnutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **32**: 550-554.

Amar, C.F.L. 2003. Development of molecular methods for the detection and characterization of human gastrointestinal pathogens from smears fixed on glass microscope slide. Tesis Doctoral. Universidad de Greenwich. 261 pp.

Anathaswamy, H.N. y Eisenstark, A. 1977. Near-UV-induced breaks in phage AND sensitization by hydrogen peroxide (a tryptophan photoproduct). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **24**: 439-442.

Anathaswamy, H.N.; Hartman, P.S. y Eisenstark, A. 1979. Synergistic lethality of phage T7 by near-UV radiation and hydrogen peroxide: an action spectrum. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **29**: 53-56.

Antonios, S.N.; Tolba, O.A.; Othman, A.A. y Saad, M.A. 2010. A preliminary study on the prevalence of parasitic infections in immunocompromised children. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **40**: 617-630.

Areeshi, M.; Dove, W.; Papaventsis, D.; Gatei, W.; Combe, P.; Grosjean, P.; Leatherbarrow, H. y Hart, C.A. 2008. *Cryptosporidium* species causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **102**: 309-315.

Ashbolt, N.J. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, **198**: 229-238.

Ayalew, D.; Boelee, E.; Endeshaw, T. y Petros, B. 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* infection and drinking water sources among children in Lege Dini, Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health*, **13**: 472-475.

Aye, T.; Moe, K.; Nyein, M.M. y Swe, T. 1994. Cryptosporidiosis in Myanmar infants with acute diarrhea. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**: 654-656.

Baker, M.N. 1948. The quest for pure water: the history of water purification from the earliest records to the twentieth century. American Water Works Association, Denver, 527 pp.

Baumgartner, J.; Murcott, S. y Ezzati, M. 2007. Reconsidering "appropriate technology": the effects of operating conditions on the bacterial removal performance of two household drinking-water filter systems. *Environmental Research Letters*, **2**: 024003, 6 pp..

Berlett, B.S. y Stadtmann, E.R. 1997. Minireview: protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 20313-20316.

Bielefeldt, A.R.; Kowalski, K. y Summers, R.S. 2009. Bacterial treatment effectiveness of point-of-use ceramic water filters. *Water Research*, **43**: 3559-3565.

Bielefeldt, A.R.; Kowalski, K.; Schilling, C.; Schreier, S.; Kohler, A. y Scott Summers, R. 2010. Removal of virus to protozoan sized particles in point-of-use ceramic water filters. *Water Research*, **44**: 1482-1488.

Bhutta, Z.A. 2009. Solar water disinfection in household settings: hype or hope? *PLOS Medicine*, **6**: e1000127, 2 pp.

Blake, D.M.; Magrini, K.; Wolfrum, E. y May, E.K. 1997. Material issues in solar detoxification of air and water. *En: Optical materials technology for energy efficiency and solar energy conversion XV.* Lampert, C.M.; Granqvist, C.G.; Gratzel, M. y Deb, S.K. (Eds.). The International Society for Optical Engineering, Bellingham, Washington, pp: 154-162.

Blanco Gálvez, J. 2002. Desarrollo de colectores solares CPC para aplicaciones fotoquímicas de degradación de contaminantes persistentes en agua. CIEMAT, Madrid, 277 pp.

Blanco, J.; Malato, S.; Fernández, P.; Vidal, A.; Morales, A.; Trincado, P.; Oliveira, J.C.; Minero, C.; Musci, M.; Casalle, C.; Brunotte, M.; Tratzky, S.; Dischinger, N.; Funken, K.H.; Sattler, C.; Vincent, M; Mendes, J.F. y Rangel, C.M. 2000. Compound parabolic concentrator technology development to commercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, **67**: 317.

Blanco, M.A.; Iborra, A.; Vargas, A.; Nsie, E.; Mba, L. y Fuentes, I. 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Equatorial Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**: 1282-1284.

Blanshard, C.; Jackson, A.M.; Shanson, D.C.; Francis, N. y Gazzard, B.G. 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Quarterly Journal of Medicine*, **85**: 813-823.

Block, S.S. 2001. Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1481 pp.

Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 252) de 21 de octubre de 2005. Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E. y van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 495-503.

Box, G.E.P.; Hunter, W.G. y Hunter, J.S. 1978. Statistics for experimenters. John Wiley & Sons, Inc., New York, 653 pp.

Boyle, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P.; Arias-Quiroz, G.B.; Iriarte-Puña, M.; Mercado, A.; Ubomba-Jaswa, E. y McGuigan, K.G. 2008. Bacterial effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 2997-3001.

Brannan, D.K.; Greenfield, R.A.; Owen, W.L.; Welch, D.F. y Kuhls, T.L. 1996. Protozoal colonization of the intestinal tract in institutionalized Romanian children. *Clinical Infectious Diseases*, **22**: 456-461.

Brock, T.; Madigan, T.; Martinko, J. y Parker, J. 2000. Biology of microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 991 pp.

Brown, J. y Sobsey, M.D. 2010. Microbiological effectiveness of locally produced ceramic filters for drinking water treatment in Cambodia. *Journal of Water and Health*, **8**: 1-10.

Brown, J.; Sobsey, M.D. y Loomis, D. 2008. Local drinking water filters reduce diarrheal disease in Cambodia: a randomized, controlled trial of the ceramic water purifier. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 394-400.

Buzunis, B.J. 1995. Intermittently operated slow sand filtration: a new water treatment process. Tesis de Máster. Universidad de Calgary. 220 pp.

Cadenas, E. y Davies, K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**: 222-230.

Cama, V.A.; Bern, C.; Roberts, J.; Cabrera, L.; Sterling, C.R.; Ortega, Y.; Gilman, R.H. y Xiao, L. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1567-1574.

Campbell, A.T.; Robertson, L.J. y Smith, S.H. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3488-3493.

Cárcamo, C.; Hooton, T.; Wener, M.H.; Weiss, N.S.; Gilman, R.; Arévalo, J.; Carrasco, J.; Seas, C.; Caballero, M. y Holmes, K.K. 2005. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, **191**: 11-19.

Casemore, D.P.; Wright, S.E. y Coop, R.L. 1997. Cryptosporidiosis - Human and animal epidemiology. En: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 65-92.

Castro Hermida, J.A. 2002. Cryptosporidiosis animal: prevalencia, factores de riesgo y tratamiento con β -ciclodextrina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 190 pp.

Centre for Affordable Water and Sanitation Technology (CAWST). 2010. Biosand filter manual: design, construction, installation, operation, and maintenance. CAWST, Calgary, 59 pp.

Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C. y White, A.C. 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis, and host-parasite relationship. En: *Cryptosporidium: from molecules to disease*. R.C.A. Thompson, A. Armsory U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 19-49.

Cheng, Y.W.; Chan, R.C.Y. y Wong, P.K. 2007. Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. *Water Research*, **41**: 842-852.

Chhin, S.; Harwell, J.I.; Bell, J.D.; Rozycki, G.; Ellman, T.; Barnett, J.M.; Ward, H.; Reinert, S.E. y Pugatch, D. 2006. Etiology of chronic diarrhea in antiretroviral-naive patients with HIV infection admitted to Norodom Sihanouk Hospital, Phnom Penh, Cambodia. *Clinical Infectious Diseases*, **43**: 925-932.

Chiller, T.M.; Mendoza, C.E.; Lopez, M.B.; Alvarez, M.; Hoekstra, R.M.; Keswick, B.H. y Luby, S.P. 2006. Reducing diarrhoea in Guatemalan children: randomized controlled trial of flocculant-disinfectant for drinking-water. *Bulletin of the World Health Organization*, **84**: 28-35.

Chong, M.N.; Jin, B.; Chow, C.W. y Saint, C. 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Research*, **44**: 2997-3027.

Clasen, T.F. 2009. Scaling up household water treatment among low-income populations. OMS, Ginebra, 72 pp.

Clasen, T. y Edmondson, P. 2006. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **209**: 173-181.

Clasen, T.F.; Brown, J.; Collin, S.; Suntura, O. y Cairncross, S. 2004. Reducing diarrhea through the use of household-based ceramic water filters: a randomized, controlled trial in rural Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**: 651-657.

Clasen, T.; García Parra, G.; Boisson, S. y Collin, S. 2005. Household-based ceramic water filters for the prevention of diarrhea: a randomized, controlled trial of a pilot program in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**: 790-795.

Clasen, T.F.; Brown, J. y Collin, S.M. 2006. Preventing diarrhoea with household ceramic water filters: assessment of a pilot project in Bolivia. *International Journal of Environmental Health Research*, **16**: 231-239.

Clasen, T.; Saeed, T.F.; Boisson, S.; Edmondson, P. y Shipin, O. 2007. Household water treatment using sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets: a randomized, controlled trial to assess microbiological effectiveness in Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**: 187-192.

Collares-Pereira, M.; Chaves, J. y Correia de Oliveira, J. 2006. CPC type collectors for solar energy collection in absorbers immersed in a liquid of index of refraction n. Portuguese patent, ref. 103182. *Boletim da Propiedade Industrial*, **2**: 474-486.

Conroy, R.M.; Elmore-Meegan, M.; Joyce, T.; McGuigan, K.G. y Barnes, J. 1996. Solar disinfection of drinking water and diarrhoea in Maasai children: a controlled field trial. *Lancet*, **348**: 1695-1697.

Conroy, R.M.; Meegan, M.E.; Joyce, T.; McGuigan, K. y Barnes, J. 1999. Solar disinfection of water reduces diarrhoeal disease: an update. *Archives of Disease in Childhood*, **81**: 337-338.

Conroy, R.M.; Meegan, M.E.; Joyce, T.; McGuigan, K. y Barnes, J. 2001. Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age. *Archives of Disease in Childhood*, **85**: 293-295.

Cox, M.J.; Elwin, K.; Massad, E. y Azevedo, R.S. 2005. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. *Epidemiology and Infection*, **133**: 951-956.

Cross, J.H.; Alcántara, A.; Alquiza, L.; Zaraspe, G. y Ranoa, C. 1985. Cryptosporidiosis in Philippine children. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **16**: 257-260.

Crump, J.A.; Okoth, G.O.; Slutsker, L.; Ogaja, D.O.; Keswick, B.H. y Luby, S.P. 2004. Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation-disinfection on drinking water quality in western Kenya. *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 225-231.

Crump, J.A.; Otieno, P.O.; Slutsker, L.; Keswick, B.H.; Rosen, D.H.; Hoekstra, R.M.; Vulule, J.M. y Luby, S.P. 2005. Household based treatment of drinking water with flocculant-disinfectant for preventing diarrhoea in areas with turbid source water in rural western Kenya: cluster randomised controlled trial. *British Medical Journal*, **331**: 478.

Current, W.L. y García, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**: 325-358.

Current, W.L.; Upton, S.J. y Haynes, T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, **33**: 289-296.

Curtis, T.P.; Walker, G.; Dowling, B.M. y Christensen, P.A. 2002. Fate of *Cryptosporidium* oocysts in an immobilised titanium dioxide reactor with electric field enhancement. *Water Research*, **36**: 2410-2413.

D'Antonio, R.G.; Winn, R.E.; Taylor, J.P.; Gustafson, T.L.; Current, W.L.; Rhodes, M.M.; Gary, G.W. Jr. y Zajac, R.A. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, **103**: 886-888.

Davis, J. y Lambert, R. 2002. Engineering in emergencies. Practical Action Publishing, Londres, 738 pp.

de Silva, N.R.; de Silva, H.J. y Jayapani, V.P. 1994. Intestinal parasitoses in the Kandy area, Sri Lanka. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**: 469-473.

Departamento del Agua y Saneamiento en Países en Vías de Desarrollo (SANDEC). 2011. Water and sanitation in developing countries. <http://www.sandec.ch/>. Accedido: 15 de noviembre de 2011.

Dillingham, R.A.; Lima, A.A. y Guerrant, R.L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, **4**: 1059-1066.

Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M. y Rodríguez, H. 2002. Serial review: oxidative DNA damage and repair. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**: 1102-1115.

Dlamini, M.S.; Nkambule, S.J. y Grimason, A.M. 2005. First report of cryptosporidiosis in paediatric patients in Swaziland. *International Journal of Environmental Health Research*, **15**: 393-396.

Doocy, S. y Burnham, G. 2006. Point-of-use water treatment and diarrhoea reduction in the emergency context: an effectiveness trial in Liberia. *Tropical Medicine and International Health*, **11**: 1542-1552.

Dowd, S.E. y Pillai, S.D. 1997. A rapid viability assay for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts for use in conjunction with indirect fluorescent antibody detection. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**: 658-662.

Downes, A. y Blunt, T.P. 1877. Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **28**: 488-500.

du Preez, M.; Conroy, R.M.; Wright, J.A.; Moyo, S.; Potgieter, N. y Gundry, S.W. 2008. Use of ceramic water filtration in the prevention of diarrheal disease: a randomized controlled trial in rural South Africa and Zimbabwe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 696-701.

du Preez, M.; McGuigan, K.G. y Conroy, R.M. 2010. Solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in South African children aged under 5 years: the role of participant motivation. *Environmental Science and Technology*, **44**: 8744-8749.

du Preez, M.; Conroy, R.M.; Ligondo, S.; Hennessy, J.; Elmore-Meegan, M.; Soita, A. y McGuigan, K.G. 2011. Randomized intervention study of solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years. *Environmental Science and Technology*, **45**: 9315-9323.

Duong, T.H.; Duffillot, D.; Koko, J.; Nze-Eyo'o, R.; Thuilliez, V.; Richard-Lenoble, D. y Kombila, M. 1995. Digestive cryptosporidiosis in young children in an urban area in Gabon. *Santé*, **5**: 185-188.

Elliott, M.A.; Stauber, C.E.; Koksal, F.; DiGiano, F.A. y Sobsey, M.D. 2008. Reductions of *E. coli*, echovirus type 12 and bacteriophages in an intermittently operated household-scale slow sand filter. *Water Research*, **42**: 2662-2670.

Emtage, M.A. y Bremner, T.A. 1993. Thermal regulation of active oxygen-scavenging enzymes in *Crithidia luciliae thermophila*. *Journal of Parasitology*, **79**: 809-814.

Entrala, E.; Rueda-Rubio, M.; Janssen, D. y Mascaró, C. 1995. Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *International Journal for Parasitology*, **25**: 1473-1477.

Entrala, E.; Mascaró, C. y Barrett, J. 1997. Anti-oxidant enzymes in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology*, **114**: 13-17.

Essid, R.; Mousli, M.; Aoun, K.; Abdelmalek, R.; Mellouli, F.; Kanoun, F.; Derouin, F. y Bouratbine, A. 2008. Identification of *Cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 702-705.

Esteban, J.G.; Aguirre, C.; Flores, A.; Strauss, W.; Angles, R. y Mas-Coma, S. 1998. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 50-55.

Fairfield, A.S.; Abosch, A.; Ranz, A.; Eaton, J.W. y Meshnick, S.R. 1988. Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **30**: 77-82.

Fayer, R. y Santín, M. 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **164**: 192-200.

Fayer, R.; Trout, J.M. y Jenkins, M.C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, **84**: 1165-1169.

Fayer, R.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Morgan, U.M.; Lai, A.A. y Dubey, J.P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, **87**: 1415-1422.

Fayer, R.; Santín, M. y Xiao, L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, **91**: 624-629.

Fayer, R.; Santín, M. y Trout, J.M. 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, **156**: 191-198.

Fayer, R.; Santín, M. y Macarasin, D. 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, **172**: 23-32.

Fernández, P.; Blanco, J.; Sichel, C. y Malato, S. 2005. Water disinfection by solar photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catalysis Today*, **101**: 345-352.

Fernández Ibáñez, P. 2003. Propiedades coloidales de partículas de TiO₂: aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 335 pp.

Forney, J.R.; Yang, S.; Du, C. y Healey, M.C. 1996a. Efficacy of serine protease inhibitors against *Cryptosporidium parvum* infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system. *Journal of Parasitology*, **82**: 638-640.

Forney, J.R.; Yang, S. y Healey, M.C. 1996b. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, **82**: 889-892.

Foster, H.A.; Ditta, I.B.; Varghese, S. y Steele, A. 2011. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**: 1847-1868.

Freites, A.; Colmenares, D.; Pérez, M.; García, M. y Díaz de Suárez, O. 2009. *Cryptosporidium* sp. infections and other intestinal parasites in food handlers from Zulia state, Venezuela. *Investigación Clínica*, **50**: 13-21.

Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Siede, W.; Wood, R.D.; Schultz, R.A. y Ellenburger, T. 2006. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, 1118 pp.

Fundación Sodis. 2011. <http://sitio.fundacionsodis.org/>. Accedido: 16 de noviembre de 2011.

Gaafar, M.R. 2007. Effect of solar disinfection on viability of intestinal protozoa in drinking water. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **37**: 65-86.

Gamage, J. y Zhang, Z. 2010. Applications of photocatalytic disinfection. *International Journal of Photoenergy*, **2010**: ID 764870, 11 pp.

Gassama, A.; Sow, P.S.; Fall, F.; Camara, P.; Gueye-N'diaye, A.; Seng, R.; Samb, B.; M'Boup, S. y Aidara-Kane, A. 2001. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *International Journal of Infectious Diseases*, **5**: 192-198.

Gatei, W.; Wamae, C.N.; Mbae, C.; Waruru, A.; Mulinge, E.; Waithera, T.; Gatika, S.M.; Kamwati, S.K.; Revathi, G. y Hart, C.A. 2006. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 78-82.

Gatell, J.M.; Clotet, B. y Podzamozzer, D. 1996. Historia natural y clasificación de la infección por VIH-1. En: Guía Práctica del SIDA. Masson S.A., Barcelona, 26 pp.

Gay-Andrieu, E.; Adehossi, E.; Illa, H.; Garba Ben, A.; Kourna, H. y Boureima, H. 2007. Prevalence of cryptosporidiosis in pediatric hospital patients in Niamey, Niger. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **100**: 193-196.

Gbakima, A.A.; Konteh, R.; Kallon, M.; Mansaray, H.; Sahr, F.; Bah, Z.J.; Spencer, A. y Luckay, A. 2007. Intestinal protozoa and intestinal helminthic infections in displacement camps in Sierra Leone. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, **36**: 1-9.

Getaneh, A.; Medhin, G. y Shimelis, T. 2010. *Cryptosporidium* and *Strongyloides stercoralis* infections among people with and without HIV infection and efficiency of diagnostic methods for *Strongyloides* in Yirgalem Hospital, southern Ethiopia. *BMC Research Notes*, **3**: 90.

Gogate, P.R. y Pandit, A.B. 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, **8**: 501-551.

Gookin, J.L.; Allen, J.; Chiang, S.; Duckett, L. y Armstrong, M.U. 2005. Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **73**: 3929-3936.

Goupy, J. 1988. La méthode des plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des resultants. Dunot, Paris, 303 pp.

Graf, J.; Zebaze Togouet, S.; Kemka, N.; Niyitegeka, D.; Meierhofer, R. y Gangoue Pieboji, J. 2010. Health gains from solar water disinfection (SODIS): evaluation of a water quality intervention in Yaounde, Cameroon. *Journal of Water and Health*, **8**: 779-796.

Haque, R.; Mondal, D.; Karim, A.; Molla, I.H.; Rahim, A.; Faruque, A.S.; Ahmad, N.; Kirkpatrick, B.D.; Houpt, E.; Snider, C. y Petri, W.A. 2009. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases*, **48**: 1191-1197.

Hartman, P.S. y Eisenstark, A. 1980. Killing of *Escherichia coli* K12 by near-ultraviolet radiation in the presence of hydrogen peroxide: role of double-strand DNA breaks in absence of recombinational repair. *Mutation Research*, **72**: 31-42.

Heaselgrave, W. y Kilvington, S. 2011. The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against *Ascaris*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Entamoeba* and *Cryptosporidium*. *Acta Tropica*, **119**: 138-143.

Heaselgrave, W.; Patel, N.; Kilvington, S.; Kehoe, S.C. y McGuigan, K.G. 2006. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water- a laboratory study using simulated sunlight. *Letters in Applied Microbiology*, **43**: 125-130.

Heine, J. 1982. An easy technique for the demonstration of Cryptosporidia in faeces. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, **29**: 324-327.

Herrera Melián, J.A.; Dona Rodríguez, J.M.; Viera Suárez, A.; Tello Rendón, E.; Valdés do Campo, C.; Arana, J. y Pérez Pena, J. 2000. The photocatalytic disinfection of urban waste waters. *Chemosphere*, **41**: 323-327.

Hijnen, W.A.; Schijven, J.F.; Bonne, P.; Visser, A. y Medema, G.J. 2004. Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. *Water Science and Technology*, **50**: 147-154.

Hobbins, M. 2003. The SODIS health impact study (Summary report). Instituto Tropical y de Salud Pública Suizo, Basilea, 11 pp.

Hojlyng, N.; Molbak, K. y Jepsen, S. 1986. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Liberian children. *Journal of Clinical Microbiology*, **23**: 1109-1113.

Howard, P.; Alexander, N.D.; Atkinson, A.; Clegg, A.O.; Gerega, G.; Javati, A.; Kajoi, M.; Lupiwa, S.; Lupiwa, T.; Mens, M.; Saleu, G.; Sanders, R.C.; West, B. y Alpers, M.P. 2000. Bacterial, viral and parasitic aetiology of paediatric diarrhoea in the highlands of Papua New Guinea. *Journal of Tropical Pediatrics*, **46**: 10-14.

Huh, S.; Yu, J.R.; Kim, J.I.; Gotov, C.; Janchiv, R. y Seo, J.S. 2006. Intestinal protozoan infections and echinococcosis in the inhabitants of Dornod and Selenge, Mongolia (2003). *Korean Journal of Parasitology*, **44**: 171-174.

Hunter, P.R. y Nichols, G. 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 145-154.

Idris, N.S.; Dwipoerwantoro, P.G.; Kurniawan, A. y Said, M. 2010. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *Journal of Infection in Developing Countries*, **4**: 309-317.

Instituto Federal Suizo de la Ciencia y Tecnología del Agua (EAWAG). 2011. SODIS Method. http://www.sodis.ch/methode/index_EN. Accedido: 16 de noviembre de 2011.

Ireland, J.C.; Klostermann, P.; Rice, E.W. y Clark, R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 1668-1670.

Iseki, M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, **28**: 285-307.

Jacobsen, K.H.; Ribeiro, P.S.; Quist, B.K. y Rydbeck, B.V. 2007. Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *Journal of Health, Population and Nutrition*, **25**: 399-405.

Jain, S.; Sahanoon, O.K.; Blanton, E.; Schmitz, A.; Wannemuehler, K.A.; Hoekstra, R.M. y Quick, R.E. 2010. Sodium dichloroisocyanurate tablets for routine treatment of household drinking water in periurban Ghana: a randomized controlled trial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 16-22.

Jenkins, M.B.; Anguish, L.J.; Bowman, D.D.; Walker, M.J. y Ghiorse, W.C. 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3844-3850.

Jenkins, M.; Trout, J.M.; Higgins, J.; Dorsch, M.; Veal, D. y Fayer, R. 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research*, **89**: 1-5.

Jirků, M.; Valigurová, A.; Koudela, B.; Krížek, J.; Modrý, D. y Slapeta, J. 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, **55**: 81-94.

Joung, M.; Yoon, S.; Choi, K.; Kim, J.Y.; Park, W.Y. y Yu, J.R. 2011. Characterization of the thioredoxin peroxidase from *Cryptosporidium parvum*. *Experimental Parasitology*, **129**: 331-336.

Joyce, T.M.; McGuigan, K.G.; Elmore-Meegan, M. y Conroy, R.M. 1996. Inactivation of fecal bacteria in drinking water by solar heating. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 399-402.

Kadende, P.; Nkurunziza, T.; Floch, J.J.; Mpfi, B.; Laroche, R.; Ndabaneze, E. y Aubry, P. 1989. Infectious diarrhea in African acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Apropos of 100 patients studied in Bujumbura (Burundi). *Médecine Tropicale*, **49**: 129-133.

Kaminsky, R.G. 1991. Parasitism and diarrhoea in children from two rural communities and marginal barrio in Honduras. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 70-73.

Kang, J.M.; Cheun, H.I.; Kim, J.; Moon, S.U.; Park, S.J.; Kim, T.S.; Sohn, W.M. y Na, B.K. 2008. Identification and characterization of a mitochondrial iron-superoxide dismutase of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*, **103**: 787-795.

Kassi, R.R.; Kouassi, R.A.; Yavo, W.; Barro-Kiki, C.P.; Bamba, A.; Menan, H.I. y Kone, M. 2004. Cryptosporidiosis and isosporiasis in children suffering from diarrhoea in Abidjan. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **97**: 280-282.

Kehoe, S.C.; Joyce, T.M.; Ibrahim, P.; Gillespie, J.B.; Shahar, R.A. y McGuigan, K.G. 2001. Effect of agitation, turbidity, aluminium foil reflectors and container volume on the inactivation efficiency of batch-process solar disinfectors. *Water Research*, **35**: 1061-1065.

Kehoe, S.C.; Barer, M.R.; Devlin, L.O. y McGuigan, K.G. 2004. Batch process solar disinfection is an efficient means of disinfecting drinking water contaminated with *Shigella dysenteriae* type I. *Letters in Applied Microbiology*, **38**: 410-414.

Kfir, R.; Bateman, B.W.; Pitout, B.A. y Coubrough, P. 1989. Disinfection of polluted water by chlorine-flocculant tablet. *Water Science and Technology*, **21**: 207-213.

Kilani, R.T. y Sekla, L. 1987. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36**: 505-508.

King, B.J. y Monis, P.T. 2007. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, **134**: 309-323.

King, B.J.; Keegan, A.R.; Monis, P.T. y Saint, C.P. 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 3848-3857.

King, B.J.; Hoefel, D.; Daminato, D.P.; Fanok, S. y Monis, P.T. 2008. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 1311-1323.

Klavarioti, M.; Mantzavinos, D. y Kassinos, D. 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environmental International*, **35**: 402-417.

Kniel, K.E.; Sumner, S.S.; Lindsay, D.S.; Hackney, C.R.; Pierson, M.D.; Zajac, A.M.; Golden, D.A. y Fayer, R. 2003. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *Journal of Food Protection*, **66**: 1650-1657.

Kniel, K.E.; Summer, S.S.; Pierson, M.D.; Zajac, A.M.; Hackney, C.R.; Fayer, R. y Lindsay, D.S. 2004. Effect of hydrogen peroxide and other protease inhibitors on *Cryptosporidium parvum* excystation and *in vitro* development. *Journal of Parasitology*, **90**: 885-888.

Kurniawan, A.; Karyadi, T.; Dwintasari, S.W.; Sari, I.P.; Yuniastuti, E.; Djauzi, S. y Smith, H.V. 2009. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**: 892-898.

Lara, H.H.; Garza-Trevino, E.N.; Ixtapan-Turrent, L. y Singh, D.K. 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, **9**: 30.

Larrosa-Haro, A.; Macias-Rosales, R.; Sánchez-Ramírez, C.A.; Cortés-López, M.C. y Aguilar-Benavides, S. 2010. Seasonal variation of enteropathogens in infants and preschoolers with acute diarrhea in western Mexico. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **51**: 534-536.

Laubach, H.E.; Bentley, C.Z.; Ginter, E.L.; Spalter, J.S. y Jensen, L.A. 2004. A study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around Lake Atitlan, Guatemala. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **8**: 319-323.

Lavdovskaia, M.V.; Lysenko, A.; Basova, E.N.; Lozovaia, G.A.; Baleva, L.S. y Rybalkina, T.N. 1996. The host-opportunistic protozoa system. The effect of ionizing radiation on the prevalence of cryptosporidiosis and pneumocystosis. *Parazitologiya*, **30**: 153-158.

Lawand, T.A.; Alward, R.; Odeyemi, O.; Hahn, J.; Kandpal, T.C. y Ayoub, J. 1988. Solar water disinfection: proceedings of a workshop held at the Brace Research Institute. IDRC, Ottawa, 239 pp.

LeChevallier, M.W. y Au, K.K. 2004. Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water. IWA Publishing, Londres, 112 pp.

Lee, D. 1991. Development of a prototype of an individual slow sand filter for intermittent use in the Philippines. Tesis Doctoral. Universidad de Calgary. 47 pp.

Lee, S.U.; Joung, M.; Nam, T.; Park, W.Y.; Ji, Y.H. y Yu, J.R. 2011. *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Experimental Parasitology*, **127**: 25-30.

Leitch, G.J. y He, Q. 1999. Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infection and Immunity*, **67**: 5885-5891.

Levine, N.D. 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, **66**: 830-834.

Lindo, J.F.; Dubon, J.M.; Ager, A.L.; de Gourville, E.M.; Solo-Gabriele, H.; Klaskala, W.I.; Baum, M.K. y Palmer, C.J. 1998. Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals in San Pedro Sula, Honduras. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 431-435.

Lindsay, D.S.; Upton, S.J.; Owens, D.S.; Morgan, U.M.; Mead, J.R. y Blagburn, B.L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 91-95.

Lonnen, J.; Kilvington, S.; Kehoe, S.C.; Al-Touati, F. y McGuigan, K.G. 2005. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research*, **39**: 877-883.

Mac Kenzie, W.R.; Hoxie, N.J.; Proctor, M.E.; Gradus, M.S.; Blair, K.A.; Peterson, D.E.; Kazmierczak, J.J.; Addiss, D.G.; Fox, K.R.; Rose, J.B. y Davis, J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, **331**: 161-167.

Madronich, S. y Flocke, S. 1997. Theoretical estimation of biologically effective UV radiation at the Earth's surface. *En: Solar ultraviolet radiation: modelling, measurements and effects, Series I: Global Environmental Change*. S.C. Zerefos y A.F. Bais (Eds.). Springer, Berlin, Alemania, pp: 23-48.

Malato, S.; Richter, C.; Blanco, J. y Vicent, M. 1996. Photocatalytic degradation of industrial residual waters. *Solar Energy*, **56**: 401.

Malato, S.; Blanco, J.; Fernández, P.; Alarcón, D.C.; Collares, M.; Farinha, J. y Correia, J. 2004. Engineering of solar photocatalytic collectors, *Solar Energy*, **77**: 513-524.

Malato, S.; Fernández-Ibáñez, P.; Maldonado, M.I.; Blanco, J. y Gernjak, W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catalysis Today*, **147**: 1-59.

Mahdi, N.K. y Ali, N.H. 2004. Cryptosporidiosis and other intestinal parasitic infections in patients with chronic diarrhea. *Saudi Medical Journal*, **25**: 1204-1207.

Mahgoub, E.S.; Almahbashi, A. y Abdulatif, B. 2004. Cryptosporidiosis in children in a north Jordanian paediatric hospital. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **10**: 494-501.

Malloy, K.D.; Holman, M.A.; Mitchell, D. y Detrich, H.W. 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**: 1258-1263.

Manz, D.H.; Buzunis, B. y Morales, C. 1993. Nicaragua household water supply and testing project. University of Calgary, Calgary, 10 pp.

Mata, L.; Bolanos, H.; Pizarro, D. y Vives, M. 1984. Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **33**: 24-29.

Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T. y Wake, H. 1985. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, **29**: 211-214.

Mäusezahl, D.; Christen, A.; Pacheco, G.D.; Tellez, F.A.; Iriarte, M.; Zapata, M.E.; Cevallos, M.; Hattendorf, J.; Cattaneo, M.D.; Arnold, B.; Smith, T.A. y Colford, J.M., Jr. 2009. Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: a cluster-randomized, controlled trial. *PLoS Medicine*, **6**: e1000125, 13 pp.

McGonigle, S.; Dalton, J.P. y James, E.R. 1998. Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitology Today*, **14**: 139-145.

McGuigan, K.G.; Joyce, T.M.; Conroy, R.M.; Gillespie, J.B. y Elmore-Meegan, M. 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, **6**: 1138-1148.

McGuigan, K.G.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E.; Kehoe, S.C.; Boyle, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P.; Meyer, B.P.; Ramalingham, S. y Meyer, E.A. 2006. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 453-463.

McGuigan, K.G.; Samaiyar, P.; du Preez, M. y Conroy, R.M. 2011. High compliance randomized controlled field trial of solar disinfection of drinking water and its impact on childhood diarrhea in rural Cambodia. *Environmental Science and Technology*, **45**: 7862-7867.

McLauchlin, J.; Pedraza-Díaz, S.; Amar-Hoetzeneder, C. y Nichols, G.L. 1999. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 3153-3158.

Meisel, J.L.; Perera, D.R.; Meligro, C. y Rubin, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **70**: 1156-1160.

Méndez-Hermida, F.; Ares-Mazás, E.; McGuigan, K.G.; Boyle, M.; Sichel, C. y Fernández-Ibáñez, P. 2007. Disinfection of drinking water contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under natural sunlight and using the photocatalyst TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, **88**: 105-111.

Mercado, R. y García, M. 1995. Annual frequency of *Cryptosporidium parvum* infections in children and adult outpatients, and adults infected by HIV. *Revista Médica de Chile*, **123**: 479-484.

Minta, D.K.; Dembele, M.; Dolo, A.; Sidibe, A.T.; Diarra, A.S.; Konate, A.; Diarra, M.; Diakite, A.; Sidibe, A.F.; Traore, A.K.; Maiga, M.Y.; Pichard, E.; Traore, H.A. y Doumbo, O. 2007. Digestive parasitic diseases to HIV/AIDS infected patients of internal medicine and infectious diseases wards of the hopital du Point "G" Bamako - Mali. *Mali Medical*, **22**: 33-36.

Miron, J.; Siso, M.I.G.; Murado, M.A. y González, M.P. 1988. Microfungus-yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wates. II: An experimental desing for optimization of yeast production. *Biotechnology Letters*, **2**: 171-176.

Molbak, K.; Hojlyng, N.; Gottschau, A.; Sá, J.C.; Ingholt, L.; da Silva, A.P. y Aaby, P. 1993. Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, west Africa. *British Medical Journal*, **307**: 417-420.

Molloy, S.F.; Tanner, C.J.; Kirwan, P.; Asaolu, S.O.; Smith, H.V.; Nichols, R.A.; Connelly, L. y Holland, C.V. 2011. Sporadic *Cryptosporidium* infection in Nigerian children: risk factors with species identification. *Epidemiology and Infection*, **139**: 946-954.

Montuori, P.; Jover, E.; Morgantini, M.; Bayona, J.M. y Triassi, M. 2007. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. *Food Additives and Contaminants*, **25**: 511-518.

Mor, S.M. y Tzipori, S. 2008. Cryptosporidiosis in children in Sub-Saharan Africa: a lingering challenge. *Clinical Infectious Diseases*, **47**: 915-921.

Morgan, U.M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A.A. y Thompson, R.C. 1999. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1733-1751.

Morgan, U.M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A.A. y Thompson, R.C. 2000. Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contributions to Microbiology*, **6**: 116-139.

Morgan-Ryan, U.M.; Fall, A.; Ward, L.A.; Hijjawi, N.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Thompson, R.C.; Olson, M.; Lal, A. y Xiao, L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49**: 433-440.

Morse, T.D.; Nichols, R.A.; Grimason, A.M.; Campbell, B.M.; Tembo, K.C. y Smith, H.V. 2007. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiology and Infection*, **135**: 1307-1315.

Mousa, K.M.; Abdel-Tawab, A.H.; Khalil, H.H. y El-Hussieny, N.A. 2010. Diarrhea due to parasites particularly *Cryptosporidium parvum* in great Cairo, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **40**: 439-450.

Moyo, S.J.; Gro, N.; Matee, M.I.; Kitundu, J.; Myrmel, H.; Mylvaganam, H.; Maselle, S.Y. y Langeland, N. 2011. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatrics*, **11**: 19.

Muñoz-Antolí, C.; Pavón, A.; Marcilla, A.; Toledo, R. y Esteban, J.G. 2011. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in schoolchildren from department of Rio San Juan (Nicaragua). *Tropical Biomedicine*, **28**: 40-47.

Naciones Unidas. 2000. Objetivos de desarrollo del Milenio (ODM). <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/poverty>. Accedido en: 16 de noviembre de 2011.

Nacro, B.; Bonkougou, P.; Nagalo, K.; Tall, F.R. y Curtis, V. 1998. Clinical profile of cryptosporidiosis in a pediatric hospital environment in Burkina Faso. *Medecine Tropicale*, **58**: 47-50.

Nahrevanian, H. y Assmar, M. 2008. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in the Islamic Republic of Iran. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **41**: 74-77.

Navalón, S.; Álvaro, M.; García, H.; Escrig, D. y Costa, V. 2009. Photocatalytic water disinfection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* using a fibrous ceramic TiO₂ photocatalyst. *Water Science and Technology*, **59**: 639-645.

Navarro-i-Martínez, L.; da Silva, A.J.; Botero Garcés, J.H.; Montoya Palacio, M.N.; del Águila, C. y Bornay-Llinares, F.J. 2006. Cryptosporidiosis in HIV-positive patients from Medellín, Colombia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S37-39.

Navarro-i-Martínez, L.; del Águila, C. y Bornay-Llinares, F.J. 2011. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **29**: 135-143.

Navntoft, C.; Ubomba-Jaswa, E.; McGuigan, K.G. y Fernández-Ibáñez, P. 2008. Effectiveness of solar disinfection using batch reactors with non-imaging aluminium reflectors under real conditions: natural well-water and solar light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **93**: 155-161.

Naylor, M. y Farmer, K.C. 1995. Sun damage and prevention. <http://www.telemedicine.org/stamford.htm>. Accedido 16 de noviembre de 2011.

Nichols, G. 2007. Epidemiology. En: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer y L. Xiao (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 79-118.

Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A. y Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**: 592-598.

Núñez, F.A.; González, O.M.; González, I.; Escobedo, A.A. y Cordovi, R.A. 2003. Intestinal coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**: 539-542.

O'Donoghue, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, **25**: 139-195.

Ogunkolade, B.W.; Robinson, H.A.; McDonald, V.; Webster, K. y Evans, D.A. 1993. Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*, **79**: 385-388.

Ohno, Y. y Gallin, J.I. 1985. Diffusion of extracellular hydrogen peroxide into intracellular compartments of human neutrophils. Studies utilizing the inactivation of myeloperoxidase by hydrogen peroxide and azide. *Journal of Biological Chemistry*, **260**: 8438-8446.

Ojurongbe, O.; Raji, O.A.; Akindele, A.A.; Kareem, M.I.; Adefioye, O.A. y Adeyeba, A.O. 2011. *Cryptosporidium* and other enteric parasitic infections in HIV-seropositive individuals with and without diarrhoea in Osogbo, Nigeria. *British Journal of Biomedical Science*, **68**: 75-78.

Opintan, J.A.; Newman, M.J.; Ayeh-Kumi, P.F.; Afrim, R.; Gepi-Attee, R.; Sevilleja, J.E.; Roche, J.K.; Nataro, J.P.; Warren, C.A. y Guerrant, R.L. 2010. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**: 936-943.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2011. AQUASTAT. Sistema de información sobre el uso del agua en la agricultura y el medio rural de la FAO. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/indexesp.stm>. Accedido: 14 de noviembre de 2011.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Emerging issues in water and infectious disease. OMS, Ginebra, 22 pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2004. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organization Technical Report Series*, **922**: 1-176.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Combating waterborne disease at the household level. OMS, Ginebra, 35 pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Evaluating household water treatment options: health-based targets and microbiological performance specifications. Ginebra, Suiza, 59 pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). 2000. Global water supply and sanitation assessment report. Ginebra, Suiza, 80 pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). 2005. Water for Life: Making it Happen. http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2005/en/. Accedido: 16 de noviembre de 2011.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). 2010. Progress on Sanitation and Drinking-water: 2010 Update. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/9789241563956/en/. Accedido: 16 de noviembre de 2011.

Otaki, M.; Hirata, T. y Ohgaki, S. 2000. Aqueous microorganisms inactivation by photocatalytic reaction. *Water Science and Technology*, **42**: 103-108.

Palmateer, G.; Manz, D.; Jurkovic, A.; McLinnis, R.; Unger, S.; Kwan, K.K. y Dutka, B.J. 1999. Toxicant and parasite challenge of Manz intermittent slow sand filter. *Environmental Toxicology*, **14**: 217-225.

Panciera, R.J.; Thomassen, R.W. y Garner, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, **8**: 479-484.

Paspaltsis, I., Kotta, K., Lagoudaki, R., Grigoriadis, N., Poullos, I. y Sklaviadis, T. 2006. Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions. *Journal of General Virology*, **87**: 3125-3130.

Patel, S.; Pedraza-Díaz, S. y McLauchlin, J. 1998. The molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. *Communicable Disease and Public Health*, **1**: 231-233.

Patrick, E.A.F. 1980. Soils: their formation, classification and distribution. Longman, Londres, 353 pp.

Pavlašek, I.; Lavickova, M.; Horak, P.; Kral, J. y Kral, B. 1995. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. *Gazella*, **22**: 99-108.

Peng, X.; Murphy, T. y Holden, N.M. 2008. Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 7101-7107.

Perch, M.; Sodemann, M.; Jakobsen, M.S.; Valentiner-Branth, P.; Steinsland, H.; Fischer, T.K.; Lopes, D.D.; Aaby, P. y Molbak, K. 2001. Seven years' experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. *Annals of Tropical Paediatrics*, **21**: 313-318.

Pham, T.B.; Nhu, T.H.; Odermatt, P.; Tran, X.M.; Malvy, D. y Strobel, M. 2007. Animal and human Cryptosporidiosis in rural zone in Vietnam (Cu Chi district, Ho-Chi-Minh-City). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **100**: 99-100.

Polo-López, M.I.; García-Fernández, I.; Oller, I. y Fernández-Ibáñez, P. 2011. Solar disinfection of fungal spores in water aided by low concentrations of hydrogen peroxide. *Photochemical and Photobiology Sciences*, **10**: 381-388.

Power, M.L. y Ryan, U.M. 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, **94**: 1114-1117.

Powers, E.M.; Hernández, C.; Boutros, S.N. y Harper, B.G. 1994. Biocidal efficacy of a flocculating emergency water purification tablet. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2316-2323.

Putignani, L. y Menichella, D. 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2010**: ID 753512, 39 pp.

Rabl, A.; Goodman, N.B. y Winston, R. 1979. Practical considerations for CPC solar collectors. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, **22**: 373-381.

Raccurt, C.P.; Brasseur, P.; Verdier, R.I.; Li, X.; Eyma, E.; Stockman, C.P.; Agnamey, P.; Guyot, K.; Totet, A.; Liataud, B.; Nevez, G.; Dei-Cas, E. y Pape, J.W. 2006. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti. *Tropical Medicine and International Health*, **11**: 929-934.

Rai, B.; Pal, R.; Kar, S. y Tsering, D.C. 2010. Solar disinfection improves drinking water quality to prevent diarrhea in under-five children in Sikkim, India. *Journal of Global Infectious Diseases*, **2**: 221-225.

Rangel, J.M.; Lopez, B.; Mejia, M.A.; Mendoza, C. y Luby, S. 2003. A novel technology to improve drinking water quality: a microbiological evaluation of in-home flocculation and chlorination in rural Guatemala. *Journal of Water and Health*, **1**: 15-22.

Ravanat, J.L.; Douki, T. y Cadet, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, **63**: 88-102.

Raven, P.H. y Johnson, G.B. 1999. Biology. McGraw-Hill, Nueva York, 1284 pp.

Reed, R.H. 1996. Sol-air water treatment. *En: 22nd WEDC Conference, Discussion Paper*. New Delhi, India, pp: 295-296.

Reed, R.H. 1997. Solar inactivation of faecal bacteria in water: the critical role of oxygen. *Letters in Applied Microbiology*, **24**: 276-280.

Rehfuess, E.; Mehta, S. y Pruss-Ustun, A. 2006. Assessing household solid fuel use: multiple implications for the Millennium Development Goals. *Environmental Health Perspectives*, **114**: 373-378.

Reinthal, F.F.; Linck, G.; Klem, G.; Mascher, F. y Sixl, W. 1988. Intestinal parasites in children with diarrhea in El Salvador. *Geographia Medica*, **18**: 175-180.

Reller, M.E.; Mendoza, C.E.; Lopez, M.B.; Alvarez, M.; Hoekstra, R.M.; Olson, C.A.; Baier, K.G.; Keswick, B.H. y Luby, S.P. 2003. A randomized controlled trial of household-based flocculant-disinfectant drinking water treatment for diarrhea prevention in rural Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**: 411-419.

Rincón, A.G. y Pulgarin, C. 2004. Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO₂: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection?. *Solar Energy*, **77**: 635-648.

Robertson, L.J. y Gjerde, B.K. 2007. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries?. *Trends in Parasitology*, **23**: 344-347.

Robinson, G.; Wright, S.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Katzer, F.; Bartley, P.M.; Hunter, P.R.; Nath, M.; Innes, E.A. y Chalmers, R.M. 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **40**: 1539-1548.

Rodda, N.; Bateman, B. y Kfir, R. 1993. Removal of *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* and rotavirus from water using a water treatment tablet. *Water Science and Technology*, **27**: 347-350.

Rose, A.; Roy, S.; Abraham, V.; Holmgren, G.; George, K.; Balraj, V.; Abraham, S.; Muliylil, J.; Joseph, A. y Kang, G. 2006. Solar disinfection of water for diarrhoeal prevention in southern India. *Archives of Disease in Childhood*, **91**: 139-141.

Rutala, W.A. y Weber, D.J. 2004. Registration of disinfectants based on relative microbicidal activity. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **25**: 333-341.

Ryan, U.M.; Xiao, L.; Read, C.; Sulaiman, I.M.; Monis, P.; Lal, A.A.; Fayer, R. y Pavlasek, I. 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, **89**: 809-813.

Ryan, U.M.; Monis, P.; Enemark, H.L.; Sulaiman, I.; Samarasinghe, B.; Read, C.; Buddle, R.; Robertson, I.; Zhou, L.; Thompson, R.C. y Xiao, L. 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, **90**: 769-773.

Ryan, U.M.; Power, M. y Xiao, L. 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 22-26.

Ryu, H.; Gerrity, D.; Crittenden, J.C. y Abbaszadegan, M. 2008. Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Research*, **42**: 1523-1530.

Saksirisampant, W.; Prownebon, J.; Saksirisampant, P.; Mungthin, M.; Siripatanapong, S. y Leelayoova, S. 2009. Intestinal parasitic infections: prevalences in HIV/AIDS patients in a Thai AIDS-care centre. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **103**: 573-581.

Samie, A.; Guerrant, R.L.; Barrett, L.; Bessong, P.O.; Igumbor, E.O. y Obi, C.L. 2009. Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrhoeal and non-diarrhoeal human stools from Vhembe district, South Africa. *Journal of Health, Population and Nutrition*, **27**: 739-745.

Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**: 5463-5467.

Sarfati, C.; Bourgeois, A.; Menotti, J.; Liegeois, F.; Moyou-Somo, R.; Delaporte, E.; Derouin, F.; Ngole, E.M. y Molina, J.M. 2006. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**: 162-164.

Savioli, L.; Smith, H. y Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, **22**: 203-208.

Schmid, P.; Kohler, M.; Meierhofer, R.; Luzi, S. y Wegelin, M. 2008. Does the reuse of PET bottles during solar water disinfection pose a health risk due to the migration of plasticisers and other chemicals into the water?. *Water Research*, **42**: 5054-5060.

Sejdini, A.; Mahmud, R.; Lim, Y.A.; Mahdy, M.; Sejdini, F.; Gjoni, V.; Xhaferraj, K. y Kasmi, G. 2011. Intestinal parasitic infections among children in central Albania. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **105**: 241-250.

Semenza, J.C. y Nichols, G. 2007. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Eurosurveillance*, **12**: 120-123.

Seven, O.; Dindar, B.; Aydemir, S.; Metin, D.; Ozinel, M.A. y Icli, S. 2004. Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **165**: 103-107.

Sichel, C.; de Cara, M.; Tello, J.; Blanco, J. y Fernández-Ibáñez, P. 2007. Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi: *Fusarium* species. *Applied Catalysis B: Environmental*, **74**: 152-160.

Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P.; de Cara, M. y Tello, J. 2009. Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water. *Water Research*, **43**: 1841-1850.

Siwila, J.; Phiri, I.G.; Enemark, H.L.; Nchito, M. y Olsen, A. 2010. Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**: 122-128.

Simango, C. y Mutikani, S. 2004. Cryptosporidiosis in Harare, Zimbabwe. *Central African Journal of Medicine*, **50**: 52-54.

Slavin, D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, **65**: 262-266.

Smith, H.V. y Rose, J.B. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, **14**: 14-22.

Smith, R.J.; Kehoe, S.C.; McGuigan, K.G. y Barer, M.R. 2000. Effects of simulated solar disinfection of water on infectivity of *Salmonella typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*, **31**: 284-288.

Smith, H.V.; Nichols, R.A. y Grimason, A.M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, **21**: 133-142.

Sobsey, M.D. 1989. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science and Technology*, **21**: 179-195.

Sobsey, M.D. 2002. Managing water in the home: accelerated health gains from improved water supply. OMS, Ginebra, 70 pp.

Sobsey, M.D.; Stauber, C.E.; Casanova, L.M.; Brown, J.M. y Elliott, M.A. 2008. Point of use household drinking water filtration: a practical, effective solution for providing sustained access to safe drinking water in the developing world. *Environmental Science and Technology*, **42**: 4261-4267.

Souter, P.F.; Cruickshank, G.D.; Tankerville, M.Z.; Keswick, B.H.; Ellis, B.D.; Langworthy, D.E.; Metz, K.A.; Appleby, M.R.; Hamilton, N.; Jones, A.L. y Perry, J.D. 2003. Evaluation of a new water treatment for point-of-use household applications to remove microorganisms and arsenic from drinking water. *Journal of Water and Health*, **1**: 73-84.

Stansinakis, A.S. 2008. Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment - A mini review. *Global NEST Journal*, **10**: 376-385.

Stauber, C.E.; Elliott, M.A.; Koksal, F.; Ortiz, G.M.; DiGiano, F.A. y Sobsey, M.D. 2006. Characterisation of the biosand filter for *E. coli* reductions from household drinking water under controlled laboratory and field use conditions. *Water Science and Technology*, **54**: 1-7.

Stumm, W. y Morgan, J.J. 1995. Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. Wiley, Nueva York, 1040 pp.

Sunnotel, O.; Verdoold, R.; Dunlop, P.S.; Snelling, W.J.; Lowery, C.J.; Dooley, J.S.; Moore, J.E. y Byrne, J.A. 2010. Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* on nanostructured titanium dioxide films. *Journal of Water and Health*, **8**: 83-91.

Teixeira, M.C.; Barreto, M.L.; Melo, C.; Silva, L.R.; Moraes, L.R. y Alcântara-Neves, N.M. 2007. A serological study of *Cryptosporidium* transmission in a periurban area of a Brazilian Northeastern city. *Tropical Medicine and International Health*, **12**: 1096-1104.

Thompson, R.C.; Olson, M.E.; Zhu, G.; Enomoto, S.; Abrahamsen, M.S.; Hijjawi, N.S. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, **59**: 77-158.

Tiwari, S.S.; Schmidt, W.P.; Darby, J.; Kariuki, Z.G. y Jenkins, M.W. 2009. Intermittent slow sand filtration for preventing diarrhoea among children in Kenyan households using unimproved water sources: randomized controlled trial. *Tropical Medicine and International Health*, **14**: 1374-1382.

Tumwine, J.K.; Kekitiinwa, A.; Nabukeera, N.; Akiyoshi, D.E.; Rich, S.M.; Widmer, G.; Feng, X. y Tzipori, S. 2003. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**: 710-715.

Tyzzer, E.E. 1907. A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, **5**: 12-13.

Tyzzer, E.E. 1910. An extracelular coccidium, *Cryptosporidium muris* (*gen. et sp. nov.*), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*, **23**: 394-418.

Tyzzer, E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (*sp. nov.*), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv der Protistenkunde*, **26**: 394-418.

Tyzzer, E.E. 1929. Coccidiosis in a gallinaceous birds. *American Journal of Higiene*, **10**: 269-383.

Tzipori, S.; Angus, K.W.; Campbell, I. y Gray, E.W. 1980. *Cryptosporidium*: evidence for a simple-species genus. *Infection and Immunity*, **30**: 884-886.

Ubomba-Jaswa, E.; Navntoft, C.; Polo-López, M.I.; Fernández-Ibáñez, P. y McGuigan, K.G. 2009. Solar disinfection of drinking water (SODIS): an investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **8**: 587-595.

Ubomba-Jaswa, E.; Fernández-Ibáñez, P.; Navntoft, C.; Polo-López, M.I. y McGuigan, K.G. 2010. Investigating the microbial inactivation of a 25 L batch solar disinfection (SODIS) reactor enhanced with a compound parabolic collector (CPC) for household use. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **85**: 1028-1037.

Ungar, B.L.; Gilman, R.H.; Lanata, C.F. y Pérez-Schael, I. 1988. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *Journal of Infectious Diseases*, **157**: 551-556.

Ungar, B.L.; Mulligan, M. y Nutman, T.B. 1989. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. *Archives of Internal Medicine*, **149**: 894-897.

Upton, S.J. 2003. *Cryptosporidium*: they probably taste like chicken. En: *Cryptosporidium*: from molecules to disease. R.C.A. Thompson, A. Armonson y U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 3-10.

Valentiner-Branth, P.; Steinsland, H.; Fischer, T.K.; Perch, M.; Scheutz, F.; Dias, F.; Aaby, P.; Molbak, K. y Sommerfelt, H. 2003. Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 4238-4245.

Vergara Castiblanco, C.A. 1999. Estudio inmunológico de la cryptosporidiosis humana en Colombia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 270 pp.

Vetterling, J.M. y Doran, D.J. 1969. Storage polysaccharide in coccidial sporozites after excystation and penetration of cells. *Journal of Protozoology*, **16**: 772-775.

Vetterling, J.M.; Jervis, H.R.; Merrill, T.G. y Sprinz, H. 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *Journal of Protozoology*, **18**: 243-247.

Vidal, A.; Díaz, A.I.; El Hraiki, A.; Romero, M.; Muguruza, I.; Senhaji, F. y González, J. 1999. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of contaminated water: pilot plant studies. *Catalysis Today*, **54**: 183-290.

Villacorta, I.; Ares, M.E.; Pérez del Molino, L.; Bajo, T. y Fandiño Salorio, L. 1988. Cryptosporidiosis experimental en ratones. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 133-137.

Walker, D.C.; Len, S.V. y Sheehan, B. 2004. Development and evaluation of a reflective solar disinfection pouch for treatment of drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 2545-2550.

Warren, C.A. y Guerrant, R.L. 2007. Clinical disease and pathology. *En: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. R. Fayer y L. Xiao (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 235-253.

Wegelin, M.; Canonica, S.; Mechsner, K.; Fleischmann, T.; Pesaro, F. y Metzler, A. 1994. Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water Supply: Research and Technology- AQUA*, **43**: 154-169.

Wegelin, M.; Canonica, S.; Alder, A.C.; Marazuela, D.; Suter, M.J.F.; Bucheli, D.; Haefliger, O.P.; Zenobi, R.; McGuigan, K.G.; Kelly, M.T.; Ibrahim, P. y Larroque, M. 2001. Does sunlight change the material and content of polyethylene terephthalate (PET) bottles?. *Journal of Water Supply: Research and Technology- AQUA*, **50**: 125-133.

Weir, S.C.; Pokorny, N.J.; Carreno, R.A.; Trevors, J.T. y Lee, H. 2002. Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2576-2579.

Westerhoff, P.; Prapaipong, P.; Shock, E. y Hillaireau, A. 2008. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Research*, **42**: 551-556.

White, G.F.; Bradley, D.J. y White, A.U. 1972. Drawers of water: domestic water use in East Africa. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 315 pp.

Widmer, G.; Klein, P. y Bonilla, R. 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*, **134**: 1583-1588.

Wumba, R.; Longo-Mbenza, B.; Mandina, M.; Odio, W.T.; Biligui, S.; Sala, J.; Breton, J. y Thellier, M. 2010. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite*, **17**: 321-328.

Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, **124**: 80-89.

Xiao, L.; Morgan, U.M.; Fayer, R.; Thompson, R.C. y Lal, A.A. 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, **16**: 287-292.

Yakoob, J.; Abbas, Z.; Beg, M.A.; Naz, S.; Khan, R.; Islam, M. y Jafri, W. 2010. Prevalences of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* infection in adults presenting with chronic diarrhoea. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **104**: 505-510.

Yoder, J.S.; Harral, C. y Beach, M.J. 2010. Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Surveillance Summaries*, **59**: 1-14.

RESUMEN

INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* EN CONDICIONES SIMULADAS DE RADIACIÓN SOLAR

Mediante un diseño factorial 2×3 de primer orden y bajo condiciones simuladas de radiación solar y una temperatura constante de 30 °C, se evaluó la influencia que la turbidez del agua (5; 100; y 300 UNF), la intensidad de radiación (200; 600; y 900 W/m² de radiación global, equivalentes a las intensidades de radiación solar descritas para áreas ecuatoriales en días total y parcialmente nublados y soleados, respectivamente) y el tiempo de exposición (4; 8; y 12 horas) tienen sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* durante los procesos de desinfección solar del agua de bebida. Mediante la aplicación de la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP, se observó que la potencial viabilidad ooquistica osciló entre un mínimo del 54,0% (5 UNF; 900 W/m²; y 12 horas) y un máximo del 91,7% (200 W/m²; 4 horas, independientemente del nivel de turbidez). De igual forma, se comprobó que el menor valor de infectividad ooquistica (30,8%) se obtuvo para unas condiciones de 5 UNF de turbidez, 900 W/m² de intensidad de radiación y 12 horas de exposición. Se demostró que los tres parámetros independientemente, así como las interacciones intensidad de radiación-tiempo de exposición y nivel de turbidez-intensidad de radiación son factores que influyen de forma estadísticamente significativa sobre la viabilidad e infectividad de los ooquistes de *C. parvum*. Las ecuaciones empíricas obtenidas con los distintos parámetros evaluados demostraron que el mayor coeficiente con signo negativo correspondió a la intensidad de radiación. Así, se observó que, independientemente del tiempo de exposición y del nivel de turbidez, la menor intensidad de radiación evaluada (200 W/m²) no ejerció una influencia estadísticamente significativa sobre la supervivencia ooquistica. Por el contrario, el porcentaje de ooquistes IP negativos (potencialmente viables) y la infectividad determinada en el modelo murino lactante tienden a disminuir cuando las muestras hídricas se expusieron a una intensidad de radiación ≥ 600 W/m². A la máxima intensidad de radiación evaluada (900 W/m²), se observaron descensos estadísticamente significativos en la potencial viabilidad e infectividad ooquisticas, tanto para los distintos niveles de turbidez como para los diferentes tiempos de exposición ensayados. Las ecuaciones obtenidas son válidas para predecir la potencial viabilidad e infectividad de los ooquistes de *C. parvum* en el rango de condiciones ensayadas.

DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO BOTELLAS PET

Se estudió la eficacia de la técnica SODIS en la desinfección de aguas turbias contaminadas experimentalmente con las formas infectantes de *C. parvum*, evaluando, de forma conjunta e independiente, los efectos óptico y térmico de la radiación solar. Para ello, botellas PET conteniendo aguas con distintos niveles de turbidez (0; 5; 100; y 300 UNF) y contaminadas experimentalmente con 5×10^6 ooquistes purificados de *C. parvum* se expusieron durante 4; 8; y 12 horas a la radiación solar en uno de los tejados de las instalaciones de la PSA, perteneciente al CIEMAT del Ministerio de Ciencia e Innovación y situada en el Desierto de Tabernas, Almería (latitud, $37^{\circ}05'54''$ N; longitud, $2^{\circ}21'32''$ O; altitud, 500 m). De forma similar, aguas con los niveles de turbidez extremos e igual índice de contaminación, se expusieron en el interior de un baño de agua a temperatura controlada (20-25 °C). Por otra parte, viales de 1,5 ml conteniendo 2×10^6 ooquistes de *C. parvum* resuspendidos en un ml de agua destilada se expusieron durante los mismos periodos de tiempo a los perfiles medios de temperatura registrados en el interior de las botellas PET durante los ensayos realizados en condiciones de campo. La viabilidad ooquistica se determinó mediante la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP. Además, en el ensayo del efecto térmico, se valoró el fenómeno del desenquistamiento espontáneo y la infectividad ooquistica utilizando un modelo murino lactante.

El análisis de los resultados obtenidos tras la aplicación del método SODIS (efectos óptico y térmico) demostró que a medida que aumenta el tiempo de exposición disminuye la viabilidad ooquistica. Así, y con respecto a la viabilidad inicial del aislado utilizado, se obtuvieron reducciones del 66,4%; 76,0%; y 87,4% en aguas de 0 UNF para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente. En aguas con distintos niveles de turbidez, aunque la viabilidad ooquistica también disminuyó, los porcentajes de reducción fueron inferiores. De esta forma, en aguas de 300 UNF, se determinaron porcentajes de reducción de la viabilidad ooquistica del 19,2%; 40,9%; y 42,4% para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente. Cuando se evaluó tan sólo el efecto óptico, también se observaron reducciones en la viabilidad ooquistica, alcanzándose valores inferiores a los obtenidos mediante la técnica SODIS. Porcentajes de reducción del 13,2%; 41,2%; y 55,3%, se hallaron en aguas claras para tiempos de exposición de 4; 8; y 12 horas, respectivamente. Sin embargo, para aguas con el mayor nivel de turbidez, la reducción máxima obtenida tras 12 horas de exposición fue del 13,9%. De igual forma, al estudiar el efecto térmico, se observaron reducciones en la viabilidad ooquistica, principalmente a tiempos de exposición prolongados. Así, se obtuvieron porcentajes de

reducción del 6,4% tras 4 horas de exposición y del 28,6% y 26,9% después de 8 y 12 horas de exposición, respectivamente.

Considerando independientemente los resultados obtenidos durante la evaluación de los efectos óptico y térmico, se comprobó tras la aplicación del método SODIS un fuerte efecto sinérgico después de 4 horas de exposición tanto en aguas claras como en aguas muy turbias. De esta forma, la aplicación del método SODIS a aguas de 0 UNF provocó una reducción en la viabilidad ooquistica del 66,4% tras 4 horas de exposición, mientras que las correspondientes reducciones cuando se evaluaron los efectos óptico y térmico de forma independiente fueron del 13,2% y 6,4%, respectivamente. El efecto sinérgico es menos notorio al aumentar los tiempos de exposición, no detectándose en aguas muy turbias tras 8 y 12 horas de exposición.

DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS TURBIAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM* UTILIZANDO REACTORES SOLARES EQUIPADOS CON CPC

Con el fin de mejorar la eficacia del método SODIS en la desinfección de aguas contaminadas experimentalmente con las formas infectantes de *C. parvum*, se evaluó el empleo de colectores solares bajo condiciones naturales de radiación solar. Para ello, reactores solares de vidrio borosilicatado de 2,5 l de capacidad se llenaron con aguas de distintos niveles de turbidez (0; 5; y 100 UNF) contaminadas experimentalmente con $2,5 \times 10^6$ ooquistes purificados de *C. parvum*/l y se colocaron horizontalmente sobre el eje focal de dos CPC, CPC1 y CPC1,89 que presentaron FC de la radiación solar de 1 y 1,89, respectivamente. Las muestras se expusieron a la radiación solar durante un tiempo máximo de 12 horas, distribuidas en periodos de 6 horas durante dos días consecutivos (11:00-17:00 horas, hora local). Además, se evaluó un reactor solar de metacrilato de 25 l de capacidad equipado con un CPC de FC=1, que se llenó con aguas de 0; 5; y 30 UNF de turbidez contaminadas con $2-10 \times 10^6$ ooquistes purificados de *C. parvum*/l. Las muestras se expusieron a la radiación solar durante un tiempo máximo de 8 horas (10:00-18:00 horas, hora local).

Los resultados obtenidos utilizando los reactores solares de 2,5 l de capacidad equipados con CPC1 y CPC1,89 mostraron un patrón de inactivación ooquistica similar, comprobándose un descenso fuerte y estadísticamente significativo en la viabilidad global de los ooquistes de *C. parvum* en aguas de 0; 5; y 100 UNF tras un tiempo de exposición de 4 horas. Así, la viabilidad global fue de $4,6 \pm 2,4\%$; $3,9 \pm 1,9\%$; y $8,1 \pm 1,6\%$ y $7,0 \pm 0,9\%$; $4,8 \pm 1,5\%$; y $13,0 \pm 0\%$ en aguas de 0; 5; y 100 UNF utilizando los reactores equipados con

CPC1 y CPC1,89, respectivamente. A tiempos de exposición superiores y empleando ambos sistemas, la viabilidad global se anuló o fue prácticamente nula en todas las aguas ensayadas. Los resultados obtenidos con el reactor solar de 25 l de capacidad equipado con un CPC demostraron que tras 8 horas de exposición, se produjo un descenso significativo en la viabilidad global. Así, se obtuvieron valores de viabilidad global de $21,8 \pm 3,1\%$; $31,3 \pm 12,9\%$; y $45,0 \pm 10,0\%$ en aguas de 0; 5 y 30 UNF, respectivamente.

El análisis comparativo de los datos obtenidos con los hallados en el estudio previo utilizando botellas PET de 1,5 l de capacidad, demostró que el empleo de reactores equipados con CPC mejora la eficacia de la técnica SODIS en la inactivación de los ooquistes de *C. parvum*, al ofrecer la posibilidad de tratar un mayor volumen de agua, reducir el tiempo de exposición y en algunos casos, minimizar el efecto negativo de la turbidez. Además, estos sistemas, al concentrar la radiación solar, pueden ser utilizados durante periodos de elevada nubosidad.

RESISTENCIA DE LOS OOQUISTES DE *C. PARVUM* A TEMPERATURAS ALCANZABLES EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN SOLAR DEL AGUA

Se valoró la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* cuando se expusieron a temperaturas alcanzables durante los procesos de desinfección solar. Así, los ooquistes de *C. parvum* se sometieron a temperaturas de 37; 40; 42; 44; 46; 48; y 50 °C durante periodos de 2; 4; 6; 8; 10; y 12 horas, calculándose al final de cada tiempo de exposición la viabilidad global ooquistica, previa determinación de los porcentajes de ooquistes IP negativos y de desenquistamiento espontáneo, y comprobando la infectividad en un modelo murino lactante tras el máximo tiempo de exposición.

La aplicación de la técnica de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP demostró que cuando las suspensiones ooquisticas se expusieron a temperaturas superiores a 44 °C durante más de 4 horas, el porcentaje de ooquistes que incorporó dicho colorante (ooquistes potencialmente inviables) alcanzó valores comprendidos entre un 25-50%. Las variaciones observadas en el fenómeno del desenquistamiento espontáneo mostraron dos perfiles diferentes. Así, ooquistes expuestos a temperaturas de 37; 40; y 50 °C no experimentaron cambios estadísticamente significativos en dicho fenómeno durante las seis primeras horas del ensayo. Sin embargo, tras este periodo de exposición a 40 °C, se produjo un incremento en el porcentaje de desenquistamiento espontáneo, que fue más intenso tras 12 horas de exposición ($30,5 \pm 5,7\%$). A temperaturas comprendidas entre 42-48 °C, se observó un incremento gradual en el porcentaje de desenquistamiento

espontáneo a medida que aumentó el tiempo de exposición, alcanzando un valor máximo de $53,8 \pm 12,4\%$ tras 12 horas de exposición a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La viabilidad global ooquistica disminuyó a medida que la temperatura y el tiempo de exposición aumentaron, alcanzándose el menor valor tras la exposición de los ooquistes a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas ($24,7 \pm 10,7\%$). Este descenso se debió fundamentalmente al alto porcentaje de ooquistes desenquistados ($53,8 \pm 12,4\%$). Además, la incorporación del colorante vital fluorogénico IP fue de un $46,5 \pm 9,8\%$. A temperaturas superiores a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó un ligero incremento en el número de ooquistes permeables al IP; sin embargo, los niveles de desenquistamiento descendieron significativamente, posiblemente debido al daño causado por las altas temperaturas. No obstante, los resultados obtenidos en las infecciones experimentales demostraron una prevalencia del $19,4\%$ en ratones inoculados con ooquistes expuestos a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas, mientras que la infectividad se anuló a partir de los $48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas diferencias entre los valores de viabilidad global e infectividad ooquisticas pueden ser consecuencia del carácter conservador del método de inclusión/exclusión del colorante vital fluorogénico IP o de otros daños causados por las altas temperaturas y no detectados con la metodología aplicada.

APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS EN LA DESINFECCIÓN SOLAR DE AGUAS CONTAMINADAS CON OOQUISTES DE *C. PARVUM*

Mediante reactores solares de 14 l de capacidad equipados con un CPC1 en modo recirculante disponibles en las instalaciones de la PSA, se evaluó el uso del fotocatalizador TiO_2 inmovilizado en la desinfección solar de aguas experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. Se observó que, tanto en presencia como en ausencia del fotocatalizador, el porcentaje de ooquistes IP negativos (potencialmente viables) descendió progresivamente mostrando un perfil prácticamente idéntico bajo ambas condiciones. Así, al final de los ensayos, los correspondientes valores fueron de $52,7 \pm 3,5\%$ y $56,8 \pm 5,9\%$ en presencia/ausencia del fotocatalizador. Cuando se valoró el fenómeno del desenquistamiento espontáneo se observó un incremento en el porcentaje de ooquistes desenquistados durante las primeras 4-6 horas de exposición, alcanzándose los valores máximos tras 4 horas en presencia del fotocatalizador ($20,7 \pm 4,3\%$) y tras 6 horas en ausencia del mismo ($18,5 \pm 3,5\%$). Consecuentemente, tras el máximo tiempo de exposición ensayado (8 horas), los valores de potencial viabilidad ooquistica no presentaron diferencias estadísticamente significativas en presencia/ausencia del fotocatalizador ($52,7 \pm 3,5\%$ vs $56,8 \pm 5,9\%$). Este resultado podría justificarse por la demostrada eficacia frente a

Cryptosporidium de los reactores equipados con CPC, enmascarando tal vez el efecto de la desinfección fotocatalítica con TiO₂ observado por otros autores. No se debe obviar el hecho de que el agua sometida a la desinfección solar se encontraba en modo recirculante, lo que disminuyó el tiempo de permanencia de los ooquistes en la parte iluminada del sistema.

Por otra parte, se evaluó la utilización del H₂O₂ (500 mg/l) en la desinfección solar de aguas contaminadas experimentalmente con ooquistes de *C. parvum*. Bajo condiciones naturales de radiación solar, si bien se detectó una cierta acción desinfectante del H₂O₂ en ausencia de radiación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad global ooquística en presencia de radiación solar, a pesar de comprobar un descenso progresivo en la concentración de H₂O₂. Sin embargo, numerosos ooquistes que no incorporaron el colorante vital fluorogénico IP mostraron importantes alteraciones morfológicas que cuestionaron su viabilidad.

Teniendo en cuenta estas observaciones, en el estudio llevado a cabo bajo condiciones simuladas de radiación solar se valoró el desenquistamiento inducido provocado por la acción de ciertos estímulos que simulan las condiciones del hospedador y que proporcionan valores de viabilidad ooquística. De esta forma, pudimos comprobar un descenso significativo en el porcentaje de ooquistes desenquistados tras 2,5 horas en presencia de H₂O₂ en oscuridad, ofreciendo valores muy similares a los obtenidos cuando los ooquistes se expusieron a la radiación solar simulada, tanto en presencia como en ausencia del oxidante. Además, se comprobó una disminución significativa de la viabilidad global ooquística atribuida fundamentalmente al descenso del número de ooquistes IP negativos ($0,3 \pm 0,7\%$, tras 5 horas de exposición a la radiación solar simulada en presencia de H₂O₂), ya que los valores correspondientes al fenómeno de desenquistamiento espontáneo no mostraron notables diferencias con respecto a los del aislado de *C. parvum* utilizado.

Descensos estadísticamente significativos, tanto en la infectividad como en la intensidad de infección, se observaron tras la inoculación de ratones lactantes con ooquistes mantenidos en oscuridad en presencia de H₂O₂. En los ensayos realizados bajo radiación solar simulada en presencia/ausencia de H₂O₂, se anuló la infectividad ooquística después de 5 horas de exposición. Los resultados demuestran que la incorporación de este oxidante supone una mejora del método SODIS al reducir notablemente el tiempo de exposición necesario para lograr la inactivación de los ooquistes de *C. parvum*.

APÉNDICE

Tampón fosfato salino (PBS) 0,04 M pH 7,2

Fosfato monopotásico (Sigma-Aldrich Co.) 0,04M	5,65 g/l	76 ml
Fosfato disódico (Sigma-Aldrich Co.) 0,04M	5,44 g/l	24 ml
Cloruro sódico (Sigma-Aldrich Co.) 0,04M	2,34 g/l	100 ml

Ajustar a pH 7,2 y conservar a temperatura ambiente

Gradiente de cloruro de cesio (CICs)

Inicialmente, se preparan dos soluciones de CICs (A) y Tris EDTA (B):

- Solución A: se disuelve CsCl (Sigma-Aldrich Co.) en agua destilada en una concentración de 1,8 g/ml. Se agita suavemente hasta la completa disolución de la sal, aproximadamente en una hora.
- Solución B: consiste en una solución tampón Tris elaborada a partir de Tris 50 mM y EDTA 10 mM en agua destilada [Tris (Sigma-Aldrich Co.): 6,055 g/l; EDTA (Sigma-Aldrich Co.): 2,923 g/l, pH 7,2].

A partir de estas dos soluciones, se preparan tres soluciones de CICs de distinta densidad:

	Densidad (g/ml)	Solución A (ml)	Solución B (ml)
Solución 1	1,40	4,0	4,0
Solución 2	1,10	3,0	21,0
Solución 3	1,05	1,5	22,5

Solución verde malaquita al 0,16%

Verde malaquita (Sigma-Aldrich Co.)	0,16 g
Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich Co.)	0,10 g
Agua destilada	100 ml

Tampón TAE 1x (Bio-Rad Laboratories)

Tris 40mM
 Ácido acético 20mM
 EDTA 1mM, pH 8,3

Solución de trabajo de ioduro de propidio (IP)

IP (Sigma-Aldrich Co.)	1 mg
PBS 0,1M pH 7,2	1 ml

Líquido de digestión

Pepsina (Sigma P-7125)	0,05 g
Cloruro sódico	0,09 g
Agua destilada	10 ml
Ácido clorhídrico concentrado	70 µl

Preparación extemporánea. Atemperar a 37 °C antes de su empleo

Bicarbonato sódico al 2,2%

Bicarbonato sódico	2,2 g
Agua destilada csp	100 ml

Conservar a temperatura ambiente

