

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y MUTAGÉNICO DE LA TECNOLOGÍA
PCFH UTILIZADA PARA EL TRATAMIENTO Y DESINFECCIÓN DE AGUAS
SUPERFICIALES

ORLANDO FERNEY CASTRO MENESES

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y MUTAGÉNICO DE LA TECNOLOGÍA
PCFH UTILIZADA PARA EL TRATAMIENTO Y DESINFECCIÓN DE AGUAS
SUPERFICIALES

ORLANDO FERNEY CASTRO MENESES

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Biólogo

Asesor:

DOLLY M. REVELO ROMO

Magister en Ciencias Biológicas

Co-asesor:

Bióloga ALEJANDRA ORDOÑEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2019

“Las ideas y conclusiones aportados en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Directora

Dolly Margoth Revelo Romo

Co-Directora

Leidy Alejandra Ordoñez Ordoñez

Jurado

Jaqueline Mena Huertas

Jurado

Jaime de Jesús Calle Osorno

San Juan de Pasto, 8 de febrero de 2019

El presente trabajo de investigación lo dedico principalmente a mi familia, por ser la inspiración y darme la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados. Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. También a todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia por su incondicional apoyo: principalmente a mis madres Margarita, Lucy y Yolanda por ser las principales promotoras de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado.

A mis asesores Dolly Revelo y Alejandra Ordoñez, por su apoyo, paciencia, motivación y por su total disposición y ayuda para la construcción de este trabajo.

A los Jurados Jaqueline Mena Huertas y Jaime de Jesús Calle Osorno por sus aportes y por el tiempo que le dedicaron a la revisión del documento.

Al grupo de investigación en materiales funcionales y catálisis (GIMFC), en especial a su director Dr. Alejandro Galeano.

Al grupo de investigación de Biología de Sistemas Facultad de Medicina de la UPB, especialmente a la Dra. Isabel Cristina Ortiz por sus consejos y sugerencias durante el proceso de laboratorio y sus valiosos aportes en mi formación profesional.

A Maritza Londoño, por su apoyo y acompañamiento en la fase de laboratorio.

A mis amigos. Con todos los que compartí dentro y fuera de las aulas. Aquellos amigos, que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por todo su apoyo y alegría.

A aquellas personas que ya no nos acompañan físicamente pero siempre estarán en nuestro corazón.

Al departamento de Biología, su planta docente y trabajadores, que aportaron en mi crecimiento profesional y personal.

Y por supuesto a mi querida Universidad de Nariño, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias.

RESUMEN

Uno de los problemas para garantizar la calidad en el agua de consumo son los métodos clásicos de desinfección ya que resultan ser en ciertos casos ineficientes pudiendo resultar en problemas patológicos debido a la formación de subproductos de desinfección, los Procesos de Oxidación Avanzados (POAs) surgen como una de las mejores alternativas en este campo debido a su eficiencia en el proceso de desinfección del agua; pero es indispensable estudiar los posibles efectos mutagénicos y genotóxicos que puedan tener las aguas superficiales tratadas bajo estas nuevas alternativas, sobre la salud del consumidor. Este trabajo contribuye en este campo ya que su objetivo principal fue evaluar el efecto genotóxico y/o mutagénico de 6 muestras de agua superficial de 3 municipios (Ipiales, Pasto y Túquerres) y 3 veredas (Chaguaipe, Charandú y La Orejuela) del departamento de Nariño tratadas con la tecnología de Peroxidación Catalítica en Fase Húmeda (PCFH), mediante el Test de Ames y el ensayo cometa. Para evaluar el efecto mutagénico y genotóxico se tuvo en cuenta el número de colonias revertantes y el índice de mutagenicidad (IM) y para el efecto genotóxico la longitud de la cola del cometa. Los resultados mostraron que las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH no presentaron efectos citotóxicos según los resultados del ensayo de MTT, por otra parte, según el IM que fue superior a 2 para 3 de las 6 muestras evaluadas, indicó que las muestras de Pasto, Ipiales y Chaguaipe si presentaron un efecto mutagénico, así mismo el ensayo cometa indicó que las muestras de Pasto y Charandú tuvieron un efecto genotóxico. Concluyendo que la aplicación de la tecnología PCFH va a tener efectos diferentes sobre las aguas dependiendo de su procedencia y características fisicoquímicas iniciales.

Palabras Clave: Aguas superficiales, COT, Tecnología PCFH, Test de Ames, Ensayo Cometa, mutagenicidad, genotoxicidad.

ABSTRACT

One of the main issues to guarantee the quality of drinking water are the classic disinfection methods, since in some cases they can be inefficient, resulting in pathological problems due to the formation of disinfection by-products. Advanced Oxidation Processes are one of the best alternatives in this field as they are more efficient for water disinfection processes; however, it is fundamental to study the potential mutagenic and genotoxic effects that surface waters treated by these alternatives may have. In this study is a contribution in the field since its main objective was to evaluate the genotoxic and/or mutagenic effect in 6 surface water samples from 3 municipalities (Ipiales, Pasto and Túquerres) and 3 villages (Chaguaipe, Charandú and La Orejuela) from the department of Nariño, treated with Catalytic Wet Peroxide Oxidation - CWPO, by means of the Ames Test and Comet assay. In order to evaluate the mutagenic and genotoxic effect, the number of revertant colonies and the mutagenicity index (IM) were taken into account and for the genotoxic effect the length of the tail of the comet. The results of the water samples treated with the CWPO technology do not present cytotoxic effects according to the results of the MTT test, on the other hand according to the IM that was higher than 2 for 3 of the 6 samples evaluated, the responses of Pasto, Ipiales and Chaguaipe if a mutagenic effect occurs, as well as the comet assay that the samples from Pasto and Charandú had a genotoxic effect. Concluding that the application of the PCFH technology will have different effects on the waters of its procedure and initial physicochemical characteristics.

Keywords: Surface water, TOC, PCFH technology, Ames test, Comet assay, mutagenicity, genotoxicity.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTAS DE ANEXOS.....	13
1 INTRODUCCIÓN.....	14
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
3 JUSTIFICACIÓN	19
4 OBJETIVOS.....	21
5 MARCO TEÓRICO.....	22
5.1 Calidad y Métodos de Tratamiento del Agua.....	22
5.2 Métodos de Tratamiento del Agua.....	24
5.2.1 Métodos Clásicos de desinfección del agua	26
5.2.2 Procesos de Oxidación Avanzada (POAs)	27
5.3 Genotoxicidad y Mutagenicidad.....	29
5.3.1 Determinación de la Genotoxicidad y Mutagenicidad.....	31
6 ANTECEDENTES	36
7 METODOLOGÍA.....	39
7.1 Área de estudio	39
7.2 Test Catalítico para la obtención de las muestras	39
7.3 Determinación de Genotoxicidad mediante el uso de ensayos <i>in vitro</i>	41

7.3.1	Ensayo de mutagenicidad.....	42
7.3.2	Ensayo de genotoxicidad.....	44
7.4	Diseño y Análisis de Datos Estadístico.....	47
8	RESULTADOS	49
8.1	Determinación de la eliminación de contaminantes y peróxido de hidrógeno reaccionante.....	49
8.2	Determinación de Genotoxicidad mediante el uso de ensayos <i>in vitro</i>	51
8.2.1	Ensayo de mutagenicidad.....	51
8.2.2	Ensayo de genotoxicidad.....	55
9	DISCUSIÓN.....	59
9.1	Determinación de la eliminación de contaminantes y peróxido de hidrógeno reaccionante.....	59
9.2	Determinación de Genotoxicidad y Mutagenicidad mediante el uso de ensayos <i>in vitro</i> 60	
9.2.1	Ensayo de mutagenicidad.....	60
9.2.2	Ensayo de genotoxicidad.....	63
	CONCLUSIONES	68
	RECOMENDACIONES	69
	REFERENCIAS.....	70
	ANEXOS	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 <i>Genotipos de las cepas TA usadas en los ensayos de mutagénesis.</i>	34
Tabla 2 <i>Muestras de agua superficial tratadas con la tecnología PCFH, con que las que se trabajó en los diferentes ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad.</i>	41
Tabla 3 <i>Interpretación de la longitud del cometa.</i>	47
Tabla 4 <i>Condiciones de la tecnología PCFH bajo las que fueron tratadas las aguas y resultados de eliminación de carbono orgánico total.</i>	49
Tabla 5 <i>Número de colonias revertantes para las cepas TA98 y TA100 de S. typhimurium sin activación metabólica.</i>	52
Tabla 6 <i>Índice de mutagenicidad para las cepas TA98 y TA100 de S. typhimurium sin activación metabólica.</i>	54
Tabla 7 <i>Resultados del efecto genotóxico de las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH, según ensayo cometa.</i>	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Porcentaje de eliminación de contaminantes, en muestras Provenientes del departamento de Nariño, tratadas con la tecnología PCFH.....50
- Figura 2** Caja de 96 pozos con resultados de ensayo MTT, la línea celular usada fue HepG2....56

LISTAS DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.</i>	85
Anexo 2. <i>Protocolo Para confirmación de marcas de Salmonella typhimurium</i>	91
Anexo 3. <i>Diluciones seriadas utilizadas en los ensayos.</i>	93
Anexo 4. <i>Resultados Análisis Fisicoquímico de las muestra de agua y COT antes y después de ser tratadas con la tecnología PCFH.</i>	99
Anexo 5. <i>Preparación de soluciones stock y de trabajo Test de Ames.</i>	100

1 INTRODUCCIÓN

El agua es el recurso más importante para el desarrollo de la vida, además para el hombre ha adquirido una connotación política, económica y social (González, 2014). América cuenta aproximadamente con un 39 % del agua dulce mundial y en América Latina la disponibilidad per cápita de agua es mayor a 28000 litros; a pesar de ello, una de cada cinco personas no tiene acceso al agua potable por lo tanto, enfermedades y muertes se podrían evitar con la mejora y saneamiento del suministro del agua (González, 2014). Para Colombia el panorama no es diferente, 2600 niños entre los 1 y 5 años mueren anualmente a causa de enfermedades relacionadas con la calidad del agua; la mayoría de la población del país carece de un servicio de agua potable o sin riesgo para el consumo humano, debido a la capacidad económica de cada municipio, ya que a mayor poder adquisitivo mejores condiciones en la distribución y calidad del agua dejando a los municipios más pobres con condiciones precarias en este servicio (Yáñez & Acevedo, 2013).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene para el hombre el recibir un suministro de agua de calidad, se han identificado ciertos factores que inciden en la calidad del líquido tales como: pH, color, turbiedad y el proceso de desinfección que aún no está del todo estandarizado; aunque la cloración es una técnica de desinfección muy difundida, aún no se ha esclarecido su verdadera naturaleza desinfectante lo que se ve reflejado en los porcentajes de bacterias y virus que persisten en el agua (Guzmán, Nava, & Dias, 2015). Además, en el mundo diversos estudios demuestran los problemas de salud pública que desencadenan del manejo inadecuado de esta técnica, debido a la formación de subproductos de desinfección que tienen efectos sobre el material genético y la salud de los consumidores (Olmedo Sánchez, 2008; Francis, Small, & VanBriesen, 2009).

Debido a esta situación se adelantan investigaciones acerca de nuevas alternativas tecnológicas para eliminación de contaminantes, entre las cuales se destacan los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs), que surgen como una de las mejores opciones de desinfección del agua ya que muestran buenos rendimientos y resultados mucho más favorables que los métodos clásicos de desinfección (Ghauch, 2017). El fundamento de los POAs es la generación de radicales, principalmente hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), los cuales son los encargados de oxidar la materia orgánica (Legrini, Oliveros, & Braun, 1993). Dentro de las POAs se encuentra la Peroxidación Catalítica en Fase Húmeda (PCFH) este tipo de procesos permiten la generación de los radicales con niveles de pH, temperatura y presión variables, eligiendo aquellas condiciones que generan los mejores rendimientos, esto debido a que los radicales se generan por una reacción entre el H_2O_2 y el Fe activo que se encuentra en un catalizador solido que sirve como contenedor o soporte del metal, este proceso también es conocido como Fenton Heterogéneo (Herney-Ramirez, Vicente, & Madeira, 2010).

Con base en lo anterior el grupo de investigación en Materiales Funcionales y Catálisis (GIMFC) de la Universidad de Nariño adelanta estudios de un tipo de POA denominado la PCFH para el tratamiento de aguas superficiales de nuestra región. En consecuencia, en esta investigación se pretendió establecer si el agua superficial tratada con la tecnología PCFH podría tener algún potencial genotóxico y/o mutagénico, esto se logró analizando el potencial premutágeno o mutagénico y/o genotóxico del agua superficial tratada por PCFH, mediante el uso de pruebas como el test de Ames y el ensayo cometa que evalúan la inocuidad de las aguas superficiales tratadas con la tecnología de desinfección en mención.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El crecimiento poblacional acelerado ha conllevado a diversos problemas de tipo ambiental tales como, la degradación de los recursos naturales, la acumulación de residuos, la contaminación, el cambio climático y el aumento progresivo de la demanda de agua, siendo este último de preocupación e interés a nivel socioeconómico, científico y ambiental (Guttman, García, Cuervo, & Arango, 2001; DANE, 2009). A pesar de que en Colombia la oferta hídrica es alta, recibir agua potable es un derecho constitucional y pese a que la legislación establece criterios mínimos que debe cumplir el agua que va a ser destinada para consumo humano, aún se puede observar que existen falencias tanto en la distribución de este recurso como en la calidad del mismo (García, y otros, 2001; Pérez vidal, Torres Lozada, & Cruz Vélez, 2009; Campuzano, Roldán Pérez, Guhl Nanneti, & Sandoval Pedroza, 2012).

El problema en la calidad del agua puede deberse al uso de técnicas y tecnologías convencionales en el tratamiento del agua, entre los más utilizados están los métodos fisicoquímicos y dentro de estos, la cloración aparece como uno de los procedimientos más difundidos y aceptados en el mundo, pero esta técnica bajo ciertas circunstancias genera subproductos de desinfección (SPDs) como trihalometanos y ácidos acéticos halogenados, que tienen un impacto ambiental y de tipo tóxico y mutagénico (Calderón, y otros, 2002; Sánchez Zafra, 2008; Hernández Sánchez, y otros, 2011). En este sentido las nuevas tecnologías para el tratamiento de agua surgen como una alternativa a los métodos convencionales, entre las más promisorias se encuentran los POAs (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012), dentro de los cuales se incluye la tecnología PCFH basada en la reacción de Fenton. En este proceso se generan una serie de radicales oxidantes como por ejemplo, radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) e hidroperoxil ($\bullet\text{HO}_2$) que son capaces de oxidar materia orgánica de tipo químico o biológico, logrando así la

desinfección del agua (Castillo Ledezma, López-Malo Vigil, & Bandala, 2010; Rubio-Clemente, Chica, & Peñuela, 2014).

En Colombia el Grupo de Investigación en Materiales Funcionales y Catálisis (GIMFC) de la Universidad de Nariño en su proyecto financiado por el Sistema General de Regalías:

“Desarrollo y Aplicación de la Tecnología de Oxidación Avanzada PCFH para Mejorar la calidad del Agua Potable en el Departamento de Nariño” (SGR – Agua Potable), es pionero implementando la tecnología PCFH heterogénea, cuyo fundamento en este caso es la utilización de arcillas pilarizadas como soportes para metales de transición que incluyen óxidos mixtos de aluminio (Al) y hierro (Fe), los cuales descomponen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para la formación de los radicales oxidantes. El objetivo principal de este proyecto es desarrollar a nivel de prototipo piloto la tecnología PCFH y evaluar su potencial para mejorar la calidad del agua potable en el Departamento de Nariño.

Sin embargo, por ser una nueva tecnología a implementarse para el tratamiento de aguas de consumo, se desconocen los posibles efectos tóxicos que se puedan presentar, debido al riesgo inherente de los POAs de generar productos potencialmente más estables, menos biodegradables o biotóxicos (Lv, y otros, 2015). Por ello, es imprescindible que cada vez que se implemente un POA se evalúe y demuestre que esta nueva tecnología aplicada al tratamiento y desinfección del agua no genere ningún subproducto potencialmente peligroso y el agua de consumo sea totalmente segura (Grisales, Ortega López, & Rodríguez Chaparro, 2012; Karci, Arslan-Alaton, Bekbolet, Ozhan, & Alpertunga, 2014). Por lo tanto, en el Proyecto SGR – Agua Potable, existe la necesidad de evaluar los niveles de toxicidad del agua superficial tratada por la tecnología PCFH que está siendo optimizada por primera vez en el proyecto; en este contexto, se emplean bioensayos para evaluar los niveles de toxicidad de contaminantes blanco y de matrices de agua

complejas (Iqbal & Nisar, 2015), entre estos bioensayos se destacan los de genotoxicidad, que consisten en evaluar los agentes genotóxicos responsables de actuar directa o indirectamente sobre el material genético, los cuales se constituyen en factores de riesgo primario que generan efectos crónicos o a largo plazo, tales como, mutagénico, carcinogénico o teratogénico (Villanueva, Kogevinas, & Grimalt, 2001a; Tobón & López, 2011; Kocak, 2015).

En este sentido la presente propuesta de investigación se fundamenta en el desconocimiento y la carencia de estudios científicos relacionados con la evaluación del potencial efecto genotóxico y/o mutagénico de las aguas superficiales tratadas con la tecnología PCFH.

Pregunta de Investigación

¿El agua superficial tratada con la tecnología PCFH en el Departamento de Nariño presenta potencial genotóxico y/o mutagénico en función al daño del material genético?

3 JUSTIFICACIÓN

Se ha comprobado que las nuevas tecnologías utilizadas en el tratamiento de aguas son mucho más seguras que las técnicas convencionales y los subproductos que se forman no son potencialmente dañinos para la salud humana, es así como se muestra en la literatura que los POAs tales como, O₃, TiO₂/UV, radiación solar, electro-Fenton, oxidación por aire húmedo, UV/electro-Fenton, Foto-Fenton, O₃/UV, TiO₂ basada en fotocatalisis, H₂O₂/UV y TiO₂/H₂O₂/UV muestran considerable reducción de la toxicidad (Iqbal & Nisar, 2015). Sin embargo, es importante aportar conocimiento al Proyecto SGR – Agua Potable sobre la genotoxicidad de las aguas superficiales tratadas por la tecnología PCFH optimizada bajo propias condiciones del proyecto, y sobre la cual no se ha informado previamente en la literatura científica, por ello el impacto de esta investigación sería conocer si el agua superficial tratada con esta tecnología al igual que los otros POAs mencionados reduce la toxicidad o por el contrario, presenta problemas para la salud humana.

A este respecto es importante monitorear los efluentes tratados con la tecnología PCFH, usando ensayos de genotoxicidad para entender la eficiencia biológica de este método de tratamiento y como herramienta para efectuar un control a nivel genético de la matriz de agua tratada por la tecnología PCFH, esto debido a que el proyecto SGR – Agua Potable es pionero en el país en introducir esta novedosa tecnología y teniendo en cuenta que se desconocen los efectos de la misma, razón suficiente para adelantar este trabajo de investigación. Por lo tanto, es necesario verificar si el agua tratada con esta nueva tecnología afectaría de forma directa el material genético de los consumidores de las mismas. Para el monitoreo de la genotoxicidad es necesario la realización de una batería de pruebas que permitan integrar determinados factores que entreguen una información relevante sobre la actividad de la sustancia en estudio, se considera

que dicha batería debe por lo menos tener dos ensayos de este tipo y entre los más recomendados se encuentran el test de Ames y otros que involucran un análisis de metafases en células eucariotas (linfocitos humanos o líneas celulares), cubriendo de este modo los tipos de daño que puede provocar el compuesto analizado (mutaciones génicas y/o daño cromosómico) (Repetto, del Peso, & Zurita, 2012).

Si se logra establecer que el agua es apta para el consumo humano, la tecnología PCFH constituiría una alternativa ampliamente viable para implementarse tanto a nivel regional como nacional asegurando de esta forma que cada habitante del país reciba un agua de excelente calidad, reduciendo de esta manera las desigualdades que existen en el país en lo referente a calidad del líquido.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto genotóxico y/o mutagénico del agua superficial tratada con la tecnología de Peroxidación Catalítica en Fase Húmeda - PCFH.

Objetivos Específicos

- Establecer por medio del test de Ames si el agua superficial tratada con la tecnología PCFH tiene efecto premutágeno y/o mutágeno.
- Determinar si el agua superficial tratada con la tecnología PCFH causa daño al material genético de las células eucariotas.

5 MARCO TEÓRICO

Del agua que se puede aprovechar para las actividades humanas (agua dulce) tan solo el 0,007% se encuentra disponible para satisfacer las necesidades del hombre, la mayoría de los recursos de agua dulce del planeta se concentran en sólo seis países: Brasil, Rusia, Canadá, EE.UU., China e India y el 27% de las aguas dulces de la Tierra corresponden a los aportes de cinco grandes cuencas de aguas: Amazonas, Ganges-Brahmaputra, Congo, Yangtzé y Orinoco (Toledo, 2002). En Colombia existen cinco vertientes o áreas hidrográficas que caracterizan el territorio nacional continental, distribuidas así: Amazonas, Orinoco, Caribe, Pacífico y Magdalena- Cauca (IDEAM, 2013). Se debe tener claro que el agua es un recurso limitado y este ofrece un gran número de usos que no siempre son compatibles entre sí, en Colombia los usos para los que se destina el recurso hídrico se distribuyen de la siguiente manera: sector agrícola 55%, energía 20%, doméstico y acuícola cada uno 7%, pecuario 6%, industria 4% y servicios 1% (Campuzano, Roldán Pérez, Guhl Nanneti, & Sandoval Pedroza, 2012). Sin embargo, estos mismos autores recalcan en que estos datos no son del todo verídicos debido a que no se cuenta con un registro histórico y esto hace imposible medir de manera real la demanda y consumo del recurso por sector.

Bajo este panorama se hace imprescindible que el agua para consumo humano cumpla con algunos criterios mínimos que aseguren la inocuidad del líquido garantizando que al momento de consumirlo no genere ningún problema de salud a las personas, esto es posible cumpliendo unos mínimos de calidad para el agua.

5.1 Calidad y Métodos de Tratamiento del Agua

El término calidad del agua puede interpretarse de formas muy subjetivas pero en general se espera que un agua de calidad no contenga organismos ni sustancias químicas que puedan tener

algún efecto patógeno para los humanos (Ministerio de Medio Ambiente. Secretaría de Estado de Aguas y Costas. Dirección General de Obras Hidráulicas y Calidad de las Aguas., 2000).

Estéticamente el agua debe ser incolora e inodora y no debe tener ningún sabor, en otros términos debe ser segura para el hombre (WHO, 2011). A nivel internacional es imperativo que la población mundial sin excepción alguna tenga acceso a una fuente segura de agua y por ello se aborda este tema y se desarrollan estrategias desde diversas visiones todas encaminadas al cumplimiento de este objetivo (Hailu & Tsukada, 2009).

En Colombia para el caso puntual del agua potable para consumo humano esta debe cumplir con ciertas características físicas, químicas y microbiológicas que aseguren que ésta no genere ningún riesgo sobre la salud humana, por ello en el Artículo 12 del Decreto 1575 de 2007 (Ministerio de la Protección Social, 2007), por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano, se define el Índice de Riesgo de la Calidad del Agua para Consumo Humano (IRCA), como el grado de riesgo de ocurrencia de enfermedades relacionadas con el no cumplimiento de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para consumo humano. Por su parte, en la Resolución 2115 de 2007 (Ministerio de la Protección Social & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial), se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano, en su Artículo 15 presenta la Clasificación del Nivel de Riesgo, y se establecen los rangos del IRCA y el nivel de riesgo correspondiente siendo entre:

0% - 5% Sin Riesgo: Agua Apta para Consumo Humano

5.1% - 14% Riesgo Bajo: Agua no apta para consumo humano, susceptible de mejoramiento.

14.1% - 35% Riesgo Medio: Agua no apta para consumo humano, y gestión directa de la persona prestadora.

35.1% - 80% Riesgo Alto: Agua no apta para consumo humano y requiere una vigilancia especial.

80.1% - 100% Riesgo Inviabile sanitariamente: Agua no apta para consumo humano y requiere una vigilancia máxima, especial y detallada.

Si se hace una revisión desde el índice IRCA en el país existe la necesidad de mejorar la calidad del agua pues la mayoría de habitantes, a excepción de aquellos que viven en grandes y medianos centros urbanos, consumen aguas con niveles de riesgo medio y en ciertos casos agua con un nivel de riesgo alto, para el año 2016 (Ministerio de Salud y Protección Social, Subdirección de Salud Ambiental, 2018). En el mismo informe Nariño aparece como uno de los cuatro departamentos que presentan un nivel de riesgo alto según clasificación IRCA, indicando que el 84.4 % de la población nariñense consumió agua con riesgo alto, lo que demuestra una baja en la calidad del agua que se distribuye en el Departamento. Teniendo en cuenta lo anterior es necesario conocer acerca de los métodos de tratamiento y potabilización que se tienen al alcance para poder inferir cuales son las posibles causas que están desencadenando esta problemática.

5.2 Métodos de Tratamiento del Agua

El empleo de un tratamiento de agua en particular se elige dependiendo de las condiciones que tenga el agua cruda, el objetivo principal de tratar el agua es mejorar la calidad del líquido removiendo bacterias y elementos nocivos, las concentraciones elevadas de compuestos orgánicos, protozoarios y otros microorganismos, corrigiendo color, olor, sabor y turbiedad

(Romero, 2008). Dentro de los procesos comunes que intervienen en la potabilización de agua se encuentra la coagulación, la floculación, la sedimentación, la filtración, y la desinfección, los cuatro primeros son procesos físicos y el último involucra agentes químicos (Leal Ascencio, 2005; Romero, 2008).

La coagulación es el proceso de desestabilización de los coloides, esto se logra anulando las cargas eléctricas, para ello, se utilizan reactivos químicos que tienen la propiedad de producir coagulación generalmente sales de aluminio o hierro y se involucran una serie de etapas como lo son: hidrólisis de los coagulantes y desestabilización de las partículas existentes en la suspensión, precipitación y formación de componentes químicos que se polimerizan, adsorción de las cadenas poliméricas en la superficie de los coloides, adsorción mutua entre los coloides y acción de barrido (Lorenzo-Acosta, 2006). Con la floculación se consigue agregar las partículas coloidales desestabilizadas (aunque no es necesario que fuesen ex-coloides), la agregación se ve facilitada si las partículas se ponen en contacto (mediante la mezcla) y si hay algo que cree enlaces entre ellas y mantenga ese contacto (adición de floculantes). Entre los floculantes más usados se encuentran los polímeros, vale la pena mencionar que el proceso de formación de enlaces y agregados es lento (Lorenzo-Acosta, 2006).

La sedimentación se utiliza en la potabilización del agua, para reducir la cantidad de partículas no deseadas, este es un fenómeno netamente físico y constituye uno de los procesos utilizados en el tratamiento del agua para conseguir su clarificación y se basa en la ley de Stokes que dice que las partículas de mayor diámetro y/o mayor peso específico que el líquido son más fáciles de sedimentar, así también una menor viscosidad del líquido logra una mejor sedimentación (Oliva Uc, Giacoman Vallejos, & Pérez Cortés, 2008; Delgado-Linares, y otros, 2013). La filtración se considera un paso complementario a la sedimentación aquí se retiran los sólidos muy finos,

material soluble y microorganismos, mediante el uso de filtros o membranas que contienen capas de arena o antracita, grava clasificada o materiales sintéticos que permiten la formación de poros dejando que pase el agua pero no los contaminantes; esto reduce, progresivamente el caudal que pasa a través del filtro de ahí que es necesario que los filtros sean limpiados periódicamente (Chulluncuy Camacho, 2011).

Por último el proceso de potabilización del agua se complementa con la desinfección que se usa sólo para destruir microorganismos patógenos, aunque en muchos casos esto no significa la destrucción total de los microorganismos, para ello se usa un agente desinfectante, en este proceso puede haber destrucción de las formas vegetativas, pero no obligatoriamente de las esporuladas (Chulluncuy Camacho, 2011).

5.2.1 Métodos Clásicos de desinfección del agua

Entre los agentes químicos de desinfección más utilizados, se destacan el cloro en todas sus variantes y también se utiliza extensamente la luz ultravioleta (Leal Ascencio, 2005). Estos procesos son relativamente económicos y de fácil manejo pero se sabe que generan subproductos de desinfección (SPDs) tales como halometanos, ácidos haloacéticos, haloacetnitrilos, halocetonas, halonitrometanos, haloaldehídos, haloacetaldehidos y furanonas halogenadas que están asociados a ciertas patologías (Francis, Small, & VanBriesen, 2009).

La cloración es una de las técnicas más difundidas y empleadas para la desinfección del agua, el uso del cloro como agente desinfectante empezó a principios del siglo XX, los productos del cloro más habituales para realizar la desinfección del agua son: cloro gaseoso, hipoclorito sódico e hipoclorito cálcico, al añadir el cloro al agua se obtiene como productos ácido hipocloroso (HClO) y ácido clorhídrico (HCl), el HClO , se ioniza o se disocia en iones hidrógeno (H^+) e hipoclorito (OCl^-), el ácido hipocloroso y los iones hipoclorito son los que realizan la

desinfección y su eficacia dependerá de la proporción de HClO y OCl⁻, resultando en una relación directamente proporcional y, por lo tanto, esta eficacia se reduce a altos valores de pH (García-Villanova, 2016). A pesar de su relativo bajo costo y facilidad de implementación esta técnica presenta falencias ya que el cloro reacciona con precursores orgánicos del agua y genera una mezcla compleja de subproductos organoclorados principalmente trihalometanos (THMs) que desencadenan en problemas de salud y que están asociados al cáncer de vejiga (Villanueva, Kogevinasa, & Grimalt, 2001b; Olmedo Sánchez, 2008). Por ello el agua que sufre un proceso de cloración expone a los consumidores a un riesgo potencial de padecer cáncer ya que puede existir una relación causal entre la desinfección del agua con cloro y efectos negativos sobre la salud humana a largo plazo (Sánchez Zafra, 2008). Además, el cloro como desinfectante tiene una eficacia limitada frente a la eliminación de bacterias, protozoos, virus patógenos al igual que con quistes protozoarios (Doménech, 2004; Costa Miranda, y otros, 2016).

5.2.2 Procesos de Oxidación Avanzada (POAs)

Se han desarrollado métodos modernos de tratamiento de las aguas que se denominan Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) o Tecnologías de Oxidación Avanzada (TOAs), los cuales involucran la generación “in situ” de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), estos radicales tienen un alto potencial redox y son capaces de destruir e incluso de mineralizar cualquier contaminante orgánico (Legrini, Oliveros, & Braun, 1993; Sanz, Lombraña, & de Luis, 2013). Las POAs involucran el uso de agentes oxidantes como: ozono (O_3), ozono/peróxido de hidrógeno ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), ozono/catalizador ($\text{O}_3/\text{catalizador}$), ultravioleta/ozono (UV/ O_3), ultravioleta/peróxido de hidrógeno (UV/ H_2O_2), ozono /ultravioleta/peróxido de hidrógeno ($\text{O}_3/\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$), Hierro/peróxido de hidrógeno ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) y fotocátalisis (UV/ TiO_2), entre otros (Ghauch, 2017).

Estas tecnologías prometen estar entre los métodos más eficientes para la remoción de contaminantes del agua, debido a que comúnmente no generan subproductos tóxicos y/o potencialmente patógenos, la eliminación de organismos resistentes incluidos protozoos y bacterias formadoras de endosporas y su reducción en costos y tiempos de los tratamientos (Sanchez, y otros, 2015; Guimarães, Guadagnini, Bueno Franco, & Urbano dos Santos, 2016). Otras de las ventajas de estas nuevas tecnologías frente a los métodos convencionales para el tratamiento de aguas son que transforman y destruyen químicamente el contaminante hasta la mineralización, en general, no generan subproductos que requieran posterior procesamiento, los reactivos utilizados como oxidantes son sustancias que se descomponen durante el proceso en productos al final inocuos, son muy útiles para eliminar contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, principalmente el biológico, operan en rangos donde los sistemas convencionales no son factibles, son ideales para preparar las corrientes a tratamientos convencionales y aumentan la biodegradabilidad (Forero, Ortiz, & Rios, 2005; Miklos, y otros, 2018). La eficiencia de estas técnicas se debe en gran medida a la participación del radical hidroxilo, que proporciona procesos termodinámicamente más favorables y velocidades de oxidación superiores, en comparación con otros métodos de oxidación, además, este radical es capaz de atacar prácticamente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar cientos a miles de veces más rápido que oxidantes alternativos como el ozono (Li, Xu, Zhu, Ding, & Mahmood, 2010).

La reacción Fenton o proceso de oxidación Fenton surge como una de las mejores alternativas dentro de las POAs para el tratamiento de las aguas, este proceso consiste en la adición de sales de hierro (Fe^{+2}) en presencia de H_2O_2 , en medio ácido, para la formación de radicales $\bullet\text{OH}$, además, se generan radicales perhidroxilo ($\bullet\text{HO}_2$), los cuales inician una reacción de oxidación

en cadena para eliminar la materia oxidable después de que el Fe^{+2} descomponga al H_2O_2 ; los radicales $\bullet\text{OH}$ siguen reaccionando con el Fe^{+2} remanente en disolución, hasta que éste se convierte totalmente a Fe^{+3} además de oxidar a la materia orgánica presente (Salas C., 2010), la efectividad y el rendimiento del proceso Fenton depende, entre otros factores, de la concentración del agente oxidante y catalítico, temperatura, pH y tiempo de reacción, influencia del tipo de contaminante e influencia del tipo de aniones (Rubio-Clemente, Chica, & Peñuela, 2014). Una variante de esta técnica es la Peroxidación catalítica de materia orgánica en fase húmeda (PCFH) que tiene como fundamento la reacción Fenton y donde generalmente se emplean metales de transición, tales como el hierro y el cobre, como centros activos en el catalizador, los cuales descomponen homolíticamente el H_2O_2 para generar los radicales activos, pero el uso de arcillas pilarizadas como soportes de óxidos mixtos de Al y Fe son consideradas una buena alternativa, siendo estos metales los centros activos sobre los cuales se lleva a cabo más eficientemente la activación del H_2O_2 como agente oxidante parámetros (Galeano, Gil, & Vicente, 2011). Cabe resaltar que esta técnica presenta ciertas ventajas respecto a otras como son: que no generan lodos que requieran tratamiento y/o eliminación adicional, se puede trabajar a temperaturas y pH constantes, por lo que no es necesario manipular estos, inclusive se puede trabajar a un pH cercano al neutro (Galeano, Bravo, Luna, Vicente, & Gil, 2012).

5.3 Genotoxicidad y Mutagenicidad

Los agentes genotóxicos son agentes físicos (temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas, etc.) o químicos capaces de alterar la información genética celular (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009). Por consiguiente, la genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos. La mutagénesis se entiende como el proceso por el cual se genera una

mutación, y esta se define como un cambio hereditario en el material genético; la cancerogénesis o carcinogénesis se define como el fenómeno por el que un tejido normal genera el crecimiento de tejidos nuevos de forma anormal, diferentes al original, en ambos casos se puede ver una afectación por agentes externos que van a acelerar dichos procesos (Plošnik, Vračko, & Sollner Dolenc, 2016); y la teratogénesis o dismorfogénesis es la alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo que es detectada durante la gestación, en el nacimiento o con posterioridad (Pérez-Landeiro, Allende-Bandrés, Agustín Fernández, & Palomo Palomo, 2002).

La mayor parte de los genotóxicos se clasifican como procarcinógenos, porque requieren una biotransformación que los active para que reaccionen con el DNA; esta activación tiene lugar en el proceso de biotransformación fisiológica, dirigida a eliminar xenobióticos y predominantemente sucede durante su Fase I, que comprende aquellas biotransformaciones que aumentan la hidrosolubilidad del compuesto mediante la introducción de grupos o funciones de carácter polar, como OH^- , NH_2^+ , COH , COOH , SH^- , etc., que, además, por ser más reactivos, capacitan al compuesto para experimentar la fase siguiente; generalmente, de un mismo compuesto se derivan varios metabolitos, algunos de los cuales son más tóxicos que el compuesto original, aunque esto también se produce minoritariamente en la Fase II que está constituida por las reacciones de conjugación, en las que sustancias con los grupos polares aludidos se unen a reactivos endógenos para formar derivados aún más hidrosolubles; sólo en algunos casos, como en la acetilación de ciertas sulfamidas, el derivado es menos hidrosoluble y cristaliza en el riñón (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009). De las enzimas con capacidad activadora de procarcinógenos las más destacadas son las oxidorreductasas (citocromos P 450, flavinmonooxigenasas FMOs, alcohol deshidrogenasas ADHs, ciclooxigenasas COXs) y, en

ocasiones, las hidrolasas (epóxido hidrolasas EHs), los agentes genotóxicos, como compuestos alquilantes, especies reactivas de oxígeno, aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), aldehídos bifuncionales, etc., de origen exógeno o tras activación endógena, reaccionan con el DNA, al que se unen de forma covalente, para originar bases modificadas o aductos del DNA (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009).

5.3.1 Determinación de la Genotoxicidad y Mutagenicidad

Las pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad se usan para detectar si un compuesto o sustancia causa daño en el material genético por diferentes mecanismos, el estudio de las mutaciones genéticas se lleva a cabo mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, de complejidad variable, según el mecanismo biológico que se vaya a analizar, como un solo análisis no puede dar resultados sobre los efectos genotóxicos y mutágenos de una sustancia, es necesario combinar diferentes ensayos para poder clasificar la sustancia (Repetto, del Peso, & Zurita, 2012; Gleis, Schneider, & Schlörmann, 2016). Dentro de los ensayos recomendados por la OECD en sus guías para las pruebas de sustancias químicas se encuentran el Test de Ames (OECD, 1997) y el Ensayo Cometa (OECD, 2016).

Dentro de los ensayos *in vivo* uno de los más empleados, es el ensayo de Micronúcleos (MN) esta es una técnica utilizada para medir el daño en el DNA, citóstasis y citotoxicidad, comúnmente aplicada en linfocitos de sangre periférica, aunque puede ser realizada en cualquier célula nucleada, los MN son expresados en células en división que contienen rupturas de cromosomas por pérdida de los centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o pérdida de cromosomas completos, en ambos casos son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase de la división celular, en la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y, tanto los

cromosomas completos, como los fragmentos de cromosomas retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término de MN (Fenech, 2000; Ghosh & Godderis, 2016).

Dentro de las ventajas del MN se distinguen las siguientes: los micronúcleos en las células en interfase pueden ser contados más objetivamente que las aberraciones cromosómicas en estas mismas, no hay un requerimiento riguroso para el entrenamiento detallado del personal competente para este ensayo, esto permite mayor rapidez en el conteo de las preparaciones, además, como se pueden contar miles de células por tratamiento eso le imparte mayor poder estadístico al ensayo, por otra parte como los micronúcleos pueden contener cromosomas completos, se pueden detectar agentes inductores de aneuploidía, los cuales son muy difíciles de estudiar en el ensayo de aberraciones cromosómicas convencionales (Fenech, 2000; Bergamaschi, y otros, 2015).

5.3.1.1 Ensayos in vitro

Ensayo cometa: una metodología que ha sido ampliamente utilizada para evaluar el daño del material genético causado por agentes químicos, físicos, compuestos industriales y nuevas drogas es el ensayo cometa alcalino o electroforesis de células individuales – SCGE, por sus siglas en inglés (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) (Tice, y otros, 2000). Ésta es una técnica sensible que detecta rompimientos de cadena sencilla, sitios alcalilábiles y sitios de reparación por escisión de bases incompleta, las células con un incremento en su DNA dañado, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al DNA presentando una mayor migración del DNA hacia el ánodo o bien, una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las células normales, la

detección de la migración del DNA alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis, además se caracteriza, por su rápida realización (resultados en pocos días), el análisis de los datos a nivel de células individuales, que requiere un pequeño tamaño de muestra (pocas células), su flexibilidad y bajo costo y porque es aplicable a cualquier población de células eucariotas (Kiskinis, Suter, & Hartmann, 2002; Rodríguez-Rey, Noris-García, & Fundora Torres, 2016). Este método es cada vez más difundido en el mundo debido a las ventajas ya mencionadas y esto se ve reflejado en el aumento de investigaciones que emplean este método (Glei, Schneider, & Schlörmann, 2016).

Test de Ames: para evaluar la mutagenicidad generalmente se utiliza como indicador de actividad genotóxica de los compuestos a evaluar, el test de Ames (Mortelmans & Zeiger, 2000). La prueba utiliza diferentes cepas modificadas de bacterias generalmente *Salmonella typhimurium*, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura o por sustitución de pares de bases del DNA (Trossero, Caffarena, Hure, & Rizzotto, 2006). La prueba utiliza cepas de *S. typhimurium*, modificadas genéticamente que requieren histidina para crecer (son His⁻), a causa de las mutaciones causadas por la sustancia a evaluar la bacteria puede crecer en un medio libre de histidina, a estas colonias se les denomina revertantes, según el test de Ames una sustancia, natural o sintética, se considera mutagénica cuando el coeficiente de reversión, C.R., es mayor que 2. (C.R. = N° de colonias revertantes por placa ensayada/ N° de colonias revertantes por placa control -espontáneas-) (Trossero, Caffarena, Hure, & Rizzotto, 2006; Tejs, 2008).

Existen diferentes tipos de cepas que van a presentar diferencias en la mutación en el operón histidina, inicialmente se conocieron cuatro sets o conjuntos de cepas, set TA1535 (TA1535,

TA1536, TA1537, TA1538), set TA1530 (TA1530, TA1531, TA1532, TA1534), set TA1950 (TA1950, TA1951, TA1952, TA1964) y set TA1975 (TA1975, TA1976, TA1977, TA1978) (Ames, Lee, & Durston, 1973), posteriormente se desarrollaron dos nuevas cepas TA98 y TA100 (Tabla 1) (Ames, McCann, & Yamasaki, 1975). Además estas cepas tienen otras mutaciones con la finalidad de aumentar la capacidad para detectar mutágenos, por ejemplo la mutación rfa que causa mayor permeabilidad para las moléculas grandes en la pared celular de la bacteria esto debido a que se produce una síntesis defectuosa del lipopolisacárido (LPS) de la pared, la mutación uvrB es una delección de un gen que codifica para el sistema de reparación por escisión del DNA (Ames, Lee, & Durston, 1973). También pueden tener el plásmido pKM101 que tiene un marcador de resistencia a la ampicilina (Ames, McCann, & Yamasaki, 1975).

Tabla 1

Genotipos de las cepas TA usadas en los ensayos de mutagénesis.

Mutación Histidina				LPS	Reparación	Factor-R
hisD6610 his01242 = TA98	hisD3052	hisG46	hisG428 (pAQ 1)			
TA90 [TA91]	TA1538 [TA98]	TA1535 [TA100]	-	rfa	Δ uvrB	- R
-	TA1978	TA1975	-	rfa	+	- R
TA110	TA94	TA92	-	+	+	+ R
-	TA1534	TA1950	-	+	Δ uvrB	- R
-	-	TA2410	-	+	Δ uvrB	+ R
TA89	TA1964	TA1530	-	Δ gal	Δ uvrB	- R
-	TA2641	TA2631	-	Δ gal	Δ uvrB	+ R
-	-	-	[TA102]	rfa	+	+ R

Nota. Fuente: Adaptado de Maron & Ames (1983). Las cepas que se encuentran entre corchetes se recomiendan para ensayos de mutagénesis general. Todas las cepas se derivaron originalmente de *S. typhimurium* LT2. Los genes de tipo salvaje se indican con +. La delección (A) causada por *uvrB* también incluye los genes de nitrato reductasa (*chl*) y biotina (*bio*). Las cepas Δgal y *rfa/uvrB* tienen una sola delección a través de *gal chl bio uvrB*. Las cepas *Rfa* de reparación + tienen una mutación en *galE*. R = pKM101.

6 ANTECEDENTES

Respecto a estudios en evaluación de la genotoxicidad y mutagenicidad ambiental, las investigaciones en nuestro país se han enfocado más sobre el efecto del material particulado presente en el aire sobre el material genético como en el caso de Meléndez, Martínez, & Quijano (2012), Beleño, Quijano, & Meléndez (2013), Meléndez, Quijano, & Quijano, (2016), así como también estudios sobre como las diferentes sustancias (metales pesados, agroquímicos, insecticidas, vertimiento de aguas residuales domésticas e industriales, etc.) y que terminan en los afluentes por las actividades antrópicas generan daño sobre el material hereditario tal como se evidencia en los trabajos de Tobón & López (2011), Vivas y colaboradores (2014), Ramírez Vázquez, Paredes Xochihua, Pérez Mejía, & Jiménez Romero (2015).

En cuanto a estudios de genotoxicidad y mutagenicidad causada por los diferentes métodos de desinfección del agua se tiene que las investigaciones se han enfocado en determinar cuál es el efecto sobre el material genético que ejercen las aguas tratadas principalmente por el método de cloración como es el caso de Albaladejo y colaboradores (1995) quienes evaluaron la mutagenicidad de muestras de agua de consumo público en una localidad de España mediante el uso del test de Ames. En el 2004 se publica un trabajo en donde se evalúa la mutagenicidad de las aguas de consumo en Madrid (España) por medio del uso del test de reversión trp- en *Escherichia coli* (Granados, Albaladejo, Villanueva, Anadón, & Domínguez Rojas, 2004), en Colombia también se han realizado estudios para evaluar genotoxicidad y mutagenicidad de las aguas tratadas con cloro, en el departamento de Antioquia evaluaron la actividad mutagénica del agua antes y después del tratamiento en la planta potabilización (Meléndez, Zuleta, Marín, Calle, & Salazar, 2001; Zuleta, y otros, 2004), en el departamento de Norte de Santander específicamente en el municipio de Pamplona se evaluó mutagenicidad y genotoxicidad de aguas

antes y después de la cloración (Villamizar, Orozco, & Meléndez, 2014; Meléndez, Pardo, & Quijano, 2015).

Debido al uso constante de las POAs en diferentes ámbitos, las investigaciones que pretender determinar genotoxicidad y/o mutagénesis de las mismas han aumentado alrededor del mundo, y en particular las que evalúan si el agua tratada mediante un proceso de oxidación avanzada genera daño al material genético han tomado importancia. Kern, y colaboradores (2013) evaluaron la eficiencia de procesos oxidativos avanzados basados en la ozonización fotocatalítica en el tratamiento de aguas residuales de lavandería de un hospital en Brasil, demostrando que esos métodos fueron eficientes en la degradación de las aguas residuales de la lavandería evidenciando una reducción en los niveles de toxicidad y genotoxicidad evaluadas con *Daphnia magna* y *Allium cepa* respectivamente. En Italia se adelantó un estudio donde se puso a prueba la ozonización combinada con otra técnica para lograr la reducción de la estrogenicidad y genotoxicidad de un efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales, la genotoxicidad la evaluaron utilizando tres pruebas: Test de Ames, Ensayo Cometa y el test de *A. cepa* (Bertanza, y otros, 2013). Magdeburg, Stalter, Schlüsener, Ternes, & Oehlmann (2014) en una planta de tratamiento de aguas residuales a escala piloto, evaluaron la eficacia de la ozonización y la filtración de carbón activado en polvo para eliminar los contaminantes orgánicos traza de los efluentes secundarios tratados, para controlar la formación de productos de oxidación reactiva evaluaron genotoxicidad y mutagenicidad del proceso empleando el test de Ames y ensayo cometa.

Zhang, y colaboradores (2014) probaron la toxicidad aguda y la genotoxicidad de un efluente sintético, tratando con el proceso de coagulación de Fenton para destoxificar el efluente, para evaluar la genotoxicidad utilizaron el ensayo de micronúcleos y el ensayo cometa, concluyendo

que el proceso de coagulación con Fenton puede reducir de forma integral la toxicidad aguda y la toxicidad de nitrógeno y se muestra reducción en la genotoxicidad del efluente luego de ser tratado con el proceso. Brienza, y colaboradores (2016), en su estudio realizado con muestras de agua en Francia probaron que las aguas tratadas por un proceso de oxidación avanzada muestran reducciones en los niveles de toxicidad, para esto ellos realizaron ensayos de toxicidad con bioindicadores como *Vibrio fischeri*, *D. magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Brachionus calyciflorus*, también realizaron pruebas de estrógenos y genotoxicidad. Klauck, Giacobbo, Lorenz de Oliveira, Basso da Silva, & Siqueira Rodrigues (2017) evaluaron la efectividad de varios procesos de oxidación avanzada y un sistema biológico para el tratamiento de lixiviados, emplearon ensayos de toxicidad en *A. cepa* y aberraciones cromosómicas, demostrando que en general los procesos evaluados reducen drásticamente los niveles de toxicidad y genotoxicidad en los lixiviados. En el noreste de China evaluaron la eficiencia en la detoxificación del proceso A²O-Fenton y el proceso de A²O-ozonización en una planta de tratamiento de aguas residuales, evaluó toxicidad y genotoxicidad, para esta última emplearon el ensayo cometa, concluyeron que la genotoxicidad se ve reducida luego de someter las aguas al tratamiento (Na, y otros, 2017).

7 METODOLOGÍA

7.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en tres municipios del departamento de Nariño (Pasto, Ipiales y Túquerres) en las plantas de tratamiento de estas y en tres acueductos veredales de Ipiales (Charandú, Chaguaipe y La Orejuela), la recolección de muestras se realizó entre los meses de marzo y abril de 2018, se colectaron aguas crudas y en las plantas de potabilización se recogieron aguas tratadas por el método de cloración, en el sitio de muestreo se realizaron medidas de pH, oxígeno disuelto, temperatura y conductividad con ayuda de un medidor multiparámetro automatizado SensoDirect 150 de Lovibond, posteriormente las muestras fueron envasadas y rotuladas, se trasladaron en refrigeración hasta los laboratorios del grupo de investigación GIMFC para su tratamiento, una alícuota de cada muestra recogida fue llevada a los laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño para que se le realice un análisis fisicoquímico parcial (Anexo 1).

7.2 Test Catalítico para la obtención de las muestras

Las muestras de agua analizadas fueron obtenidas a partir de los reactores empleados para la aplicación de la tecnología PCFH optimizada en el proyecto SGR – Agua Potable, se trabajó con 1 L de aguas las aguas crudas, provenientes de acueductos urbanos y veredales, que se trataron con la tecnología PCFH bajo condiciones optimizadas (concentración de catalizador 5,85 g/L y dosis de H₂O₂ 3%). Se tomaron 7 muestras a diferentes intervalos de tiempo durante la aplicación de la tecnología PCFH sobre cada agua a tratar según lo consignado en la Tabla 2, las muestras a las que se le determinó genotoxicidad y mutagenicidad fueron: 1. Muestras de agua cruda de los acueductos y veredas, 2. Las muestras crudas después del tratamiento con la

tecnología PCFH (Tf), diluidas según se explica más adelante, 3. Aguas cloradas para tener un punto de comparación entre los dos tipos de tratamiento de aguas, 4. Controles de la técnica PCFH (H_2O_2 , Na_2SO_3 y $\text{H}_2\text{O}_2+\text{NaSO}_3$). La muestra con que se trabajaron todos los ensayos fue la Tf (Tabla 2) ya que es el agua final tratada con la tecnología PCFH (la concentración de esta muestra fue expresada como mg de COT sobre l de agua), por ende sería la destinada para el consumo. Los ensayos se realizaron con temperatura y pH controlados imitando las condiciones que tenían al momento de ser colectadas las aguas, las muestras fueron depositadas en un reactor de vidrio operado a modo “Semibatch”, con cuatro entradas en la parte superior para suministro de H_2O_2 (el volumen total adicionado a lo largo de la reacción fue 100 mL), aire constante aproximadamente 2 l/hora) para evitar la acumulación de CO_2 , un electrodo para controlar pH y un sitio de extracción de la muestra. Se determinó H_2O_2 remanente (para calcular el porcentaje de H_2O_2 reaccionante) por el método yodimétrico, esto se hizo con la ayuda de un espectrofotómetro para medir la absorbancia del H_2O_2 remanente al reaccionar con el yoduro de potasio, para esto se tomó una alícuota de 500 μL de la muestra y a este se le añadió 200 μL de molibdato de amonio 0,01 M (este actúa como catalizador y estabilizador de la reacción), 300 μL de solución de ácido sulfúrico 9,8 % (H_2SO_4), 2000 μL de solución de yoduro de potasio 0,1 M (KI) y se completó con siete mL de agua tipo 1, se dejó reposar 10 minutos y se procedió a hacer la lectura de la absorbancia a $\lambda_{\text{max}} = 361 \text{ nm}$ en espectrofotómetro (UV-VIS 2600 marca SHIMADZU). Las concentraciones de Carbono Orgánico Total (COT) fueron determinadas a partir de muestras de 15 mL las cuales fueron filtradas (Millipore, 0.22 μm) y se analizaron con el equipo Shimadzu TOC-L Analyzer, automatizado, los porcentajes de eliminación de COT se determinaron por la fórmula $\text{COT} = \text{Carbono Total (CT)} - \text{Carbono Inorgánico (CI)}$ (García, Torres Palma, Galeano, Vicente, & Gil, 2018).

Tabla 2

Muestras de agua superficial tratadas con la tecnología PCFH, con que las que se trabajó en los diferentes ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad.

Muestra	Tiempo (Minutos)	Tiempo de Reacción (Minutos)	Tecnología PCFH	Volumen Muestra (mL)*
T _i	0	0	Agua a tratar	25
T ₀	30	0	Catalizador + Agua a tratar	25
T ₁	75	45	Catalizador + Agua a tratar + H ₂ O ₂	25
T ₂	120	90	Catalizador + Agua a tratar + H ₂ O ₂	25
T ₃	165	135	Catalizador + Agua a tratar + H ₂ O ₂	25
T ₄	210	180	Catalizador + Agua a tratar + H ₂ O ₂	25
T _F	240	0	Catalizador + Agua tratada	25

*Volumen empleado para realizar las pruebas.

7.3 Determinación de Genotoxicidad mediante el uso de ensayos *in vitro*

Para determinar si las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH tenían actividad genotóxica se escogieron dos pruebas, el test de Ames y el ensayo cometa, estas pruebas presentan no solo una amplia referencia en este tipo de análisis sino que han mostrado ser técnicas fáciles de implementar en el laboratorio con una alta reproducibilidad. Los ensayos fueron realizados en las instalaciones de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) sede Medellín en los laboratorios de investigación del grupo grupo de investigación de Biología de Sistemas de la Facultad de Medicina a cargo de la Doctora Isabel Cristina Ortiz Trujillo.

7.3.1 Ensayo de mutagenicidad

Para esta prueba se partió de cultivos bacterianos de *S. typhimurium* frescos y en específico de las cepas TA98 y TA100 estas cepas fueron escogidas debido a su gran eficiencia al momento de detectar gran variedad de mutágenos (Maron & Ames, 1983). El bioensayo se realizó por triplicado para todas las muestras, vale la pena aclarar que en este trabajo no se usó la fracción S9 para ningún ensayo. Las cepas TA98 y TA100 fueron suministradas por el grupo de investigación de Biología de Sistemas de la Facultad de Medicina de la UPB sede Medellín.

7.3.1.1 Control de marcas para las cepas TA98 y TA100

Inicialmente para verificar que las cepas con las que se trabajó no sufrieron modificaciones en sus características ni genotipo, se realizó un chequeo de marcas como lo recomiendan Ames, McCann, & Yamasaki (1975). Las dos cepas se incubaron en caldo nutritivo por 16 horas a 37 °C y con agitación constante, pasado este tiempo se midió la densidad óptica a 650 nm la cual debe estar entre 0.5 y 0.6, con esto se asegura una concentración de 1×10^9 UFC/mL, de estas se hizo un primer aislado en agar histidina-biotina-ampicilina (Anexo 5) para cada cepa, de cada aislado se tomó 1 colonia de cada cepa (TA98 y TA100) y se cultivaron independientemente en caldo nutritivo bajo las condiciones descritas anteriormente y luego se aplicaron las pruebas recomendadas siguiendo el procedimiento descrito por Maron y Ames (1983) (Anexo 2).

7.3.1.2 Determinación preliminar de la toxicidad de la muestra en estudio

Se realizó un ensayo de toxicidad preliminar para determinar la dosis máxima de las muestras que se emplearon en el test de Ames, para ello se hicieron diluciones seriadas (factor de dilución 1:1) de la muestra Tf para cada localidad, expresando su concentración en mg de COT por l de muestra Tf mediante la fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$ (Anexo 3), cada dilución de cada muestra se evaluó por triplicado, la determinación de la toxicidad se realizó mediante el ensayo de

preincubación, en donde se preincubó la muestra con la cepa (aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) durante 90 minutos a 37°C , posteriormente se mezcló con agar mínimo suplementado con histidina/biotina y se sirvió sobre la superficie de la caja Petri con medio mínimo con glucosa. Como control negativo se usó agua destilada estéril, como controles positivos se usaron Daunomicina para TA98 y 4-nitroquinolina óxido (4-NQO) $5\mu\text{g/mL}$ para TA100, adicionalmente se incluyeron como controles de la tecnología PCFH: H_2O_2 , Na_2SO_3 y $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_3$, estos fueron usados como controles de la técnica para descartar que estos estén influyendo en los resultados.

7.3.1.3 Test de Ames

Las bacterias fueron expuestas directamente a las muestras mediante el método de preincubación. Se tomaron $100\ \mu\text{L}$ de Buffer Fosfato salino (pH 7.4) (PBS), $10\ \mu\text{L}$ de la muestra a analizar y $100\ \mu\text{L}$ de cultivo bacteriano fresco (que contiene aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) y se preincubarón por 90 minutos a 37°C , luego se mezclaron con 3 mL de agar mínimo suplementado con histidina-biotina y se sembraron en cajas Petri, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 48-72 horas, después de este período de incubación, se contó el número de colonias revertantes por placa (Gutiérrez *et al.*, 2005). Para este ensayo como control negativo se usó PBS, como controles positivos se usaron Daunomicina para TA98 y 4-nitroquinolina óxido (4-NQO) $5\mu\text{g/mL}$ para TA100, además se incluyeron controles de la tecnología PCFH los cuales fueron: H_2O_2 , Na_2SO_3 , y $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_3$.

Se consideraron positivas las respuestas mutagénicas producidas por los efectos de las aguas capaces de generar un índice de mutagenicidad, IM (relación del número promedio de colonias revertantes inducidas sobre el número promedio de colonias revertantes espontáneas del control negativo), según la regla de two-fold increase (regla de las dos veces) (Ames, McCann, &

Yamasaki, 1975). También considerando, que el número promedio de colonias revertantes inducidas debe superar el número de colonias revertantes espontáneas establecidos para cada cepa: TA98 entre 20-50 y TA100 entre 75-200 (Mortelmans & Zeiger, 2000).

7.3.2 Ensayo de genotoxicidad

7.3.2.1 Cultivo celular

La línea celular HepG2 fue usada para el ensayo cometa. Esta es una línea celular establecida, derivada de tejido hepático, y su elección se debe a que corresponde a un modelo para estudios del metabolismo hepático y evaluación de toxicidad de xenobióticos para el medio ambiente y la dieta (Dehn, White, Conners, Shipkey, & Cumbo, 2004). Los cultivos fueron mantenidos en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y con antibióticos (Penicilina y estreptomycin), las células se incubaron en una atmosfera que tenía CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C. Los medios de cultivo se cambiaron tres veces por semana, y las células fueron usadas para las pruebas *in vitro* cuando presentaron una confluencia del 80%.

Para comprobar el porcentaje de viabilidad celular, se mezclaron la suspensión de células y de azul tripán, sobre una cámara de recuento celular (cámara de Neubauer), posteriormente se observó al microscopio y se contaron las células viables, distinguiéndolas de las dañadas (teñidas de azul), finalmente se calculó la concentración de células en la suspensión original con la fórmula: **Viabilidad celular (%) = (Número de células vivas totales) ÷ (Número de células Totales [vivas + muertas]) × 100** (Strober, 1997).

7.3.2.2 Determinación de toxicidad y dosis mínima letal por medio del ensayo MTT

Este es un test de biosíntesis enzimática en el cual la deshidrogenasa mitocondrial (enzima de todas células vivas) oxida la molécula amarilla MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) generando una coloración azul (formazán) de diferentes intensidades de acuerdo con el grado de viabilidad de la célula. La capacidad de las células para reducir MTT a formazán, tras la exposición a las aguas tratadas con la tecnología PCFH, permitió medir la toxicidad del compuesto que se evaluó. En este trabajo, el ensayo de MTT fue una adaptación de la metodología propuesta por Mosmann (1983).

Para ello las células se depositaron en placas de 96 pozos con una concentración de 3500 células/mL por pozo junto con 100 µL de las concentraciones (Anexo 3) de las aguas tratadas con la tecnología PCFH y se incubaron en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ posteriormente se agregó el MTT a una concentración de 7,5 mg/1,5 mL de medio DMEM a todos los pozos en condiciones de oscuridad y se incubó a 37 °C con agitación continua de 4 a 6 h. Para solubilizar los cristales de formazán, se agregó 100 µL de isopropanol ácido (50 mL de Tritón X-100, 4 mL de HCl, 446 mL de Isopropanol) se incubó a 37 °C y con agitación constante aproximadamente de 12-18 h en oscuridad. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan® GO) a una longitud de onda de 570 nm. para ello se hicieron diluciones seriadas (factor de dilución 1:1) de la muestra Tf para cada localidad, expresando su concentración en mg de COT por l de muestra Tf mediante la fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ (Anexo 3), cada dilución de cada muestra se evaluó por triplicado, para los tratamientos se agregaron 10 µL de las agua tratadas por la tecnología PCFH, se tuvieron como controles negativos las células sin tratar y medio DMEM sin células y como control positivo se usó DMSO puro, se incluyeron las aguas

crudas y tratadas por el método de cloración, adicionalmente se utilizó H_2O_2 , Na_2SO_3 y $\text{H}_2\text{O}_2+\text{Na}_2\text{SO}_3$ como control de la técnica. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células vivas.

7.3.2.3 Ensayo cometa

Para este ensayo se utilizaron cajas de seis pozos y se sembraron aproximadamente 5×10^4 células/mL por pozo de la línea celular HepG2 y 3 mL de medio DMEM, a cada pozo se le agregaron 50 μL de la muestra problema y se incubo a 37 °C y una atmosfera con 5% de CO_2 por 24 horas.

Lisis

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a despegar las células para ello se realizaron 2 lavados con solución salina (NaCl 0.9%), luego se le agrego 2 mL de tripsina a cada pozo y se incubo por 4-5 minutos, finalmente se desactivo la acción de la tripsina agregando medio DMEM suplementado, el volumen de cada pozo se depositó en tubos y se centrifugo a 1200 rpm durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 1 mL de DMEM suplementado. La viabilidad se midió según lo propuesto por Strober (1997), para realizar el ensayo se constató que la viabilidad celular sea mayor al 85%.

De la suspensión final se tomó un volumen en donde se tenía certeza que habían 2×10^4 células/mL y se completó con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) hasta un volumen de 100 μl y esto se sembró en GelBond[®], este se cubrió con solución de lisis (89% Solución stock, 10% DMSO puro y 1% de Tritón X-100) y se guardó en refrigeración y cubierto de la luz por 24-48 horas.

Denaturalización y electroforesis

Posterior a la lisis y antes de la electroforesis el GelBond® se colocó en cámara electroforética y se sumergió en Buffer de electroforesis por 20 minutos con pH igual o superior 13 para la denaturalización, pasado este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 30 minutos, al finalizar se realizó un lavado con solución neutralizante.

Tinción y visualización

Las placas fueron teñidas con bromuro de etidio a una concentración de 4 µg/mL, y se visualizaron en microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 55i, la lectura de las células se hizo a 20x. El plug-in OpenComet del software ImageJ fue utilizado para el análisis de los parámetros de los cometas: momento de la cola, porcentaje de DNA en la cola, porcentaje de DNA en la cabeza, momento oliva, longitud del cometa, DNA en la cola, DNA en la cabeza (Gyoriac, Venkatachalam, Thiagarajan, Hsu, & Clement, 2014). Los resultados se muestran en longitud de la cola del cometa y se interpretaron de acuerdo a lo consignado en la Tabla 3.

Tabla 3

Interpretación de la longitud del cometa

Estadios	Longitud (µm)	Interpretación
0	Hasta 24	No genotóxico
A	25-32	Ligeramente genotóxico
B	33-40	Moderadamente genotóxico
C	41-53	Altamente genotóxico
D	Mayor de 53	Extremadamente genotóxico

Nota. Fuente: tomado de Brugés & Reguero Reza (2007).

7.4 Diseño y Análisis de Datos Estadístico

Para determinar el potencial genotóxico y/o mutagénico de las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH se realizó el Test de Ames y el ensayo Cometa en 70 ensayos con tres replicas,

para un total de 420 mediciones. Como unidad experimental se tomaron las muestras de agua sometidas a los diferentes tratamientos (crudas, con la tecnología PCFH y por cloración), 6 sitios de muestreo, tres blancos para la tecnología PCFH (Sulfito de sodio Na_2SO_3 , H_2O_2 y $\text{Na}_2\text{SO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$) y controles positivos y negativos de la técnica: Test de Ames Buffer fosfato salino (control negativo) y Daunomicina y 4-NQO (Controles positivos) y para el ensayo cometa Agua destilada estéril (control negativo) y DMSO (Control positivo).

Para calcular la dosis letal mínima se realizó un análisis de regresión Probit, este mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que se presentan en una cierta respuesta a dicho estímulo, esta prueba permite estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas. Este procedimiento se realizó en el software SPSS[®] Statistics Versión 24 de IBM[®].

Para el análisis estadístico de los resultados de las pruebas de genotoxicidad primero se realizó una prueba de diferencia de medias multifactorial paramétrica, posteriormente se aplicó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA multifactorial), en donde los factores o variables independientes fueron el tipo de tratamiento al que son sometidas las aguas superficiales y la procedencia de las aguas superficiales.

Como variables de respuesta se tuvo: para el ensayo cometa, se escogió la longitud de la cola que es una de las tres medidas cuantitativas más empleadas en estudios del ensayo cometa según lo planteado por Faust et al. (2004). Y para Test de Ames, se tuvo en cuenta el número de colonias revertantes para cada caso.

8 RESULTADOS

8.1 Determinación de la eliminación de contaminantes y peróxido de hidrógeno reaccionante.

Se realizaron 6 test catalíticos entre los meses de marzo a abril de 2018, de estos se tomaron siete muestras distribuidas a lo largo de la realización del test (4 horas) cada una con un volumen de 25 mL de las cuales se usó la muestra final (Tf) en la realización de los bioensayos. Posterior al tratamiento de las aguas superficiales respectivas con la tecnología PCFH los porcentajes de eliminación de contaminantes observados en la muestra final (Tf) estuvieron entre el 5 y el 45% (Tabla 4 y Figura 1), por su parte el H₂O₂ reaccionante medido en esta muestra Tf fue del 100% lo que indicó que la totalidad de se consumió en la reacción por lo que no se encontró remanentes de este compuesto al finalizar el tratamiento de las muestras de agua superficial con la tecnología PCFH.

Tabla 4

Condiciones de la tecnología PCFH bajo las que fueron tratadas las aguas y resultados de eliminación de carbono orgánico total y H₂O₂ reaccionante.

Nombre de ensayo	pH inicial	T ^{oa} (°C)	Catalizador (g) ^b	Concentración de H ₂ O ₂ (mg/L) ^c	Tiempo (min) ^d	COT ^e (mg/L)		H ₂ O ₂ Reaccionante (%)
						AC ^f	Tf ^g	
Charandú (IPI-G-037)	6,75	13,6	5,85	3,76	240	4,92	4,56	100
Chaguaipe (IPI-G-038)	5,77	13,9	5,85	7,28	240	7,59	4,4	100
La Orejuela (IPI-G-039)	5,85	13,7	5,85	4,66	240	4,86	3,61	100
Ipiales (IPI-G-040)	6,7	12	5,85	3,75	240	3,9	2,13	100
Pasto (PAS-G-017)	6,8	13,3	5,85	4,03	240	2,74	2,58	100

Túquerres (TUQ-G-017)	7,2	15,2	5,85	4,83	240	5,03	4,12	100
-----------------------	-----	------	------	------	-----	------	------	-----

^a Temperatura a la que fue realizado el test (°C). ^b Cantidad de catalizador que fue agregado por muestra para realizar el test. ^c H₂O₂ adicionado a lo largo de la reacción. ^d Tiempo total en el que se desarrolló la reacción. ^e Carbono Orgánico Total. ^f Contenido de COT inicial. ^g Contenido de COT luego del tratamiento con la tecnología PCFH. Fuente: esta investigación.

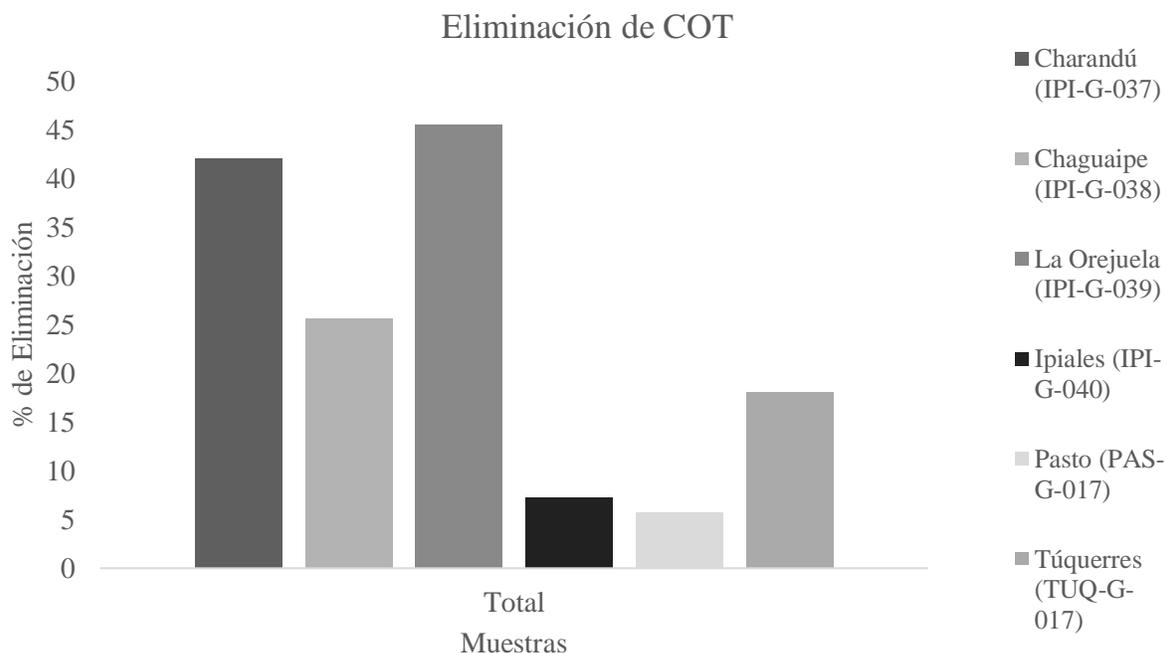


Figura 1 Porcentaje de eliminación de contaminantes, en muestras Provenientes del departamento de Nariño, tratadas con la tecnología PCFH. Fuente: esta investigación.

Como se puede observar en la Tabla 1 el COT se ve reducido luego del tratamiento con la tecnología PCFH, mostrando mejores porcentajes de eliminación para la muestra de LA OREJUELA con un valor de 45,5%, seguido de la muestra Charandú (IPI-G-037) con un porcentaje de eliminación de COT de 42,1, la muestra que presentó el valor más bajo de eliminación de COT fue Pasto con apenas 5,8% de reducción de la materia orgánica (Figura 1). En la Tabla 1 también se encuentran consignados las condiciones de temperatura, pH, la concentración de H₂O₂ que se agregó, la cantidad de catalizador que se usó para cada muestra y

el tiempo de reacción bajo los cuales fueron corridos los test catalíticos, además, incluye el código y la procedencia de las muestras.

8.2 Determinación de Genotoxicidad mediante el uso de ensayos *in vitro*

8.2.1 Ensayo de mutagenicidad

8.2.1.1 Control de marcas para las cepas TA98 y TA100

Los controles de las marcas resultaron positivos con lo que se confirma que las cepas conservan sus características iniciales, comprobando que son aptas para continuar con los ensayos de mutagenicidad (Anexo 6).

8.2.1.2 Determinación preliminar de la toxicidad de la muestra en estudio

Se pudo observar que en todas las diluciones hubo crecimiento de la bacteria indicando que las muestras no presentaron un efecto tóxico. Esto permitió continuar con la evaluación de la mutagenicidad utilizando las tres diluciones más concentradas de cada muestra.

8.2.1.3 Test de Ames

El promedio de colonias revertantes de las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium* obtenido en las muestras antes y después del tratamiento con la tecnología PCFH y de los controles tanto de la PCFH como del bioensayo, se presentan en la Tabla 5. Estos se obtuvieron de los ensayos que se realizaron para cada localidad, cada uno de estos se realizó por triplicado y con su réplica.

Tabla 5

Número de colonias revertantes para las cepas TA98 y TA100 de S. typhimurium sin activación metabólica.

Muestra	Tratamiento	TA98	TA100
<u>Agua tratada con la tecnología PCFH</u>			
Charandú (IPI-G-037)	1,14 ^c	32 ± 26,13	136,8 ± 42,3
	2,28 ^c	32,2 ± 21,55	101 ± 42,3
	4,56 ^c	33,3 ± 26,39	102,5 ± 42,3
Chaguaipe (IPI-G-038)	1,1^c	2333,3 ± 122,3	1333,3 ± 42,3
	2,2^c	784 ± 122,3	931,3 ± 42,3
	4,4^c	489,3 ± 122,3	439,7 ± 42,3
La Orejuela (IPI-G-039)	0,90 ^c	17,5 ± 122,3	109 ± 42,3
	1,81 ^c	18 ± 122,3	113,17 ± 42,3
	3,61 ^c	14,6 ± 122,3	103,8 ± 42,3
Ipiiales (IPI-G-040)	0,53^c	332,5 ± 122,3	426,5 ± 42,3
	1,07^c	216,7 ± 122,3	354,8 ± 42,3
	2,13^c	149,2 ± 122,3	212,7 ± 42,3
Pasto (PAS-G-017)	0,65 ^c	96,8 ± 122,3	167,3 ± 42,3
	1,29^c	113,8 ± 122,3	184,5 ± 42,3
	2,58^c	88,8 ± 122,3	170,5 ± 42,3
Túquerres (TUQ-G-017)	1,03 ^c	26,5 ± 122,3	90,7 ± 42,3
	2,06 ^c	21,2 ± 122,3	91,5 ± 42,3
	4,12 ^c	15,2 ± 122,3	83 ± 42,3
<u>Agua sin tratamiento con la tecnología PCFH</u>			
AC Charandú ^a		25,8 ± 134	97,2 ± 46,4

AC Chaguaipe ^a		14 ± 122,3	101,2 ± 42,3
AC La Orejuela ^a		15,7 ± 122,3	104,2 ± 42,3
AC Ipiales ^a		117,6 ± 134	238 ± 46,4
AC Pasto ^a		21 ± 122,3	111,3 ± 42,3
AC Túquerres ^a		14,5 ± 122,3	96,5 ± 42,3
PC Ipiales ^b		50 ± 25,3	117,4 ± 31,4
PC Pasto ^b		16 ± 23	98 ± 28,7
PC Túquerres ^b		10,5 ± 23	101,7 ± 28,7
<u>Muestras control</u>			
H ₂ O ₂		22,3 ± 51,5	106,5 ± 17,9
Na ₂ SO ₃		54 ± 50	93,5 ± 17,3
H ₂ O ₂ +Na ₂ SO ₃		22,1 ± 51,2	108,5 ± 17,9
C+	Daunomicina	336,2 ± 51,5	
	4-NQO ^d		225,4 ± 17,6
C-	PBS ^e	22,2 ± 51,5	112,5 ± 17,6

^a Agua antes del tratamiento con la tecnología PCFH. ^b Agua tratada con el método tradicional de cloración. ^c Concentración de COT de la muestra (mg/L). ^d 4-nitroquinolina óxido. ^e Buffer Fosfato salino (pH 7.4). Los datos están expresados como el promedio de los resultados de las réplicas. Los resultados se muestran como la media de revertantes ± el Error Estándar (p≤0.05). Fuente: esta investigación.

Como se puede observar en la Tabla 5 las muestras de agua Chaguaipe (IPI-G-038) e Ipiales (IPI-G-040) tratadas con la tecnología PCFH son las que presentaron un número de colonias revertantes alto donde para la cepa TA98 se superan las 100 revertantes y para TA100 se superan las 200 colonias revertantes. Llama la atención que la muestra de agua cruda de Ipiales igualmente presentó un número elevado de revertantes para las dos cepas con las que se trabajó en el presente estudio y que para las aguas de la misma muestra tratadas por el método de cloración (PC Ipiales) se encontraron 50 revertantes, evidentemente los resultados de las muestras mencionadas superan los valores obtenidos para los controles positivos los cuales son mutágenos directos de los cuales se sabe generan mutaciones (Anexo 7). En la Tabla 6 se

muestran los valores del IM para las diferentes muestras de agua evaluadas, tanto para las aguas tratadas con la tecnología PCFH, como para las aguas crudas y las aguas tratadas por el método de cloración. Especificándose la cualidad de cada índice.

Tabla 6

Índice de mutagenicidad para las cepas TA98 y TA100 de S. typhimurium sin activación metabólica.

Muestra	Tratamiento	IM TA98	Cualidad	IM TA100	Cualidad
<u>Agua tratada con la tecnología PCFH</u>					
Charandú (IPI-G-037)	1,14 ^c	1,48	NM	1,22	NM
	2,28 ^c	1,49	NM	0,9	NM
	4,56 ^c	1,54	NM	0,91	NM
Chaguaipe (IPI-G-038)	1,1 ^c	108,11	MP	11,85	MP
	2,2 ^c	36,32	MP	8,28	MP
	4,4 ^c	22,67	MP	3,91	MP
La Orejuela (IPI-G-039)	0,90 ^c	0,81	NM	0,97	NM
	1,81 ^c	0,83	NM	1,01	NM
	3,61 ^c	0,68	NM	0,92	NM
Ipiiales (IPI-G-040)	0,53 ^c	15,4	MP	3,79	MP
	1,07 ^c	10,04	MP	3,15	MP
	2,13 ^c	6,91	MP	1,89	NM
Pasto (PAS-G-017)	0,65 ^c	4,49	MP	1,49	NM
	1,29 ^c	5,27	MP	1,64	NM
	2,58 ^c	4,12	MP	1,52	NM
Túquerres (TUQ-G-017)	1,03 ^c	1,23	NM	0,81	NM
	2,06 ^c	0,98	NM	0,81	NM
	4,12 ^c	0,7	NM	0,74	NM
<u>Agua sin tratamiento con PCFH</u>					
AC Charandú ^a		1,2	NM	0,86	NM
AC Chaguaipe ^a		0,65	NM	0,9	NM
AC La Orejuela ^a		0,73	NM	0,93	NM
AC Ipiiales ^a		5,45	MP	2,12	MP
AC Pasto ^a		0,97	NM	0,99	NM
AC Túquerres ^a		0,67	NM	0,86	NM
PC Ipiiales ^b		2,32	MP	1,04	NM
PC Pasto ^b		0,74	NM	0,87	NM
PC Túquerres ^b		0,49	NM	0,9	NM
<u>Muestras control</u>					

H ₂ O ₂		1,03	NM	0,95	NM
Na ₂ SO ₃		2,5	MP	0,83	NM
H ₂ O ₂ +Na ₂ SO ₃		1,02	NM	0,96	NM
C+	Daunomicina	15,58	MP		
	4-NQO ^d			2	MP
C-	PBS ^e	0,19	NM	1	NM

IM (Índice de Mutación). NM (No Mutagénico). MP (Mutación Positiva). ^a Agua antes del tratamiento con la tecnología PCFH. ^b Agua tratada con el método tradicional de cloración. ^c Concentración de COT de la muestra (mg/L). ^d 4-nitroquinolina óxido. ^e Buffer Fosfato salino (pH 7.4). Los datos están expresados como el promedio de los resultados de las réplicas. (p≤0.05). Fuente: esta investigación.

Como se puede observar en la Tabla 6, el IM estuvo por debajo de 2 para la mayoría de muestras evaluadas excepto para Chaguaipe, Ipiales y PAS-G017 tratadas con la tecnología PCFH y la muestras de agua cruda de Ipiales; por lo tanto se puede decir que el tratamiento de aguas superficiales con la tecnología PCFH está actuando de manera diferente en las muestras de agua de diferente procedencia ya que para la mitad de muestras analizadas no parecen inducir efectos mutagénico directos, pero para la otra mitad de las muestras si lo hace. Pero se debe resaltar que para la muestra de Ipiales en todos los casos (sin ningún tratamiento, tratada con la tecnología PCFH y tratada por el método de cloración) resultó con un número elevado de colonias revertantes y un IM superior a 2. Es de resaltar que las muestras de agua Chaguaipe y Pasto resultaron ser mutagénicas luego de ser sometidas al tratamiento con la tecnología PCFH puesto que los IM de las aguas crudas y las tratadas por el método de cloración de las mismas muestras son inferiores a 2. En el caso de los controles de tecnología solamente resultó ser mutagénico el sulfito de sodio y únicamente para la cepa TA98.

8.2.2 Ensayo de genotoxicidad

8.2.2.1 Determinación de toxicidad y dosis mínima letal por medio del ensayo MTT

La prueba de MTT es una prueba colorimétrica cuyos resultados dependen del metabolismo celular, esta es una prueba que indica el daño celular ocasionado y, por tanto, está directamente

relacionada con la toxicidad de las sustancias evaluadas. Ninguna de las diluciones evaluadas de cada muestra presentó reducción en la viabilidad celular, las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH no alcanzaron la dosis letal para el 50% de la población (LD_{50}), demostrándose que la tecnología PCFH aplicada a las muestras evaluadas en el presente trabajo no tiene ningún efecto citotóxico igualmente los controles de la tecnología no mostraron ser tóxicos para la línea celular.

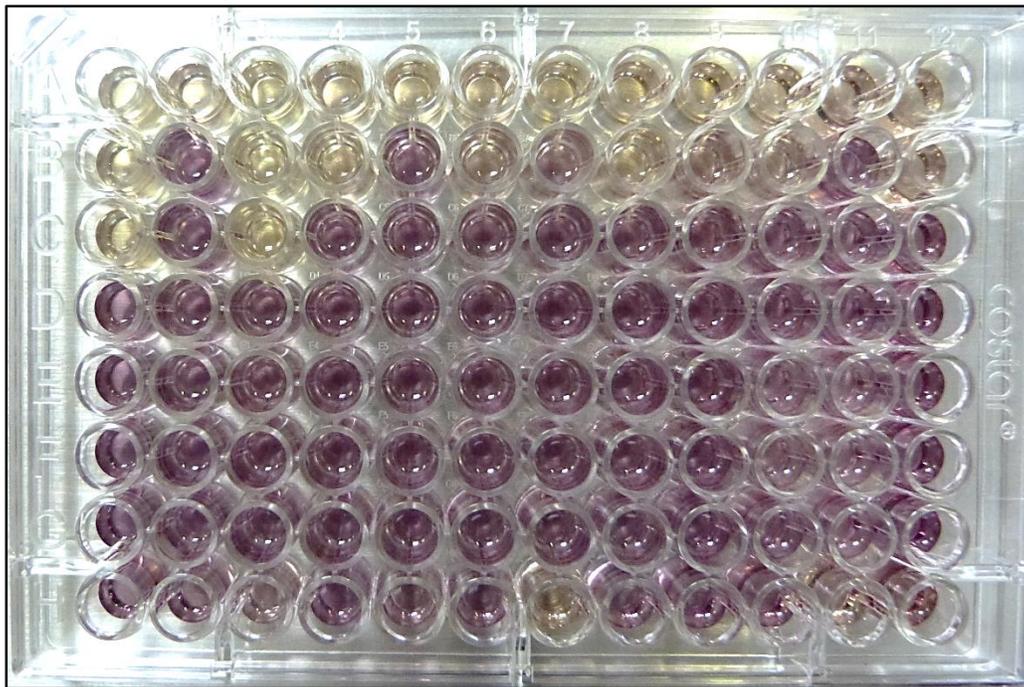


Figura 2 Caja de 96 pozos con resultados de ensayo MTT, la línea celular usada fue HepG2. Fuente: esta investigación.

8.2.2.2 Ensayo cometa

Con el fin de evaluar el grado de daño en el DNA se procedió a la realización del ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo cometa; denominado de esta manera por el patrón de migración de los fragmentos del DNA en el gel. Fueron analizadas por lo menos 70 células individuales por cada condición evaluada. Los resultados del efecto genotóxico de las

muestras evaluadas se puede observar en la Tabla 7. En esta se expresan los datos de longitud de cola del cometa ya que este es uno de los descriptores más usados (Moller, y otros, 2014).

Tabla 7

Resultados del efecto genotóxico de las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH, según ensayo cometa.

Muestra	Tratamiento	Longitud de la Cola (μm)
Charandú (IPI-G-037)	1,14^c	28,3
	2,28 ^c	15,1
	4,56 ^c	12,3
Chaguaipe (IPI-G-038)	1,1 ^c	13,3
	2,2 ^c	16,7
	4,4 ^c	7,8
La Orejuela (IPI-G-039)	0,90 ^c	15,3
	1,81 ^c	10,2
	3,61 ^c	9,3
Ipiiales (IPI-G-040)	0,53 ^c	7,2
	1,07 ^c	6,2
	2,13 ^c	13,6
Pasto (PAS-G-017)	0,65 ^c	16,3
	1,29^c	39,6
	2,58 ^c	13,7
Túquerres (TUQ-G-017)	1,03 ^c	2,8
	2,06 ^c	6,1
	4,12 ^c	12,7
AC Charandú ^a		5,2
AC Chaguaipe ^a		24,3
AC La Orejuela ^a		8,9
AC IPIALES ^a		2,4
AC PASTO ^a		13,5
AC Túquerres ^a		60,8
PC Ipiiales ^b		6,7
PC Pasto ^b		1,3
PC Túquerres ^b		7,6
H ₂ O ₂		16,8
Na ₂ SO ₃		11,1
H ₂ O ₂ +Na ₂ SO ₃		18,4

C+	40,1
C-	11,3

^a Agua antes del tratamiento con la tecnología PCFH. ^b Agua tratada con el método tradicional de cloración.

^c Concentración de COT de la muestra (mg/L). Los resultados se muestran como las medias de los experimentos y sus repeticiones y replicas. ($p \leq 0.05$). Fuente: esta investigación.

Como se puede observar en la Tabla 8 los resultados evidencian que la mayoría de muestras evaluadas se encuentran en un estadio 0 (no genotóxico), la concentración 1,14 mg COT/l de la muestra Charandú y el agua cruda proveniente de la vereda de Chaguaipe se muestran ligeramente genotóxicos, la concentración de 1,29 mg COT/l de la muestra Pasto (PAS-G-017) es moderadamente genotóxica y la muestra AC Túquerres se encuentra en un estadio D que nos indica que es altamente genotóxica según la clasificación propuesta por Brugés & Reguero Reza (2007), esta última muestra corresponde a una muestra de agua que no ha tenido ningún tipo de tratamiento de desinfección del municipio de Túquerres.

9 DISCUSIÓN

9.1 Determinación de la eliminación de contaminantes y peróxido de hidrógeno reaccionante.

Los porcentajes de eliminación de materia orgánica de las muestras de agua de los diferentes sitios de muestreo fueron efectivos, esto debido a que la tecnología PCFH como otro tipo de tecnologías de oxidación avanzada muestra varias ventajas respecto a los métodos clásicos de desinfección (Guimarães, Guadagnini, Bueno Franco, & Urbano dos Santos, 2016) y han demostrado ser mejores en cuanto a eficiencia en el proceso de eliminación de contaminantes llegando incluso hasta la mineralización de la materia orgánica (Li, Xu, Zhu, Ding, & Mahmood, 2010). Los resultados encontrados en este trabajo son comparables con los encontrados por Perdigón-Melón y colaboradores (2010) quienes tras aplicar un proceso Fenton para tratar aguas residuales de una empresa cosmética lograron porcentajes de eliminación de COT del 49%, porcentajes similares a los reportados en este trabajo que llegan hasta el 45% indicando que se obtuvo una buena remoción de los contaminantes. Ramírez, Galeano, Pinchao, Bedoya, & Hidalgo (2018) encontraron que bajo condiciones óptimas un catalizador Al/Fe-PILC puede llegar a porcentajes de eliminación de COT cercanos al 31%, cabe resaltar que el catalizador que ellos emplearon es muy similar al que se usó en la tecnología PCFH en el presente trabajo ya que ambos son catalizadores que parten de una arcilla pilarizada como soporte de un metal y trabajan junto con H_2O_2 para generar los radicales libres encargados de mineralizar la materia orgánica. Lo anterior está respaldado por Bautista, Mohedano, Gilarranz, & Baut (2007) quienes reportan que los POAs son más eficientes y efectivos para eliminar materia orgánica de aguas contaminadas alcanzando porcentajes de eliminación del 60%, además, mencionan que estos procesos tienen mayor efectividad si se complementan con métodos fisicoquímicos previos a la

desinfección, de igual manera Galeano y colaboradores (2012) demostraron que un catalizador con hierro aumentan significativamente la eliminación de la materia orgánica (por encima del 60%), en los resultados encontrados aquí se obtuvo un porcentaje de eliminación de COT de 5,8 para Pasto (PAS-G-017) (Figura 1) pero se debe resaltar que esta muestra presenta niveles iniciales de COT bajos (Tabla 4) debido a que proviene de un planta de tratamiento y el agua fue recolectada luego de pasar por los métodos fisicoquímicos de tratamiento, otro factor puede ser la cantidad estequiométrica de H₂O₂ agregada ya que como lo afirma Galeano, Gil, & Vicente (2011) este factor influye directamente en los porcentajes de eliminación de la materia orgánica.

La materia orgánica que quedo en las muestras de agua tratadas con la tecnología PCFH puede reaccionar con los nitratos y nitritos (Anexo 4) de las muestras de agua, al generar N-nitrosocompuestos principalmente N-nitrosaminas, compuestos que se saben son teratógenos, mutágenos y cancerígenos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades., 2015). En cuanto al H₂O₂ reaccionante, tal como se puede observar en la Tabla 4 este reacciono en su totalidad por lo que las muestras finales de agua (Tf) no contenían H₂O₂ lo que permitió descartar que esta sustancia influya en los resultados obtenidos.

9.2 Determinación de Genotoxicidad y Mutagenicidad mediante el uso de ensayos *in vitro*

9.2.1 Ensayo de mutagenicidad

Los resultados de este estudio indican que de las 6 muestras tratadas con la tecnología PCFH analizadas con el test de Ames, como se observa en las Tablas 5 y 6, tres de las muestras tratadas con la tecnología PCFH: Chaguaipe (IPI-G-038), Ipiales (IPI-G-040) y Pasto (PAS-G-017) presentaron mutagenicidad, mientras que para Charandú (IPI-G-037), La Orejuela (IPI-G-039) y Túquerres (TUQ-G-017) no se encontró que estas generan efecto mutagénico debido a que no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). La muestra de Chaguaipe fue la que presentó IM

más altos para las tres concentraciones evaluadas (108,11, 36,32, y 22,67 para TA98 y 11,85, 8,28 y 3,91 para TA100 mostrando todos estos MP) cuya diferencia es estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), esto puede deberse al elevado valor de COT (COT inicial: 7,59 mg/l – COT final: 4,40 mg/l) de la muestra en mención y que esta materia orgánica remanente este reaccionando con el catalizador o el H_2O_2 generando posiblemente intermediarios mucho más agresivos e inestables lo que se evidencia en la mutagenicidad encontrada para la muestra (Rodríguez, Botelho, & Cleto, 2008), además los valores de fluoruros, nitratos, nitritos, fosfatos de Chaguaipe (IPI-G-038) son altos en comparación con las demás muestras analizadas (Anexo 4) y se ha reportado en la literatura que estos compuestos en concentraciones elevadas pueden generar problemas de salud e inclusive desencadenando en cáncer, al reaccionar con la materia orgánica presente en las muestras de agua (De Miguel Fernández & Vázquez Taset, 2006; Othax, Peluso, & Gonzales Castelain, 2014).

Para la muestra Pasto (PAS-G-017) se puede ver que el IM es alto para la cepa TA98 pero para la cepa TA100 se tienen índices por debajo de 2, lo que indica que la tecnología PCFH aplicada a estas aguas desencadenó principalmente mutaciones del cambio de lectura, según Vivas, y colaboradores (2014) este tipo de resultados son encontrados frecuentemente alrededor del mundo en trabajos donde se evalúa la mutagenicidad en aguas superficiales siendo los mutágenos más abundantes aquellos que causan cambios en el marco de lectura. Caso similar ocurre con la muestra Ipiales en donde todas las concentraciones evaluadas fueron mutagénicas para la cepa TA98, pero no para la cepa TA100, donde solo las dos concentraciones más bajas presentaron mutagenicidad; esto puede atribuirse a que en este caso la tecnología PCFH podría también estar generando mutágenos que inciden sobre la sustitución de pares de bases, cuyos efectos no se pueden observar en las muestras más concentradas sino en las más diluidas, dado

que se pueden mover con mayor facilidad en el medio. Estos resultados son contrarios a los encontrados por Magdeburg, y colaboradores (2014) quienes reportaron que para otro proceso de oxidación avanzada en donde involucra el uso de carbón activado y ozono, indicando que existe una relación inversamente proporcional entre la reducción significativa de los efectos sobre el material genético y las concentraciones y dosis de las sustancias evaluadas.

Las muestras Pasto (PAS-G-017) e Ipiales (IPI-G-040) en su análisis fisicoquímico (Anexo 4) fueron las que presentaron más altos valores de cloruros lo que puede estar explicando los valores de mutagenicidad, esto debido a que puede estar ocurriendo una reacción en donde los cloruros se oxidan a Cl_2 con los radicales $\bullet\text{OH}$, que se forman en la reacción Fenton heterogénea propia de la PCFH, siendo este Cl_2 precursor de la formación de trihalometanos y es de conocimiento que estos THMs si tienen efectos mutagénicos (de Ciurana Gay, 2000; Sánchez Zafra, 2008). Otra razón puede deberse a la ubicación de los nacimientos de agua y que las actividades antrópicas estén influyendo directamente para que a estos nacimientos y el recorrido que hace el agua hasta el sitio de acopio y distribución estén llegando residuos domiciliarios y de la actividad agrícola y ganadera que se desarrolla en esta zona del departamento y pueden estar reaccionando con los componentes de la tecnología PCFH y generando nuevos mutágenos. Es necesario indicar que las muestras Chaguaípe (IPI-G-038) y Pasto (PAS-G-017) solamente resultaron ser mutagénicas posterior al tratamiento con la tecnología PCFH y para el caso de Pasto (PAS-G-017) la muestra tratada por el método de cloración no generó cambios en el material genético de *S. typhimurium*, esto puede atribuirse a los estrictos controles y el adecuado manejo de la técnica de cloración que se tiene en la planta de tratamiento de la localidad y por ende esta técnica no genera SPDs.

Pese a que la tecnología PCFH logró buenos porcentajes de remoción de la materia orgánica, esta no alcanzó la mineralización completa del contaminante, ya que la materia orgánica es una matriz compleja, por lo tanto, pueden existir estados “intermedios” de la materia orgánica y los cuales sean los que están participando directamente en la respuesta mutagénica que se encontró en este estudio. Por ello puede ser necesario que se modifiquen las condiciones de la tecnología PCFH tales como pH, temperatura, cantidad estequiométrica de H₂O₂, para determinar si esto afecta en los resultados de mutagenicidad (Rodríguez, Botelho, & Cleto, 2008).

9.2.2 Ensayo de genotoxicidad

9.2.2.1 Determinación de toxicidad y dosis mínima letal por medio del ensayo MTT

Como se puede observar mediante lo encontrado en el ensayo de MTT, las aguas tratadas con la tecnología PCFH no tiene ningún efecto citotóxico sobre las células eucariotas, probablemente porque los elementos intermediarios presentes en estas muestras, no tienen ningún mecanismo de acción directo sobre la célula, considerando que la línea celular HepG2 es altamente sensible como instrumento para detectar efectos citotóxicos y genotóxicos de elementos orgánicos, especialmente hidrocarburos poliaromáticos y aminas aromáticas y heterocíclicas, pero esta línea celular es pobremente sensible a la exposición de compuestos inorgánicos y los únicos elementos con efectos citotóxicos y genotóxicos sobre la célula han sido cadmio y arsénico (Porta, y otros, 2017). Sin embargo, para nuestra investigación no fue objeto de estudio la caracterización de los productos intermediarios resultantes de la aplicación de la tecnología PCFH para el tratamiento de aguas superficiales.

Por otra parte los resultados aquí obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura científica en donde se afirma que este tipo de tecnologías son más seguras para el consumo y que además

estas aportan en la reducción de la toxicidad en efluentes muy contaminados como en el trabajo de Kern, y colaboradores (2013) quienes demostraron que existe una diferencia significativa en la reducción de la toxicidad de aguas provenientes de la lavandería de un hospital cuando estas fueron tratadas mediante el proceso de ozonización fotocatalítica e indican que la toxicidad de este tipo de tecnologías va a variar dependiendo de la técnica de oxidación avanzada que se esté empleando. Así mismo se ha demostrado que los procesos de oxidación avanzados son mucho más seguros que otros tratamientos puesto que se ven reducidos los efectos tóxicos sobre células de componentes que contienen las aguas contaminadas (Brienza, y otros, 2016; Na, y otros, 2017).

9.2.2.2 Ensayo cometa

Como se puede observar en los resultados consignados en la Tabla 8 las muestras Chaguaipe (IPI-G-038), La Orejuela (IPI-G-039), Ipiales (IPI-G-040), Túquerres (TUQ-G-017), AC Charandú, AC La Orejuela, AC Ipiales, AC Pasto, PC Charandú, PC Chaguaipe, PC La Orejuela, PC Ipiales, PC Pasto, PC Túquerres no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y por ende no tienen efecto genotóxico sobre la línea celular HepG2, esta es una línea altamente sensible a efectos genotóxicos causados por elementos orgánicos según lo propone Porta, y colaboradores (2017), evidenciándose que en estas aguas no se encuentran compuestos orgánicos capaces de generar daño sobre el material genético de las células. En general se puede decir que la mayoría de las aguas superficiales tratadas con la tecnología PCFH no generan ningún efecto genotóxico sobre células animales.

Sin embargo, los resultados de las muestras AC Chaguaipe, AC Túquerres demuestran un efecto genotóxico, esto puede deberse al contenido de materia orgánica presente en la misma al momento de su recolección y puede ser esta materia orgánica la que esté generando la respuesta

genotóxica, Kocak (2015) afirma que los parámetros que influyen en la respuesta de este tipo de ensayos son muchos, por ejemplo la composición de las muestras, la naturaleza de los químicos utilizados en el proceso de Fenton, la naturaleza de la prueba de genotoxicidad, etc. Otro factor que puede estar explicando la genotoxicidad encontrada en las muestras ya mencionadas podría ser la procedencia de las aguas, ya que son zonas cuya actividad económica se basa en la agricultura y la ganadería, en donde se emplea grandes cantidades de agroinsumos los cuales podrían estar siendo arrastrados hasta los efluentes y sean estos compuestos los que generen el daño en el DNA de las células (Meléndez, Pardo, & Quijano, 2015).

Cabe destacar que las muestras de agua cruda de Chaguaipe y Túquerres al ser tratadas con la tecnología PCFH ya no presentan genotoxicidad, demostrándose la efectividad de este tipo de POA, probablemente porque los compuestos presentes en las muestras crudas que están produciendo efectos genotóxicos sobre la línea celular HepG2 se eliminan o se transforman en el proceso de tratamiento con la PCFH. En la literatura científica es común encontrar que las POAs no presentan genotoxicidad para los organismos y que los efluentes tratados con este tipo de procesos muestran considerables reducciones en los compuestos que pueden generar algún tipo de riesgo a nivel del DNA en los modelos biológicos empleados para su evaluación. Por ejemplo, Zhang y colaboradores (2014) demostraron que el proceso de coagulación de Fenton puede proporcionar un tratamiento integral para los efluentes, logrando reducir los niveles no solo de toxicidad sino también de genotoxicidad de los compuestos presentes en las muestras de agua debido a la mineralización de los mismos. Otro estudio que confirma la inocuidad y efectividad de este tipo de tratamientos sobre aguas superficiales y/o contaminadas es el de Na y colaboradores (2017) quienes demuestran que la genotoxicidad de los compuestos presentes en aguas residuales se ven significativamente reducida luego de someter a las aguas a un

tratamiento con un proceso de oxidación avanzada que involucra la combinación de ozono y el proceso de oxidación Fenton.

Por otra parte, en esta investigación se encontró que las diluciones de las muestras Tf de Charandú (IPI-G-037) y Pasto (PAS-G-017) con concentraciones de 1,14 mg COT/l y 1,29 mg COT/l respectivamente (Tabla 7) resultaron ser genotóxicas en contraste con su muestra original Tf, esto pudo deberse a que los componentes orgánicos presentes en la Tf al ser diluidos se facilite la movilidad de estos y por ende puedan interactuar y reaccionar de manera más fácil, pero debido a que no se cuenta con la caracterización de los compuestos presentes en las muestras de agua ni tampoco de los posibles productos intermedios que puedan formarse al ser tratadas con la tecnología PCFH, no es posible identificar con certeza cual o cuales son los factores responsables de dicha genotoxicidad.

Otro punto a destacar es, que pese a que en la literatura se ha reportado que el H_2O_2 causa daño sobre el DNA y que generalmente este compuesto es usado como control positivo en el ensayo cometa debido a los daños que causa en las células (Neira , Vera, & Escobar, 2016; Yañez, Quijano Parra, & Meléndez Gélvez, 2017), los resultados encontrados en este trabajo para el control de H_2O_2 fueron negativos para un efecto genotóxico sobre la línea celular, esto debido a que las concentraciones que se adicionan al momento de realizar el tratamiento de las aguas con la tecnología PCFH son muy bajas, y además como se evidencia en la Tabla 4 el 100% del H_2O_2 reaccionó por ello no se encuentran remanentes de este compuesto que pudo generar efectos genotóxicos.

En general se observó que las aguas superficiales tratadas con la tecnología PCFH no presentaron efecto genotóxico, pero en las muestras Charandú (IPI-G-037) y Pasto (PAS-G-017) en las cuales se comprobó eran genotóxicos el efecto fue ligero o moderado, lo que sugiere que

se profundice y complemente este trabajo con otro tipo de ensayos que ayuden a clarificar la naturaleza y procedencia de las aguas y como estas reaccionan ante el tratamiento con la tecnología PCFH, puesto que se pudo descartar que compuestos agregados como el H_2O_2 estén influyendo en la respuesta genotóxica.

CONCLUSIONES

- La tecnología de oxidación catalítica en fase húmeda (PCFH) aplicada a las muestras evaluadas en el presente trabajo no generó ningún efecto citotóxico para células procariotas y eucariotas, esto debido probablemente a la efectividad de la tecnología en la eliminación de ciertos contaminantes y que pese a desconocer si existe o no la formación de subproductos estos no generan la muerte celular.
- No se demostró un comportamiento dosis-efecto que es la generalidad en este tipo de estudios, en donde a mayor concentración o dosis de la sustancia evaluada mayor efecto sobre el modelo biológico, pero aquí se puede evidenciar que las aguas tratadas con la tecnología PCFH de las localidades de Chaguaipe (IPI-G-038), Charandú (IPI-G-037), Ipiiales (IPI-G040) y Pasto (PAS-G-017), algunas concentraciones de mg COT/L resultaron tener efectos mutagénicos y/o genotóxicos.
- Las muestras de aguas Chaguaipe (IPI-G-038), Ipiiales (IPI-G040) y Pasto (PAS-G-017) tratadas con la tecnología PCFH presentaron un efecto mutagénico directo, lo que quiere decir que se posiblemente se están generando mutágenos directos que están causando cambios en el marco de lectura, puesto que sus efectos se evidenciaron principalmente en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.
- Los resultados del ensayo Cometa demuestran que casi todas las muestras tratadas con la tecnología PCFH no presentan efectos genotóxicos, salvo en las concentraciones 1,14 mg COT/L y 1,29 mg COT/L de Charandú (IPI-G-037) y Pasto (PAS-G-017) respectivamente, que mostraron ser ligeramente y moderadamente genotóxicas, lo que indica que se están formando compuestos genotóxicos que están desencadenando esta respuesta.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en donde se pueda determinar los componentes y posibles subproductos que se encuentren en las aguas tratadas con la tecnología PCFH, para lograr establecer los principales causales de las respuestas genotóxicas y mutagénicas en las pruebas realizadas en este trabajo.
- Realizar ensayos complementarios de mutagenicidad y genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, para lograr establecer la bioseguridad e inocuidad de la tecnología PCFH en el tratamiento de aguas superficiales.
- Se debe complementar el Test de Ames para probar acción de mutágenos indirectos que necesiten de activación metabólica, por ello es necesario realizar esa prueba con la fracción S9 con las cepas TA100 y TA98.
- Para saber a qué tiempo se generan los componentes responsables de la actividad mutagénica y genotóxica se debe realizar ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad a lo largo de la realización del test catalítico.

REFERENCIAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2015). *Resumen De Salud Pública. Nitrato y Nitrito*. Departamento De Salud Y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública .
- Albaladejo Vicente, R., Villanueva Orbaiz, R., Ortega Molina , P., Astasio Arbiza, P., Gil Miguel, A., Granados Arroyo, B., . . . Domínguez Rojas, V. (1995). Evaluación de la Actividad Mutagénica de Aguas de Consumo Público por Medio del Test de Ames. *Rev Esp Salud Pública*, 69(5), 393-408.
- Ames, B. N., Lee, F. D., & Durston, W. E. (March de 1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70(3), 782-786.
- Ames, B. N., McCann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 31, 347-364.
- Bautista, P., Mohedano, A., Gilarranz, M., & Baut, P. (2007). Application of Fenton oxidation to cosmetic wastewaters treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 128–134.
- Beleño, R., Quijano, A., & Meléndez , I. (2013). Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM2.5 en Cúcuta, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*(18), 3731-3737.
- Bergamaschi, B., Rodrigues, M. T., Silva, J. S., Kluge, M., Luz, R. B., Fleck, J. D., . . . Spilki, F. R. (2015). Moving beyond classical markers of water quality: detection of enteric viruses and genotoxicity in water of the Sinos River. *Braz. J. Biol.*, 75(2), 63-67.

- Bertanza, G., Papa, M., Pedrazzani, R., Repice, C., Mazzoleni, G., Steimberg, N., . . . Zerbini, I. (2013). EDCs, estrogenicity and genotoxicity reduction in a mixed (domestic + textile) secondary effluent by means of ozonation: A full-scale experience. *Science of the Total Environment*, 458-460, 160-168.
- Brienza, M., Mahdi Ahmed, M., Escande, A., Plantard, G., Scrano, L., Chiron, S., . . . Goetz, V. (2016). Use of solar advanced oxidation processes for wastewater treatment: Follow-up on degradation products, acute toxicity, genotoxicity and estrogenicity. *Chemosphere*, 148, 473-480.
- Brugés, K., & Reguero Reza, M. T. (Julio de 2007). Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 5-13.
- Calderón, J., Capell, C., Centrich, F., Artazcoz, L., González-Cabré, M., & Villalbí, J. R. (2002). Subproductos halogenados de la cloración en el agua de consumo público. *Gac Sanit*, 16(3), 241-243.
- Campuzano, C. P., Roldán Pérez, G., Guhl Nanneti, E., & Sandoval Pedroza, J. M. (2012). Una visión al estado del recurso hídrico en Colombia. En A. Foro Consultivo Científico y Tecnológico, J. P. Laclette, & P. Zúñiga (Edits.), *Diagnóstico del Agua en las Américas* (A. M. Ciencias, Trad., págs. 206-207). México D.F., México.
- Castillo Ledezma, J. H., López-Malo Vigil, A., & Bandala, E. R. (2010). Desinfección de agua mediante el uso de tecnologías emergentes basadas en procesos avanzados de oxidación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(1), 74-83.

- Chulluncuy Camacho, N. C. (2011). Tratamiento de agua para consumo humano. *Ingeniería Industrial*(29), 153-170.
- Costa Miranda, A., Lepretti, M., Rizzo, L., Caputo, I., Vaiano, V., Sacco, O., . . . Sannino, D. (2016). Surface water disinfection by chlorination and advanced oxidation processes: Inactivation of an antibiotic resistant E. coli strain and cytotoxicity evaluation. *Science of the Total Environment*, 6(1), 554-555.
- DANE. (2009). *Estudios Postcensales No. 7*. Bogotá.
- de Ciurana Gay, C. (2000). Dióxido de cloro y su efecto en la formación de trihalometanos. *Revista Tecnología del Agua*,, 74-81.
- De Miguel Fernández, C., & Vázquez Taset, Y. M. (Julio-Septiembre de 2006). Origen de los Nitratos (NO₃) y Nitritos (NO₂) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería y Geología*, 22(3), 1-9.
- Dehn, P. F., White, C. M., Connors, D. E., Shipkey, G., & Cumbo, T. A. (Mayo-Junio de 2004). Characterization of the Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line as an In Vitro Model for Cadmium Toxicity Studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Animal*, 40, 172-182.
- Delgado-Linares, J. G., Gutiérrez, C., Salazar, F., Guevara, M., Mercado, R., & Pereira, J. C. (2013). Aplicación de conceptos clásicos de la Física en la práctica ingenieril. La ley de Stokes como herramienta conceptual en el análisis de procesos de deshidratación del petróleo. *Educ. quím.*, 24(1), 57-62.

- Doménech, J. (Mayo de 2004). Ozono frente a cloro. Desinfección y desinfectantes del agua para consumo humano. *OFFARM*, 23(5), 120-126.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Forero, J. E., Ortiz, O. P., & Rios, F. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *CT&F*, 3(1), 97-109.
- Francis, R. A., Small, M. J., & VanBriesen, J. M. (2009). Multivariate distributions of disinfection by-products in chlorinated drinking water. *water research*, 43, 3453-3468.
- Galeano, L. A., Bravo, P. F., Luna, C. D., Vicente, M. Á., & Gil, A. (2012). Removal of natural organic matter for drinking water production by Al/Fe-PILC-catalyzed wet peroxide oxidation: Effect of the catalyst preparation from concentrated precursors. *Applied Catalysis B: Environmental*, 527– 535.
- Galeano, L. A., Gil, A., & Vicente, M. A. (2011). Strategies for immobilization of manganese on expanded natural clays: Catalytic activity in the CWPO of methyl orange. *Applied Catalysis B: Environmental*, 104, 252-260.
- García, A. M., Torres Palma, R. A., Galeano, L. A., Vicente, M. Á., & Gil, A. (2018). Separation and Characterization of NOM Intermediates Along AOP Oxidation. En A. Gil, L. A. Galeano, & M. Á. Vicente (Edits.), *Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment* (pág. 109). Springer.

- García, M., Sánchez, F. D., Marín, R., Guzmán, H., Werdugo, N., Domínguez, E., . . . Cortés, G. (2001). El Agua. En IDEAM, & P. Leyva (Ed.), *El Medio Ambiente en Colombia* (2 ed., págs. 118-184). Bogotá.
- García-Villanova, R. J. (2016). *Subproductos de desinfección-cloración del agua. Precursores, formación, toxicología y epidemiología* (1 ed.). Salamanca: Amarante.
- Ghauch, A. (2017). Editorial: The importance of advanced oxidation processes in degrading persistent pollutants. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 20(1).
doi:10.1515/jaots-2016-0197
- Ghosh, M., & Godderis, L. (2016). Genotoxicity of Ethylene oxide: a review of micronucleus assay results in human population. *Mutation Research*, 84-91.
doi:http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.mrrev.2016.05.002
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (Julio-Diciembre de 2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52-73.
- Glei, M., Schneider, T., & Schlörmann, W. (2016). Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol*, 2315-2336. doi:DOI 10.1007/s00204-016-1767-y
- González, J. (2014). *El acceso al agua potable como derecho humano*. Alicante, España: Editorial Club Universitario.
- Granados, B., Albaladejo, R., Villanueva, R., Anadón, M., & Domínguez Rojas, V. (2004). Mutagenicidad en aguas de consumo mediante el test de reversión trp- en *Escherichia coli*. *Rev. Toxicol.*, 21, 87-91.

- Grisales, P. D., Ortega López, J., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Remoción de la Materia Orgánica y Toxicidad en Aguas Residuales Hospitalarias Aplicando Ozono. *Dyna*(173), 109-115.
- Guimarães, J. R., Guadagnini, R. A., Bueno Franco, R. M., & Urbano dos Santos, L. (2016). Inactivation of *Clostridium perfringens*, Total Coliforms, and *Escherichia coli* by UV/H₂O₂ in Wastewater Treatment Plant Effluent. *J. Adv. Oxid. Technol.*, 19(1), 93-97.
- Guttman, E., García, J. A., Cuervo, P., & Arango, G. (2001). La población, los asentamientos y el medio ambiente. En IDEAM, & P. Leyva (Ed.), *El Medio Ambiente en Colombia* (2 ed.). Bogotá.
- Guzmán, B. L., Nava, G., & Dias, P. (2015). La calidad del agua para consumo humano y su asociación con la morbimortalidad en Colombia, 2008-2012. *Biomédica*, 35, 177-190.
- Gyoriac, B., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P., Hsu, D., & Clement, M.-V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.
- Hailu, D., & Tsukada, R. (Agosto de 2009). Equitable Access to Basic Utilities: An Overview. *Poverty in Focus*(18), 3-5.
- Hernández Sánchez, C., González, L., Rubio Armendáriz, C., Canallero Mesa, J. M., Ben-Charki El-Mousati, N., & Hardison de la Torre, A. (2011). Trihalometanos en aguas de consumo humano. *Rev. Toxicol.*, 28, 109-114.

- Herney-Ramirez, J., Vicente, M. A., & Madeira, L. M. (2010). Heterogeneous photo-Fenton oxidation with pillared clay-based catalysts for. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98, 10-26.
- IDEAM. (2013). *zonificación y codificación de uniades hidrográficas e hidrogeológicas de Colombia*. (N. O. Vargas Martínez, & M. García Herrán, Edits.) Bogotá.
- Iqbal, M., & Nisar, J. (2015). Cytotoxicity and mutagenicity evaluation of gamma radiation and hydrogen peroxide treated textile effluents using bioassays. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3, 1912-1917.
- Karci, A., Arslan-Alaton, I., Bekbolet, M., Ozhan, G., & Alpertunga, B. (2014). H₂O₂/UV-C and Photo-Fenton treatment of a nonylphenol polyethoxylate in synthetic freshwater: Follow-up of degradation products, acute toxicity and genotoxicity. *Chemical Engineering Journal*, 241, 43-51.
- Kern, D. I., Schwaickhardt, R. d., Mohr, G., Lobo, E. A., Kist, L. T., & Machado, Ê. L. (2013). Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. *Science of the Total Environment*, 443, 266-572.
- Kiskinis, E., Suter, W., & Hartmann, A. (2002). Hig throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis*, 17(1), 37-43.
- Klauck, C. R., Giacobbo, A., Lorenz de Oliveira, E. D., Basso da Silva, L., & Siqueira Rodrigues, M. A. (2017). Evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of landfill leachate treated by biological lagoon and advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 6188-6193.

- Kocak, E. (2015). Investigation of potential genotoxic activity using the SOS Chromotest for real paracetamol wastewater and the wastewater treated by the Fenton process. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13(1), 66.
- Leal Ascencio, M. T. (2005). Tecnologías convencionales de tratamiento de agua y sus limitaciones. En M. C. Apella , P. Z. Araujo, J. Blanco Gálvez, M. A. Blesa, R. J. Candal, M. Collares-Pereira, . . . L. Villén , M. A. Blesa, & J. Blanco Gálvez (Edits.), *Solarsafewater: Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua* (págs. 63-71). Buenos aires.
- Legrini, O., Oliveros, E., & Braun, A. M. (1993). Photochemical Processes for Water Treatment. *Chem. Rev.*, 93(2), 671-698.
- Li, B., Xu, X., Zhu, L., Ding, W., & Mahmood, Q. (2010). Catalytic ozonation of industrial wastewater containing chloro and nitro aromatics using modified diatomaceous porous filling. *Desalination*, 254, 90-98.
- Lorenzo-Acosta, Y. (2006). Estado del arte del tratamiento de aguas por coagulación-floculación. *ICIDCA*(2), 10-17.
- Lv, X., Lu, Y., Yang, X., Dong, X., Ma, K., Xiao, S., . . . Tang, F. (2015). Mutagenicity of drinking water sampled from the Yangtze River and Hanshui River (Wuhan section) and correlations with water quality parameters. *Sci. Rep.*, 5, 9572. doi:10.1038/srep09572
- Magdeburg, A., Stalter, D., Schlüsener, M., Ternes, T., & Oehlmann, J. (2014). Evaluating the efficiency of advanced wastewater treatment: Target analysis of organic contaminants and (geno-)toxicity assessment tell a different story. *Water research*, 50, 35-47.

Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*(113), 173-215.

Meléndez Gélvez, I., Martínez Montañez , M. L., & Quijano, P. A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2,5, en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25(4), 347-356.

Meléndez Gélvez, I., Quijano Vargas, M. J., & Quijano Parra, A. (2016). Actividad Mutagénica Inducida por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestrars de PM2.5 en un Sector residencial de Villa del Rosario-Norte de Santander, Colombia. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 32(4), 435-444.

Meléndez, I., Pardo, E., & Quijano, A. (2015). Actividad Genotóxica de Aguas Antes y Despues de Clorar en la Planta de Potabilización EMPOPAMPLONA. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 13(2), 12-23.

Meléndez, I., Zuleta, M., Marín, I., Calle, J., & Salazar, D. (Septiembre de 2001). Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta de Villa Hermosa, Medellín. *IATREIA*, 14(3), 167-175.

Miklos, D. B., Remy, C., Jekel, M., Linden, K. G., Drewes, J. E., & Hübner, U. (2018). Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment - A critical review. *Water Research*, 139, 118-131.

Ministerio de la Protección Social & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (22 de Junio de 2007). Resolución Número 2115. *Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias*. Bogotá, Colombia.

- Ministerio de Medio Ambiente. Secretaría de Estado de Aguas y Costas. Dirección General de Obras Hidráulicas y Calidad de las Aguas. (2000). La Situación Actual Y Los Problemas Existentes Y Previsibles. En M. d. Aguas., *Libro Blanco del Agua*. España.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Subdirección de Salud Ambiental. (2015). *Informe Nacional de la Calidad del Agua Para Consumo Humano Año 2014*. Bogotá.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Subdirección de Salud Ambiental. (2018). *Informe Nacional de Calidad del Agua Para Consumo Humano INCA 2016*. Bogotá.
- Ministerio de la Protección Social. (09 de Mayo de 2007). Decreto Número 1575 de 2007. *Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano*. Bogotá, Colombia.
- Moller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M., & Collins, A. (2014). On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in genetics*, 217.
doi:doi:10.3389/fgene.2014.00217
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 19-60.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*(65), 55-63.
- Na, C., Zhang, Y., Quan, X., Chen, S., Liu, W., & Zhang, Y. (2017). Evaluation of the detoxification efficiencies of coking wastewater treated by combined anaerobic-anoxic-oxic (A2O) and advanced oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, 338, 186-193.

- Neira , L. F., Vera, A. M., & Escobar, P. (2016). Genotoxicidad del nifurtimox en diferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. *Rev. Méd. Risaralda*, 3-8.
- OECD. (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. En *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. París: OECD Publishing.
doi:dx.doi.org/10.1787/9789264071247-en
- OECD. (2016). Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. En OECD, *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. París: OECD Publishing.
doi:dx.doi.org/10.1787/9789264264885-en
- Oliva Uc, J., Giacomani Vallejos, G., & Pérez Cortés, M. (2008). Estudio de la dinámica de sedimentación de lodos mediante un sistema óptico. *Ingeniería*, 12(2), 17-29.
- Olmedo Sánchez, M. T. (2008). Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro. Efectos sobre la salud. *Hig. Sanid. Ambient.*, 8, 335-342.
- Othax, N., Peluso, F., & Gonzales Castelain, J. (2014). Riesgo a la Salud Integrado por Fluoruros, Nitratos y Arsénico en Agua Subterránea: Caso del Partido de Tres Arroyos, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 27-41.
- Perdigón Melón, J., Carbajo, J., Petre, A., Rosal, R., & García Calvo, E. (2010). Coagulation–Fenton coupled treatment for ecotoxicity reduction in highly polluted industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 181, 127–132.
- Pérez vidal, A., Torres Lozada, P., & Cruz Vélez, C. H. (Diciembre de 2009). Planes de seguridad del agua. Fundamentos y perspectivas de implementación en Colombia. *Revista Ingeniería E Investigación*, 29(3), 79-85.

- Pérez-Landeiro, A., Allende-Bandrés, M. A., Agustín Fernández, M. J., & Palomo Palomo, P. (2002). Teratogénesis: clasificaciones. *FARMACIA HOSP*, 26(3), 171-177.
- Plošnik, A., Vračko, M., & Sollner Dolenc, M. (2016). Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. *Arh Hig Rada Toksikol*, 67, 169-182. doi:DOI: 10.1515/aiht-2016-67-2801
- Porta, C. S., dos Santos, D. L., Vieira Bernardes, H., Correa Bellagamba, B., Duarte, A., Ferraz Dias, J., . . . Rodrigues Dihl, R. (2017). Cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluation of surface waters from a coal exploration region. *Chemosphere*, 440-448.
- Ramírez Vázquez, E., Paredes Xochihua, M. P., Pérez Mejía, S., & Jiménez Romero, M. (Diciembre de 2015). Ensayo de micronúcleos en células meristemáticas de haba (*Vicia faba* L.) por efecto de descargas de la industria textil. *Revista Virtual Pro*(167).
- Ramírez, J. H., Galeano, L. A., Pinchao, G., Bedoya, R. A., & Hidalgo, A. (2018). Optimized CWPO phenol oxidation in CSTR reactor catalyzed by Al/Fe-PILC from concentrated precursors at circumneutral pH. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2429–2441.
- Repetto Jiménez, M., & Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental* (4 ed.). Diaz de Santos.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2012). La aplicación de procedimientos in vitro en la evaluación toxicológica alimentaria. En A. Alegría , A. Anadón, R. Balaña, R. Barberá, J. Bello, M. Bettini, . . . M. C. García-Parrilla, A. M. Cameán, & M. Repetto (Edits.), *Toxicología Alimentaria* (1 ed., Vol. 1, págs. 115-121). Madrid: Diaz de Santos.

- Rodriguez, T., Botelho, D., & Cleto, E. (Diciembre de 2008). Tratamiento de efluentes industriales de naturaleza recalcitrante usando ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*(46), 24-38.
- Rodriguez, T., Botelho, D., & Cleto, E. (Diciembre de 2008). Tratamiento de efluentes industriales de naturaleza recalcitrante usando ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*(46), 24-38.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*, 35(2), 184-194.
- Romero, M. (2008). Tratamientos Utilizados en Potabilización de Agua. *Boletín Electrónico No. 08*, 1-12.
- Rubio-Clemente, A., Chica, E. L., & Peñuela, G. A. (2014). Aplicación del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquímico. *Ingeniería y Competitividad*, 16(2), 211-223.
- Salas C., G. (2010). Tratamiento por Oxidación Avanzada (reacción Fenton) de Aguas Residuales de la Industria Textil. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 13(1), 30-38.
- Sánchez Zafra, A. (2008). Efectos de los trihalometanos sobre la salud. *Hig. Sanid. Ambient.*, 8, 280-290.
- Sanchez, L., Guz, L., García, P., Ponce, S., Goyanes, S., Marchi, M. C., . . . Rodriguez, J. (2015). Synthesis and Characterization of ZnO Nanorod Films on PET for Photocatalytic Disinfection of Water. *J. Adv. Oxid. Technol.*, 18(2), 246-252.

- Sanz, J., Lombraña, J. I., & de Luis, A. (2013). Estado del arte en la oxidación avanzada a efluentes industriales: nuevos desarrollos y futuras tendencias. *Afinidad LXX*, 561, 25-33.
- Strober, W. (1997). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*.
- Tejs, S. (2008). The Ames test: a methodological short review. *ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY*, 4(1), 7-14.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Sasaki, Y. F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Tobón, F., & López, L. (2011). Genotoxicidad del agua contaminada por plaguicidas en un área de Antioquia. *Rev.MVZ Córdoba*, 16(2), 2605-2615.
- Tobón, F., & López, L. (2011). Genotoxicidad del agua contaminada por plaguicidas en un área de Antioquia. *Rev.MVZ Córdoba*, 16(2), 2605-2615.
- Toledo, A. (Julio-Septiembre de 2002). El agua en México y el mundo. *Gaceta Ecológica*(64), 9-18.
- Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E., & Rizzotto, M. (2006). Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm. Bonaerense*, 25(1), 139-144.
- Villamizar, N. T., Orozco, L. J., & Meléndez, I. (2014). Mutagenicidad de aguas antes y después de clorar en la planta de potabilización Empopamplona. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 03-13.

- Villanueva, C. M., Kogevinas, M., & Grimalt, J. O. (2001a). Cloración del agua potable y efectos sobre la salud: revisión de estudios epidemiológicos. *Med Clin*, *117*(1), 27-36.
- Villanueva, C. M., Kogevinasa, M., & Grimalt, J. O. (2001b). Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. *Gac Sanit*, *15*(1), 48-53.
- Vivas, A. H., Arboleda, M. A., Sanchez, R., Beitez-Campo, N., Bravo, E., Soto, A., . . . Larmat, F. E. (2014). Evaluación de la mutagenicidad causada por metales pesados presentes en agua del río Cauca en la ciudad de Cali, Colombia. *Rev. Colomb. Quim.*, *43*(2), 18-24.
- WHO. (2011). *Guidelines for drinking-water quality* (4 ed.). Gutenberg.
- Yáñez, M., & Acevedo, K. (2013). El Acceso al Agua para Consumo Humano en Colombia. *Revista de Economía Institucional*, *15*(29), 125-148.
- Yañez, L. F., Quijano Parra, A., & Meléndez Gélvez, I. (Enero-Junio de 2017). Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de durazno, *Prunus persica* cultivados en Pamplonita Norte de Santander. *Ciencia en Desarrollo*, *8*(1), 83-91.
- Zhang, J., Chen, S., Zhang, Y., Quan, X., Zhao, H., & Zhang, Y. (2014). Reduction of acute toxicity and genotoxicity of dye effluent using Fenton-coagulation process. *Journal of Hazardous Materials*, *274*, 198-204.
- Zuleta, M., Uribe, Y., Valencia, C., Vargas, H., Orozco, L. Y., & López, C. (2004). Contribución de la Contaminación y Cloración en la Mutagenicidad, Genotoxicidad y Presencia de Mutágenos en Agua Potable. *Actual Biol*, *26*(81), 125-136.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.

 Universidad de Nariño	SECCIÓN DE LABORATORIOS INFORME DE RESULTADOS	Código: LBE-PRS- Página: 1 Versión: 03 Vigente a partir de : 2014-05-19			
"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"					
FECHA EMISIÓN RESULTADOS: 2018-03-23		REPORTE No: LAQ-R-31A-18			
ÁREA: LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AGUAS					
DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS			
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACION DE LA TECNOLOGIA DE OXIDACION AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POPTABLE EN EL DEPARTAMENTO UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestra: AGUA CRUDA			
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo: SIMPLE			
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma: IPIALES			
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo: EXTERNO: ORLANDO CASTRO			
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo: 2018-03-08			
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio: 2018-03-09			
TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS		FISICOQUIMICO PARCIAL			
Código Muestra LAQ-62-18	Descripción				
	CHARANDÚ-IPIALES				
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS	CODIGO MUESTRA
					LAQ-62-18
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-03-09	21,0
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEPELOMETRICA	NTU	2018-03-09	10,50
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	42,3
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	33,5
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 CL- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-03-09	3,00
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-03-12	0,07
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-03-09	<0,1
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-03-09	<0,005
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3 - B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-03-09	0,998
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-03-09	<15
OBSERVACIONES					
DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME			FIN INFORME DE RESULTADOS		

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA



Universidad de
Nariño

SECCIÓN DE LABORATORIOS
INFORME DE RESULTADOS

Código: LBE-PRS-
Página: 1
Versión: 03
Vigente a partir de :
2014-05-19

"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"



FECHA EMISIÓN RESULTADOS: **2018-03-23** REPORTE No: **LAQ-R-31C-18**

ÁREA: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AGUAS**

DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS	
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACION DE LA TECNOLOGIA DE OXIDACION AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POTABLE EN EL DEPARTAMENTO	Tipo de Muestra:	AGUA CRUDA
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo:	SIMPLE
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma:	IPIALES
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo:	EXTERNO: ORLANDO CASTRO
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo:	2018-03-08
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio:	2018-03-09

TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS: **FISICOQUIMICO PARCIAL**

Código Muestra LAQ-64-18	Descripción					CODIGO MUESTRA LAQ-64-18
	CHAGUAIBE-IPIALES					
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS		
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-03-09	89,8	
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEPELOMETRICA	NTU	2018-03-09	32,7	
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	88,78	
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	55,0	
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 Cl- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-03-09	5,25	
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-03-12	0,21	
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-03-09	0,14	
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-03-09	0,022	
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3 - B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-03-09	<0,1	
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-03-09	11,62	

OBSERVACIONES

DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME: **FIN INFORME DE RESULTADOS**

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN PREVIA AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO



Universidad de
Nariño

SECCIÓN DE LABORATORIOS
INFORME DE RESULTADOS

Código: LBE-PRS-
Página: 1
Versión: 03
Vigente a partir de :
2014-05-19

"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"



FECHA EMISIÓN RESULTADOS: **2018-03-23** REPORTE No: **LAQ-R-31B-18**

ÁREA: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AGUAS**

DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS	
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACION DE LA TECNOLOGIA DE OXIDACION AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POPTABLE EN EL DEPARTAMENTO	Tipo de Muestra:	AGUA CRUDA
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo:	SIMPLE
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma:	IPIALES
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo:	EXTERNO: ORLANDO CASTRO
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo:	2018-03-08
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio:	2018-03-09

TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS: **FISICOQUIMICO PARCIAL**

Código Muestra LAQ-63-18	Descripción				
	LA OREJUELA-IPIALES				
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS	CODIGO MUESTRA
					LAQ-63-18
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-03-09	25,1
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEFELOMETRICA	NTU	2018-03-09	2,80
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	22,08
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	27,0
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 CL- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-03-09	7,25
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-03-12	0,05
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-03-09	<0,1
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-03-09	<0,005
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3- B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-03-09	0,736
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-03-09	<10

OBSERVACIONES

DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME: **FIN INFORME DE RESULTADOS**

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN PREVIA AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO



SECCIÓN DE LABORATORIOS
INFORME DE RESULTADOS

Código: LBE-PRS-
Página: 1
Versión: 03
Vigente a partir de :
2014-05-19

"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"



FECHA EMISIÓN RESULTADOS: **2018-03-23** REPORTE No: **LAQ-R-31D-18**

ÁREA: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AGUAS**

DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS	
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACION DE LA TECNOLOGIA DE OXIDACION AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POTABLE EN EL DEPARTAMENTO	Tipo de Muestra:	AGUA CRUDA
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo:	SIMPLE
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma:	IPIALES
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo:	EXTERNO: ORLANDO CASTRO
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo:	2018-03-08
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio:	2018-03-09

TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS: **FISICOQUIMICO PARCIAL**

Código Muestra LAQ-65-18	Descripción				
	EMPOOBANDO-IPIALES				
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS	CODIGO MUESTRA
					LAQ-65-18
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-03-09	<8
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEFELOMETRICA	NTU	2018-03-09	0,55
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	49,7
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-03-09	100,0
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 Cl- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-03-09	21,62
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-03-12	0,18
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-03-09	<0,1
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-03-09	<0,005
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3 - B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-03-09	0,736
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-03-09	86,88

OBSERVACIONES

DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME: **FIN INFORME DE RESULTADOS**

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN PREVIA AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO



Universidad de
Nariño

SECCIÓN DE LABORATORIOS
INFORME DE RESULTADOS

Código: LBE-PRS-
Página: 1
Versión: 03
Vigente a partir de :
2014-05-19

"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"



FECHA EMISIÓN RESULTADOS: **2018-04-17** REPORTE No: **LAQ-R-51A-18**

ÁREA: **LABORATORIO DE ANALISIS QUÍMICO Y AGUAS**

DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS	
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE OXIDACIÓN AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POTABLE EN EL DEPARTAMENTO	Tipo de Muestra:	AGUA CRUDA
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo:	SIMPLE
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma:	PASTO
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo:	EXTERNO: ORLANDO CASTRO
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo:	2018-04-05
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio:	2018-04-05

TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS: **FISICOQUÍMICO PARCIAL**

Código Muestra LAQ-123-18	Descripción				
	PLANTA EMPOPASTO CENTENARIO PAS-G-017				
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS	CODIGO MUESTRA
					LAQ-123-18
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-04-05	<8
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEFLOMETRICA	NTU	2018-04-05	0,60
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-04-05	11,34
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-04-05	30,5
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 Cl- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-04-05	12,41
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-04-05	0,03
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-04-05	<0,1
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-04-05	<0,005
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3 - B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-04-05	0,988
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-04-05	<5

OBSERVACIONES

DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME

FIN INFORME DE RESULTADOS

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN PREVIA AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO



Universidad de
Nariño

SECCIÓN DE LABORATORIOS
INFORME DE RESULTADOS

Código: LBE-PRS-
Página: 1
Versión: 03
Vigente a partir de :
2014-05-19

"Laboratorio Acreditado por el IDEAM para los parámetros, pH, GRASAS Y ACEITES, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO, según Resolución No 3566 del 11 de diciembre de 2014"



FECHA EMISIÓN RESULTADOS: 2018-04-16 REPORTE No: LAQ-R-48A-18

ÁREA: LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AGUAS

DATOS USUARIO		DATOS MUESTRAS	
Solicitante:	DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE OXIDACIÓN AVANZADA PCFH PARA MEJORAR LA CALIDAD DE AGUA POTABLE EN EL DEPARTAMENTO UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestra:	AGUA CRUDA
Dirección:	UNIVERSIDAD DE NARIÑO	Tipo de Muestreo:	SIMPLE
Teléfono:	3184079325 -3113086123	Sitio de Toma:	TUQUERRES
nit:	800118954-1	Responsable del Muestreo:	EXTERNO: ORLANDO CASTRO
e-mail:	alejandrogaleano@udenar.edu.co	Fecha de Muestreo:	2018-04-03
Solicitud No:	LAQ-C-76-17	Fecha Recepción Muestra en Laboratorio:	2018-04-03

TIPO DE ANÁLISIS SOLICITADOS: FÍSICOQUÍMICO PARCIAL

Código Muestra	Descripción				
LAQ-92-18	PLANTA EMPESA TUQ-G-017				
PARAMETRO	METODO	TECNICA	UNIDAD DE MEDIDA	FECHA DE ANALISIS	CODIGO MUESTRA
					LAQ-92-18
COLOR APARENTE	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2120 - C	COLORIMETRICA	UPC	2018-04-03	22,2
TURBIEDAD	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2130 - B	NEFELOMETRICA	NTU	2018-04-03	1,50
ALCALINIDAD TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2320 - B	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-04-03	12,2
DUREZA TOTAL	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 2340 - C	TITULOMETRICA	mg CaCO3/ L	2018-04-03	38,9
CLORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 Cl- B	TITULOMETRICA	mg Cl/ L	2018-04-03	2,48
FLUORUROS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 F - C	COLORIMETRICA	mg F/ L	2018-04-03	0,06
FOSFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 P- D	COLORIMETRICA	mg P-PO4/ L	2018-04-03	<0,1
NITRITOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO2- B	COLORIMETRICA	mg N-NO2/ L	2018-04-03	<0,005
NITRATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 NO3 - B	COLORIMETRICA	mg N-NO3/ L	2018-04-03	0,223
SULFATOS	ESTANDAR METODOS EDICION No 22 4500 SO4- E	TURBIDIMETRICA	mg SO4/ L	2018-04-03	27,63

OBSERVACIONES

DESVIACIONES / EXCLUSIONES / ACLARACIONES AL INFORME

FIN INFORME DE RESULTADOS

LOS RESULTADOS SON VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA

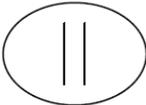
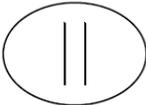
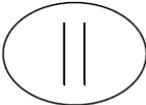
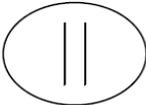
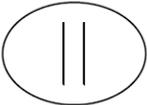
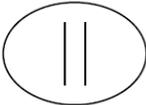
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN PREVIA AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO

Anexo 2. Protocolo Para confirmación de marcas de Salmonella typhimurium.

Este procedimiento se hace:

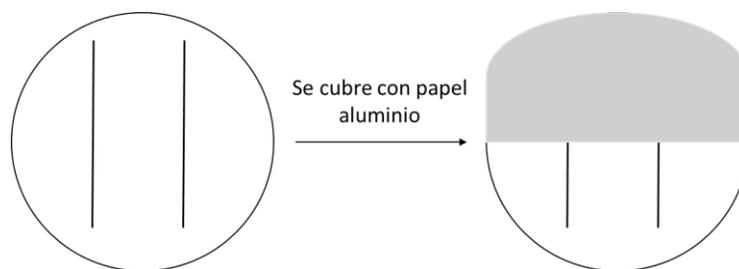
- ✓ Inmediatamente después de recibir un cultivo
- ✓ Cuando se almacenan las cepas congeladas o liofilizadas
- ✓ Cuando el número de revertantes se sale del rango normal
- ✓ Cuando se pierde sensibilidad a mutágenos conocidos
- ✓ Siempre que se hacen cajas maestras.

Marca 1: Requerimiento de histidina, se debe demostrar que la cepa es his⁻ en cajas de agar mínimo selectivo, las cepas requieren además biotina. Se sembró con asa sembrar en las cajas haciendo dos líneas paralelas como muestra en el Esquema marca 1, este procedimiento se hizo en agar mínimo enriquecido con glucosa, agar mínimo con glucosa y biotina y en agar mínimo enriquecido con histidina/biotina. Posteriormente se incubo toda la noche a 37° C. esta marca dio positivo para las cajas con agar histidina/biotina.

	Esquema marca 1		Resultado
Agar mínimo			No crecimiento
Agar mínimo/biotina			No crecimiento
Agar mínimo/histidina/biotina			Crecimiento

Marca 2: Confirmar mutación *rfa* (mutación en polisacáridos de la pared, sensibilidad al cristal violeta), El cristal violeta es un colorante tóxico de alto peso molecular, sólo penetra en bacterias muertas. Si la mutación *rfa* está presente, las bacterias son sensibles al efecto letal del colorante ya que son permeables al mismo. Para esto se inoculo dos cajas con agar nutritivo con cada cepa y un disco con cristal violeta. Se adicionó 100 µL de cultivo fresco a 3 mL de top agar fundido a 45°C, sin histidina ni biotina y se sembró en cajas con agar nutritivo, asegurándose de distribuir el top agar uniformemente en la caja. Una vez solidificado el top agar con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel de filtro de 0.6 mm impregnados con 10 µL de cristal violeta (1mg/mL), se incubo por 24 h a 37°C. Se observó un halo de inhibición de crecimiento alrededor del filtro de aproximadamente 14 mm, debido a que el cristal violeta penetra a la bacteria e inhibe su crecimiento, confirmando que la mutación continua presente.

Marca 3: Confirmar mutación *uvrB*, sensibilidad a la luz ultravioleta (UV). Con un asa se sembró la cepa en la caja de agar nutritivo siguiendo el patrón del esquema, se cubrió la mitad de la caja con papel de aluminio y se expuso a la lámpara UV durante 1-5 minutos, se incubó a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo se observó que en la parte tapada con papel aluminio hubo crecimiento y en la parte destapada no crecieron las bacterias (zona no irradiada).



Marca 4: Confirmar el factor R resistencia al antibiótico Ampicilina en TA98, TA100. Se sembró la cepa en cajas con agar mínimo histidina/biotina/ampicilina. Se incubó durante 24 h a 37°C, en

este se observó crecimiento de ambas cepas, estas cajas fueron usadas como cajas maestras por ello se conservaron a 4°C.

Anexo 3. *Diluciones seriadas utilizadas en los ensayos.*

- Charandú (IPI-G-037)

Concentración de COT en diluciones (mg/l)	Factor de Dilución
4,56 ^a	
2,28	1:1
1,14	1:1
0,57	1:1
0,285	1:1
0,1425	1:1
0,0713	1:1
0,03563	1:1
0,017813	1:1
0,008906	1:1
0,0044531	1:1
0,0022266	1:1
0,0011133	1:1
0,0005566	1:1
0,000278	1:1
0,0001392	1:1
6,95801E-05	1:1
3,479E-05	1:1
1,7395E-05	1:1
8,69751E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

- Chaguaipe (IPI-G-038)

Concentración de COT en diluciones (mg/L)	Factor de Dilución
4,4 ^a	
2,2	1:1
1,1	1:1
0,55	1:1
0,275	1:1
0,1375	1:1
0,0688	1:1
0,03438	1:1
0,017188	1:1
0,008594	1:1
0,0042969	1:1
0,0021484	1:1
0,0010742	1:1
0,0005371	1:1
0,000269	1:1
0,0001343	1:1
6,71387E-05	1:1
3,35693E-05	1:1
1,67847E-05	1:1
8,39233E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

- La Orejuela (IPI-G-039)

Concentración de COT en diluciones (mg/L)	Factor de Dilución
3,61 ^a	
1,805	1:1
0,9025	1:1
0,45125	1:1
0,225625	1:1
0,1128125	1:1
0,0564	1:1
0,02820	1:1
0,014102	1:1
0,007051	1:1
0,0035254	1:1
0,0017627	1:1
0,0008813	1:1
0,0004407	1:1
0,000220	1:1
0,0001102	1:1
5,508E-05	1:1
2,754E-05	1:1
1,377E-05	1:1
6,886E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

- Ipiiales (IPI-G-040)

Concentración de COT en diluciones (mg/L)	Factor de Dilución
2,13 ^a	
1,065	1:1
0,5325	1:1
0,26625	1:1
0,133125	1:1
0,0665625	1:1
0,0333	1:1
0,01664	1:1
0,008320	1:1
0,004160	1:1
0,0020801	1:1
0,0010400	1:1
0,0005200	1:1
0,0002600	1:1
0,000130	1:1
0,0000650	1:1
3,25E-05	1:1
1,625E-05	1:1
8,125E-06	1:1
4,063E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

- Pasto (PAS-G-017)

Concentración de COT en diluciones (mg/L)	Factor de Dilución
2,58 ^a	
1,29	1:1
0,645	1:1
0,3225	1:1
0,16125	1:1
0,080625	1:1
0,0403	1:1
0,02016	1:1
0,010078	1:1
0,005039	1:1
0,0025195	1:1
0,0012598	1:1
0,0006299	1:1
0,0003149	1:1
0,000157	1:1
0,0000787	1:1
3,937E-05	1:1
1,968E-05	1:1
9,842E-06	1:1
4,921E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

- Túquerres (TUQ-G-017)

Concentración de COT en diluciones (mg/L)	Factor de Dilución
4,12 ^a	
2,06	1:1
1,03	1:1
0,515	1:1
0,2575	1:1
0,12875	1:1
0,0644	1:1
0,03219	1:1
0,016094	1:1
0,008047	1:1
0,0040234	1:1
0,0020117	1:1
0,0010059	1:1
0,0005029	1:1
0,000251	1:1
0,0001257	1:1
6,287E-05	1:1
3,143E-05	1:1
1,572E-05	1:1
7,858E-06	1:1

^a Concentración de COT en Tf medida con equipo Shimadzu TOC-L Analyzer (ver metodología), teniendo como referencia este valor se calcularon las concentraciones de COT en las diluciones empleando la fórmula: $C1 * V1 = C2 * V2$. Los ensayos de toxicidad preliminares al test de Ames, y al ensayo Cometa (MTT) realizados con la muestra Tf y sus diluciones, permitieron seleccionar las tres concentraciones más altas para la ejecución del test de Ames y el ensayo Cometa definitivos.

Anexo 4. Resultados Análisis Físicoquímico de las muestras de agua y COT antes y después de ser tratadas con la tecnología PCFH.

Muestra	Catalizador (g)	Dosis H ₂ O ₂	Eliminación COT (mg/L)		pH	T° (°C)	Color Aparente (UPC)	Turbiedad (NTU)	Alcalinidad Total (mg CaCO ₃ /L)	Dureza Total (mg CaCO ₃ /L)	Cloruros (mg Cl/L)	Fluoruros (mg F/L)	Fosfatos (mg P- PO ₄ /L)	Nitritos (mg N- NO ₂ /L)	Nitratos (mg N- NO ₃ /L)	Sulfatos (mg SO ₄ /L)
			Ti	Tf												
Charandú	5,85	13,6	4,92	4,56	5,77	13,9	21	10,5	42,3	33,5	3	0,07	<0,1	<0,005	0,998	<15
Chaguaipe	5,85	13,6	7,6	4,4	5,9	13,7	89,8	32,7	88,78	55	5,25	0,21	0,14	0,022	<0,1	11,62
La Orejuela	5,85	13,6	4,9	3,6	6,7	12	25,1	2,8	22,08	27	7,25	0,05	<0,1	<0,005	0,736	<10
Ipiales	5,85	13,6	3,9	2,1	6,8	13,6	<8	0,55	49,7	100	21,62	0,18	<0,1	<0,005	0,736	86,88
Pasto	5,85	13,6	4,2	2,6	6,8	13,3	<8	0,6	11,34	30,5	12,41	0,03	<0,1	<0,005	0,988	<5
Túquerres	5,85	13,6	5,0	4,1	7,2	15,2	22,2	1,5	12,2	38,9	2,48	0,06	<0,1	<0,005	0,223	7,63

Anexo 5. Preparación de soluciones stock y de trabajo Test de Ames.

1. Agar mínimo con glucosa

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar mínimo o bacteriológico	15 g	7,5 g	3,75 g	1,5 g
Agua destilada	930 mL	465 mL	232,5 mL	93 mL
Sales Vogel-Bonner 50X	20 mL	10 mL	5 mL	2 mL
Glucosa 40%	50 mL	25 mL	12,5 mL	5 mL

Disolver el agar en agua caliente y con agitador (debe hervir). Esterilizar en autoclave durante 20 min., 121°C. Cuando la solución este tibia adicionar la solución estéril de sales VB 50X y la solución estéril de glucosa al 40%, una vez se prepara la mezcla se vierten 25 mL aproximadamente en cajas de Petri estériles, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan a 4°C hasta su uso.

NOTA: Las sales de Vogel-Bonner y la glucosa se preparan y esterilizan por separado.

2. Agar histidina/biotina (Cajas histidina/biotina)

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar mínimo o bacteriológico	15 g	7,5 g	3,75 g	1,5 g
Agua destilada	914 mL	457 mL	228,5 mL	91,4 mL
Sales Vogel-Bonner 50X	20 mL	10 mL	5 mL	2 mL
Glucosa 40%	50 mL	25 mL	12,5 mL	5 mL
Solución estéril de Histidina.HCl 2g/400 mL H ₂ O	10 mL	5 mL	2,5 mL	1 mL
Solución estéril de Biotina 0,5 mM	6 mL	3 mL	1,5 mL	0,6 mL

Disolver el agar en agua caliente y con agitador (debe hervir). Esterilizar en autoclave durante 20 min., 121°C. Cuando la solución este tibia adicionar la solución estéril de sales VB 50X y la solución estéril de glucosa al 40%, una vez se prepara la mezcla se vierten 25 mL aproximadamente en cajas de Petri estériles, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan a 4°C hasta su uso.

NOTA: Las sales de Vogel-Bonner y la glucosa se preparan y esterilizan por separado.

3. Agar histidina, biotina, ampicilina

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar mínimo o bacteriológico	15 g	7,5 g	3,75 g	1,5 g
Agua destilada	910 mL	455 mL	227,5 mL	91 mL
Sales Vogel-Bonner 50X	20 mL	10 mL	5 mL	2 mL
Glucosa 40%	50 mL	25 mL	12,5 mL	5 mL
Solución estéril de Histidina.HCl 2g/400 mL H ₂ O	10 mL	5 mL	2,5 mL	1 mL
Solución estéril de Biotina 0,5 mM	6 mL	3 mL	1,5 mL	0,6 mL
Solución estéril de Ampicilina 8 mg/mL NaOH 0,02N	3,5 mL	1,75 mL	87,5 mL	0,35 mL

Mezclar y disolver el agar en agua caliente, esterilizar en autoclave durante 20 min., 121°C. Adicionar la solución de glucosa 40%, sales VB 50X y la histidina en la solución de agar todavía caliente, cuando esté tibia (45°C), adicionar la biotina y la ampicilina. Esencial que la concentración sea exacta. Mezclar y servir en las cajas de Petri, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan a 4°C hasta su uso.

4. Agar Nutritivo

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar nutritivo	25 g	12,5 g	6,25 g	2,5 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Mezclar y disolver el agar con agua caliente (hasta que hierva), esterilizar en autoclave durante 20 min., 121°C. Servir las cajas de Petri, dejar solidificar por 15 minutos, marcarlas, empacarlas y guardarlas a 4°C hasta su uso.

5. Caldo nutritivo

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Caldo nutritivo	25 g	12,5 g	6,25 g	2,5 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver con agitador, adicionándolo lentamente para evitar que se empaste, no requiere calentamiento, esterilizar en autoclave durante 20 min., 121°C.

6. Sales Vogel-Bonner 50X

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agua destilada a 45 °C	670 mL	335 mL	167,5 mL	67 mL
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	10 g	5 g	2,5 g	1 g
Ácido cítrico monohidratado	100 g	50 g	25 g	10 g
Fosfato de potasio bibásico (K ₂ HPO ₄)	500 g	250 g	125 g	50 g
Fosfato de sodio y amonio NaH ₂ PO ₄ (PO ₄ .4H ₂ O)	175 g	87,5 g	43,75 g	17,5 g

Adicionar lentamente las sales en el orden indicado en agua destilada caliente (45°C) en un erlenmeyer en plancha caliente con agitador magnético, disolver completamente cada sal antes de adicionar la siguiente. Ajustar el volumen a 1 litro. Esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C sin ajustar la tapa, cuando la solución se enfríe ajustar la tapa. Guardar a 4°C o temperatura ambiente.

7. Solución de glucosa (40%)

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Glucosa anhidra	400 g	200 g	100 g	40 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver la glucosa en agua destilada y caliente agregando poco a poco para evitar formación de grumos, esterilizar en autoclave durante 20 min, 121 °C. Dejar enfriar y guardar a 4°C.

8. Solución histidina/biotina 0.5mM

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
D-Biotina	123,6 mg	31,8 mg	30,9 mg	12,3 mg
L-Histidina.HCl	96 mg	48 mg	24 mg	9,6 mg

Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
----------------	---------	--------	--------	--------

Disolver la biotina calentando el agua a 95°C. Esto puede hacerse en microondas. Esterilizar por filtración a través de membrana 0.22 µm o esterilizar en autoclave durante 20 min, 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar a 4°C.

9. Solución Histidina

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
L-Histidina.HCl	5 g	2,5 g	1,25 g	0,5 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver y esterilizar por filtración a través de membrana 0.22 µm o en autoclave durante 20 min, 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar a 4°C.

10. Solución Biotina 0.5 mM

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
D-Biotina	0,1236 g	0,0618 g	0,0309 g	0,01236 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver calentando un poco el agua y esterilizar por filtración a través de membrana 0.22 µm o en autoclave durante 20 min, 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar a 4°C.

11. Top Agar sin histidina/biotina

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar mínimo o bacteriológico	6 g	3 g	1,5 g	0,6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g	2,5 g	1,25 g	0,5 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver el agar en baño de vapor, microondas o autoclave por corto tiempo. Adicionar 3 mL en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C. Es conveniente prepararlo dos horas antes de hacer el test y ponerlo en un baño de María (50°C) hasta el momento de usarse para evitar que se solidifique.

12. Top Agar con histidina/biotina

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Agar mínimo o bacteriológico	6 g	3 g	1,5 g	0,6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g	2,5 g	1,25 g	0,5 g
Agua destilada	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Disolver el agar en baño de vapor, microondas o autoclave por corto tiempo. Adicionarle 10 mL de solución histidina/biotina por cada 100 mL de top que se prepare. Adicionar 3 mL en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C. Es conveniente tenerlo listo una hora antes de hacer la prueba y ponerlo en un baño de María (50°C) hasta el momento de usarse para evitar que se solidifique.

13. Solución de ampicilina (8mg/mL)

Reactivo	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Ampicilina trihidrato	8 g	4 g	2 g	0,8 g
Hidróxido de sodio 0,02N	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL

Adicionar poco a poco la ampicilina hasta que se disuelva completamente, filtrarla a través de membrana 0.22 µm y almacenarla a 4°C en botella de vidrio oscuro.

14. Solución Stock de NaOH (1N)

Reactivo	100 mL	10 mL
NaOH	0,8 g	0,4 g
Hidróxido de sodio	100 mL	10 mL

15. Solución de trabajo de NaOH (0.02 N)

Reactivo	100 mL	10 mL
NaOH 1N	2 mL	0,2 mL
Agua destilada	98 mL	9,8 mL

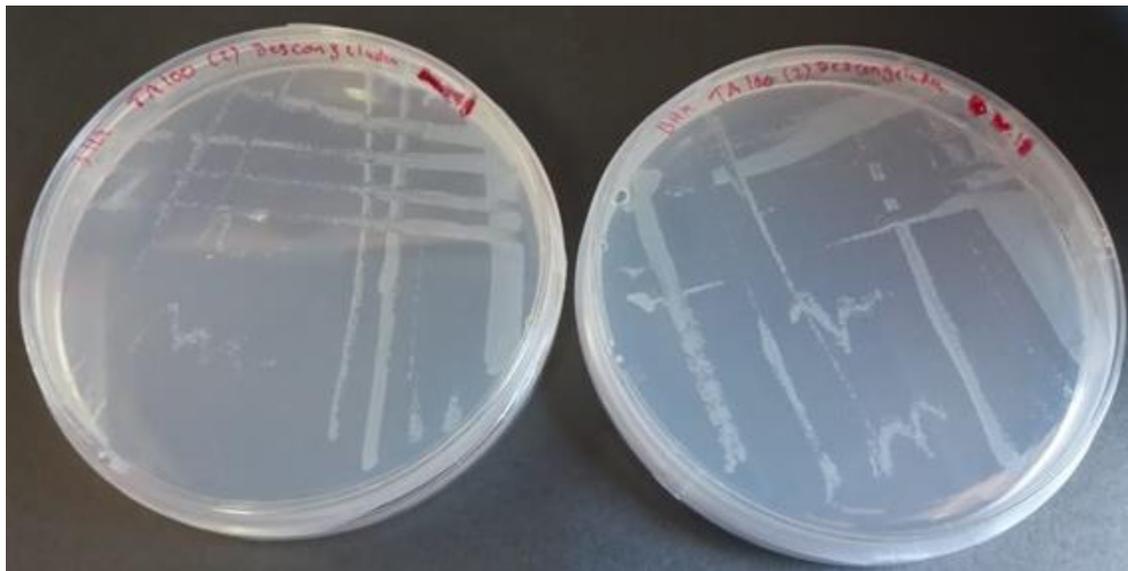
Mezclar, envasar, esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C y guardar a 4 °C o a temperatura ambiente.

16. Solución de cristal violeta

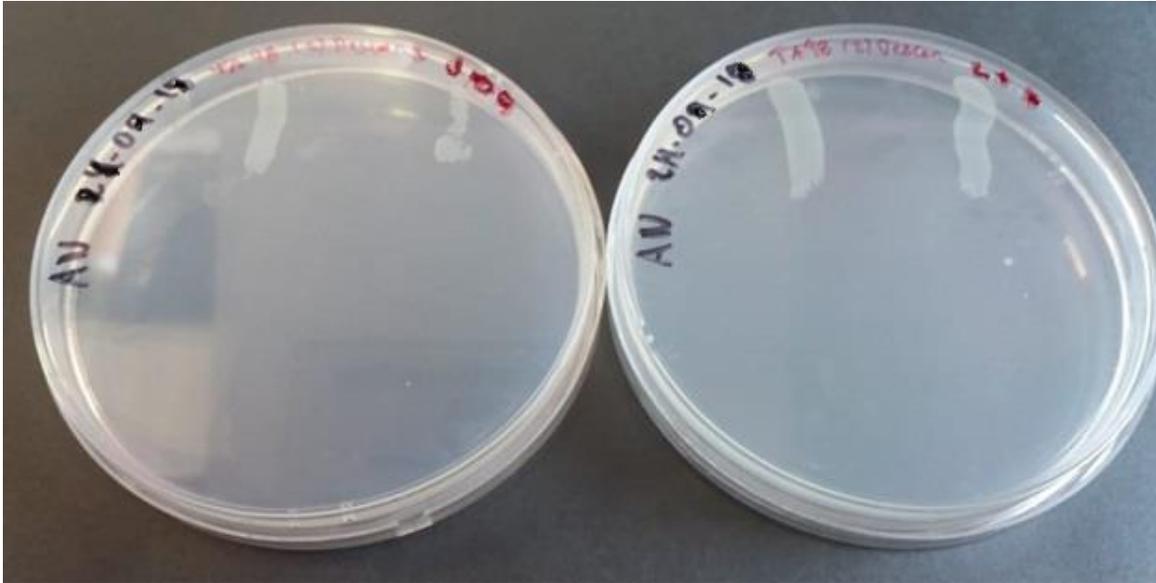
Reactivo	100 mL	10 mL
Cristal violeta	10 mg	1 mg
Agua destilada	100 mL	10 mL

Disolver el cristal violeta y guardar la solución a 4°C en frasco oscuro.

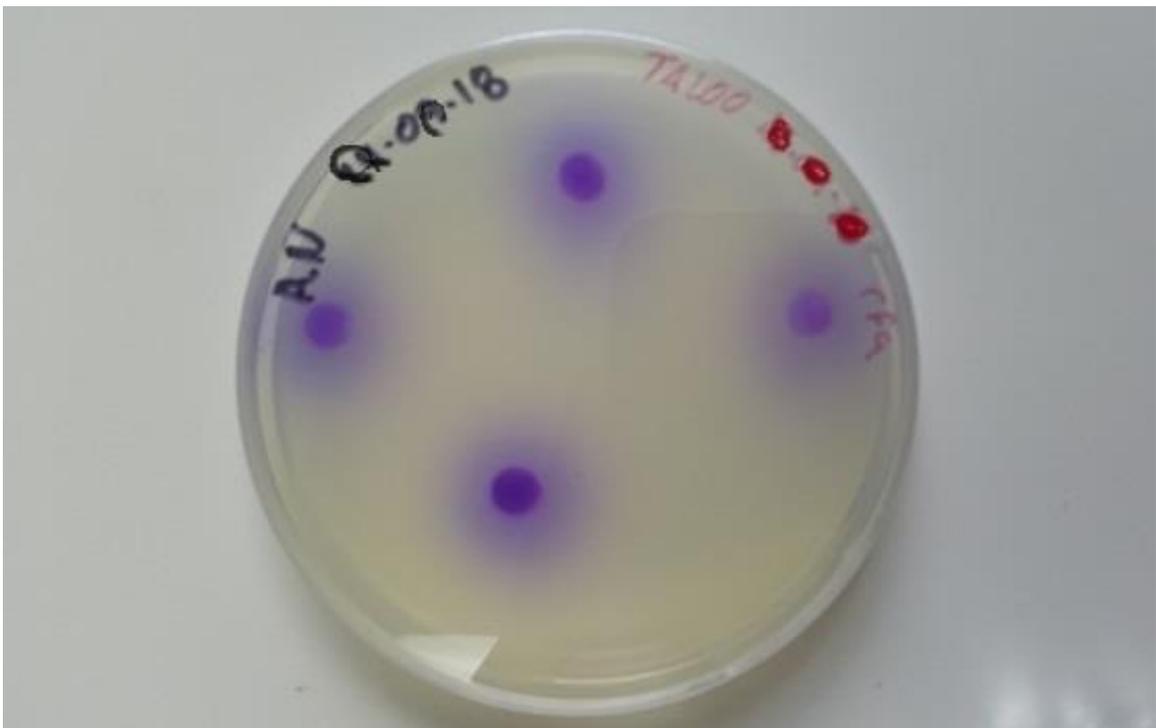
Anexo 6. Control de marcas para las cepas TA98 y TA100



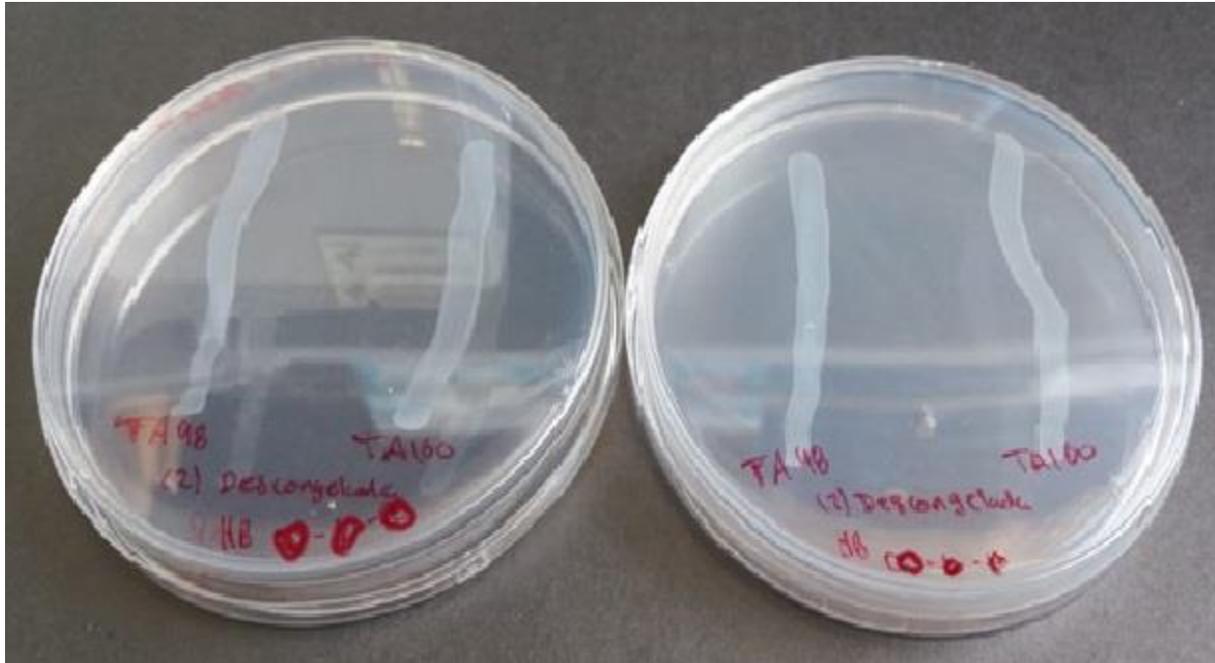
Factor R, resistencia al antibiótico Ampicilina en TA98 y TA100, se puede observar el crecimiento de ambas cepas.



Mutación *uvrB*, causada por la delección de los genes responsables por la reparación de excisión, que impide a una bacteria reparar algunos tipos de daños causados al ADN, tornándose más sensible a agentes mutagénicos.

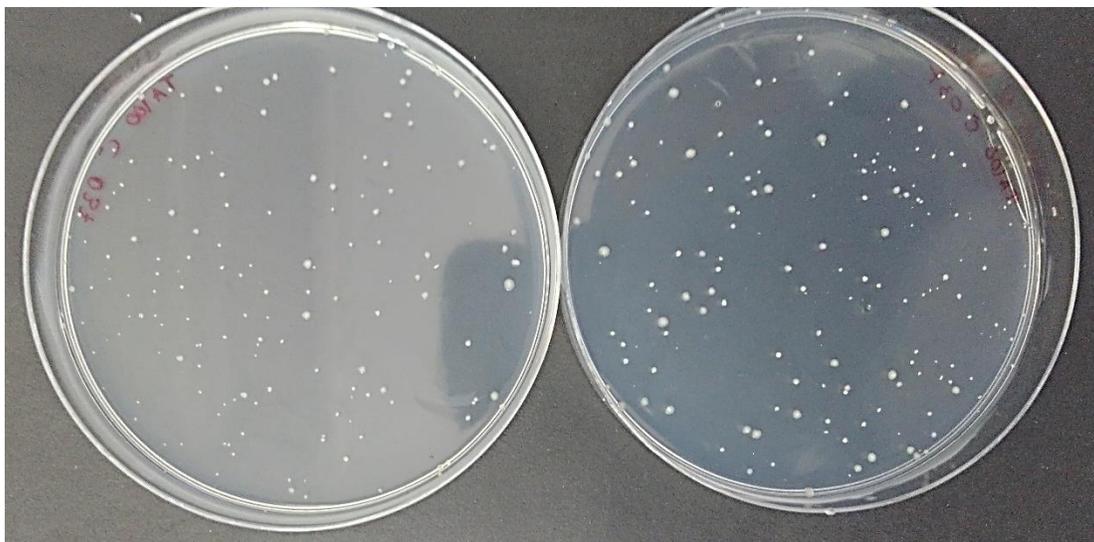


Mutación *rfa*, causa modificaciones en la capa de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana, propiciando una mayor permeabilidad de la célula a moléculas grandes.

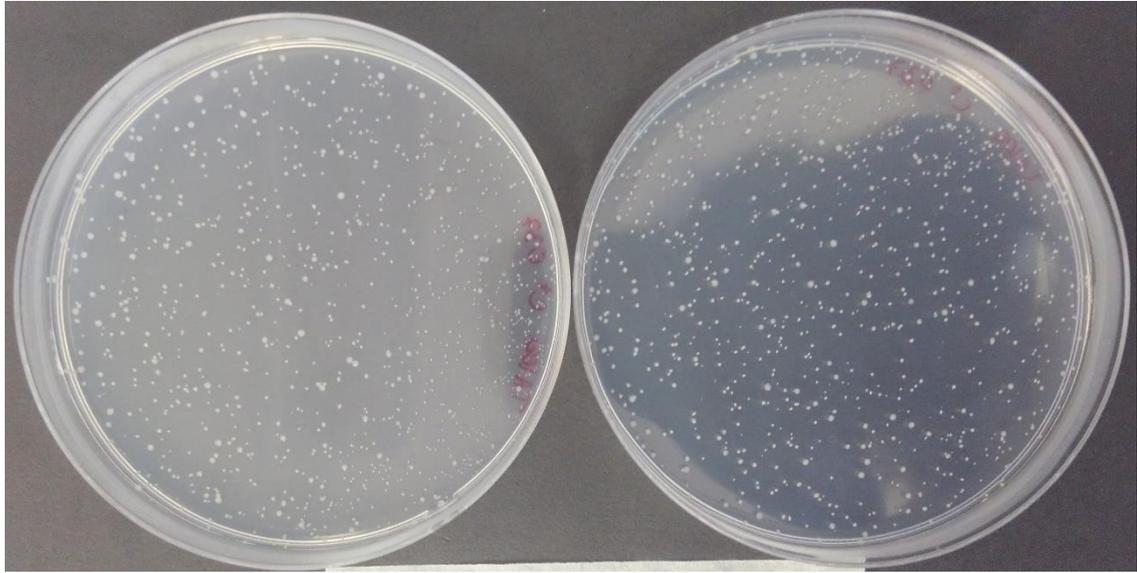


Requerimiento de histidina, Las cepas no son capaces de crecer en un medio sin histidina.

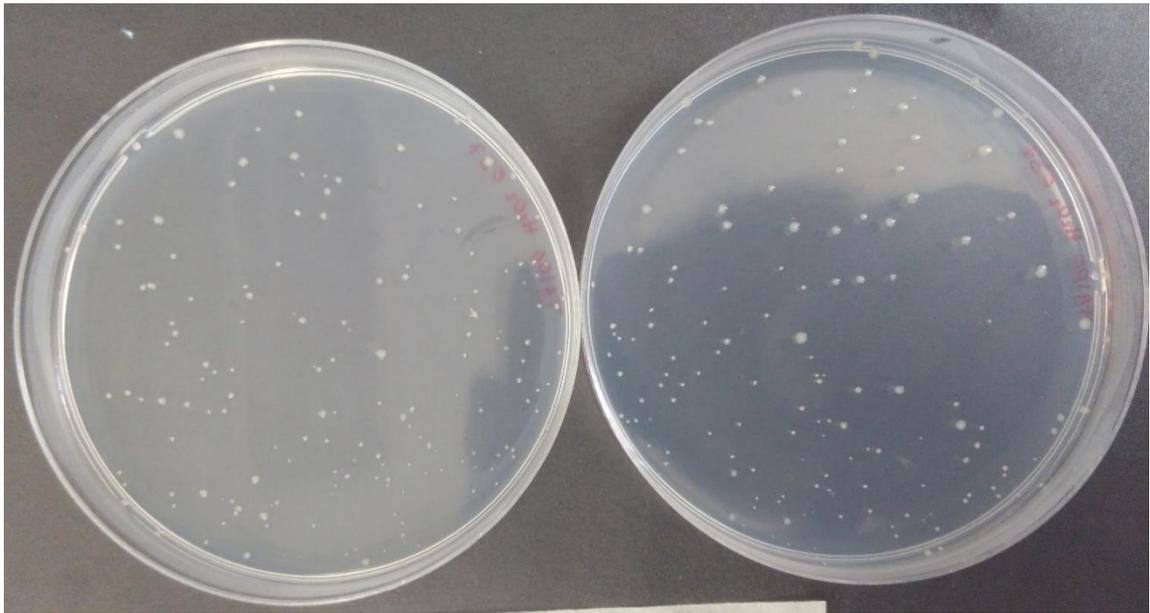
Anexo 7. Imágenes Test de Ames



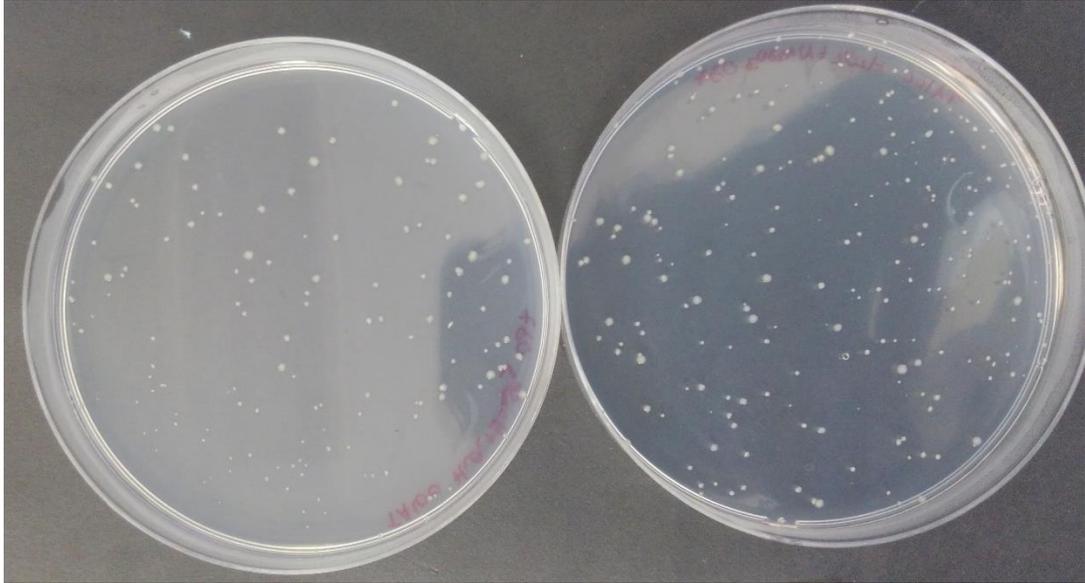
Control Negativo Cepa TA100 *S. typhimurium*



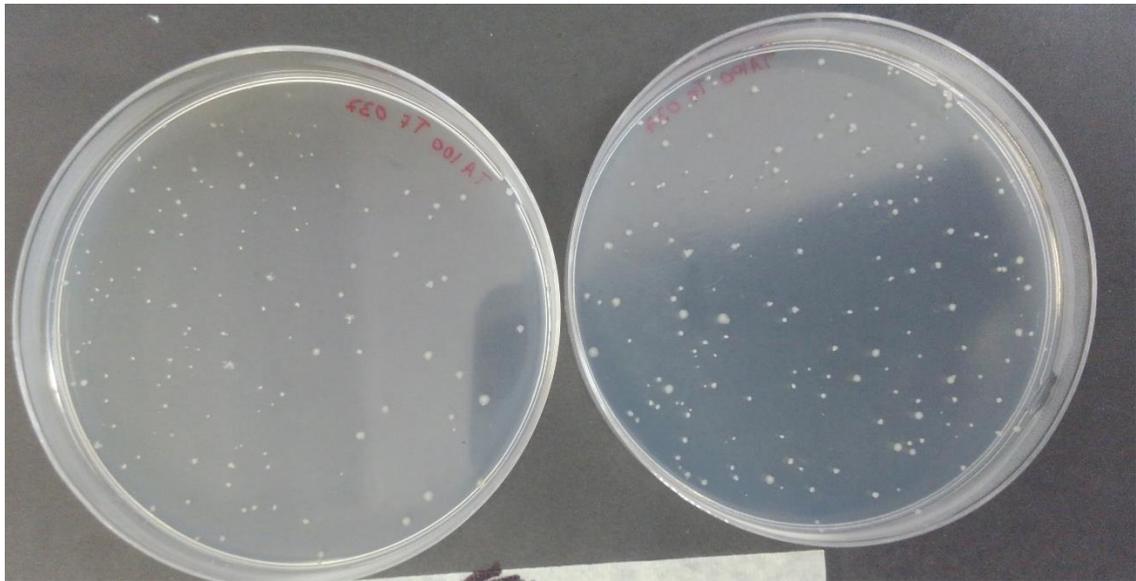
Control Positivo cepa TA100 *S. typhimurium*



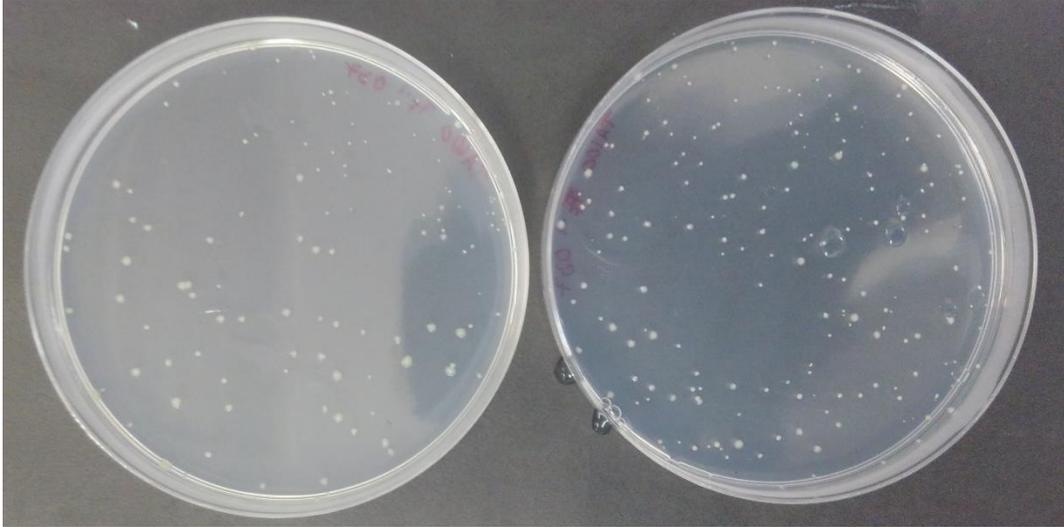
Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) cepa TA100 *S. typhimurium*



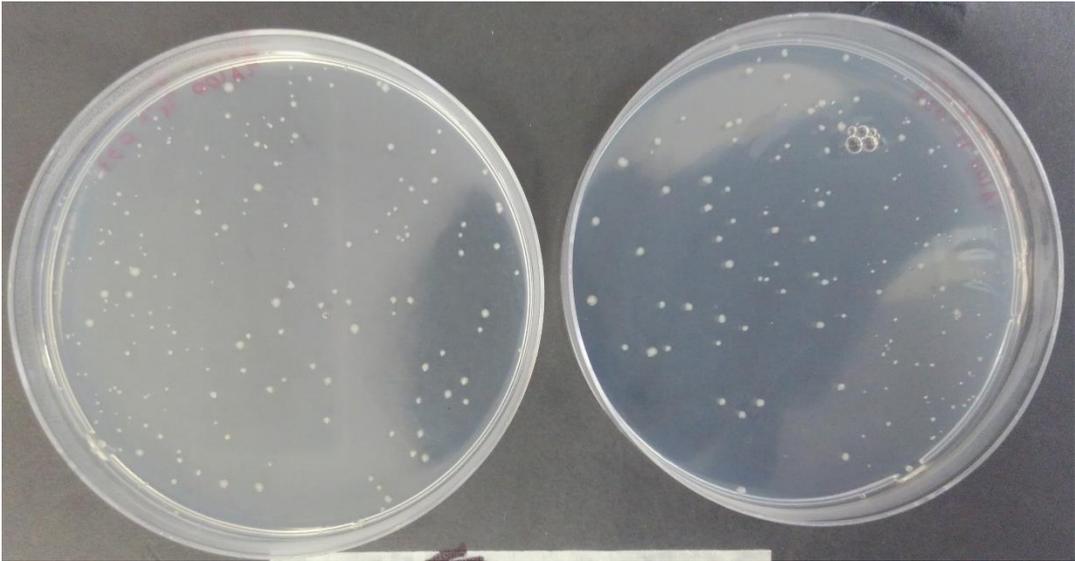
Peróxido de hidrogeno + sulfito de sodio ($H_2O_2 + Na_2SO_3$) cepa TA100 *S. typhimurium*



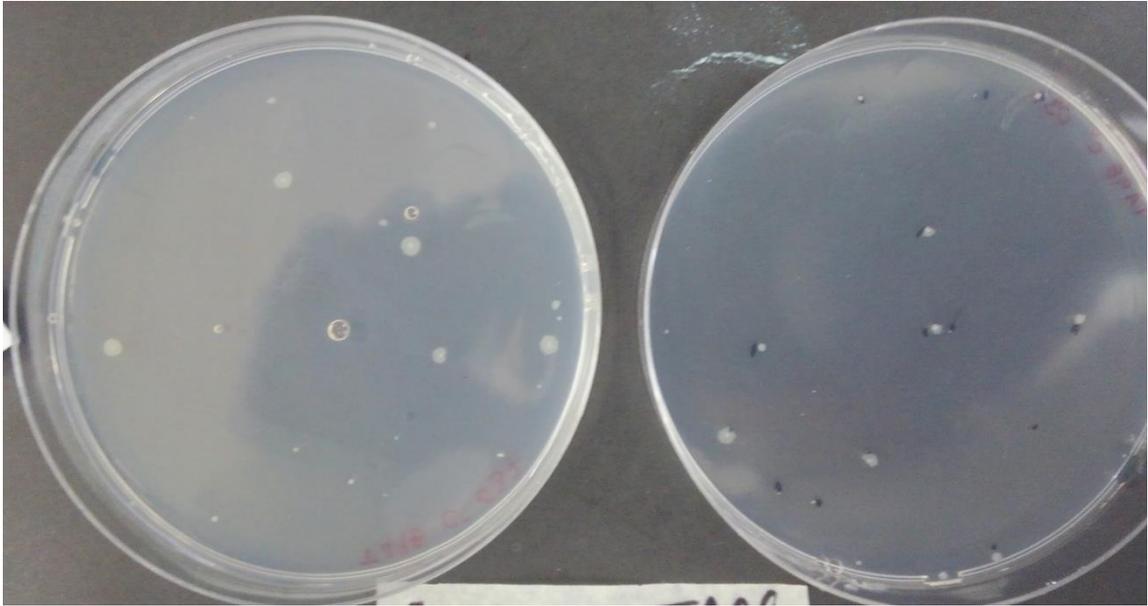
Tratamiento con aguas tratadas con la tecnología PCFH cepa TA100 *S. typhimurium*



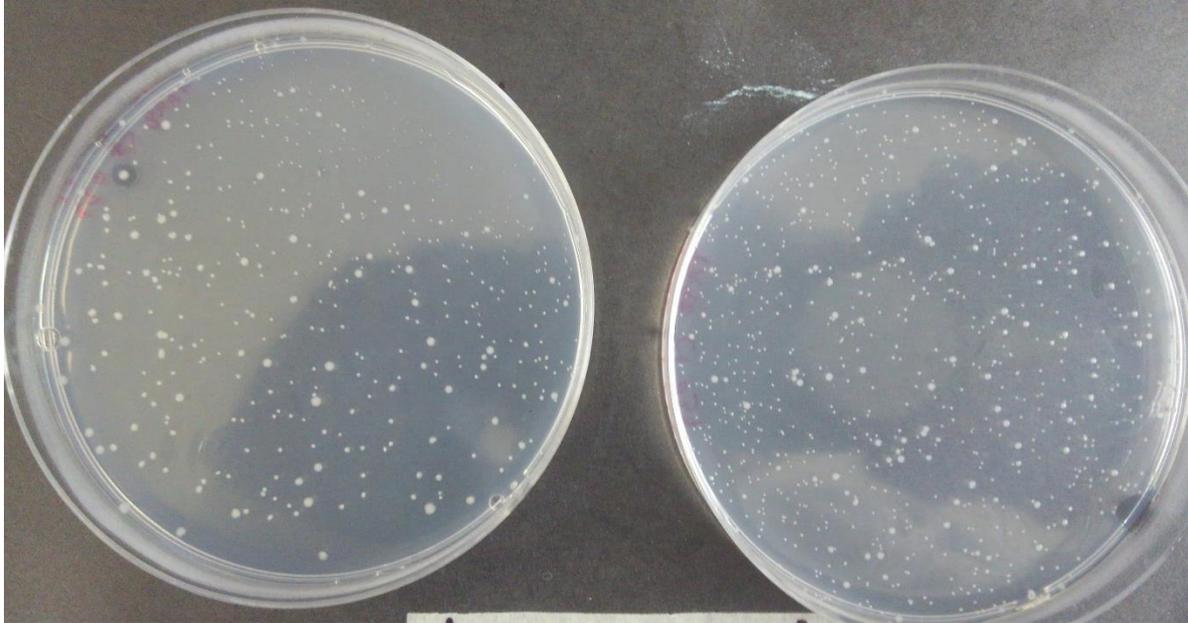
Tratamiento con aguas tratadas con la tecnología PCFH cepa TA100 *S. typhimurium*



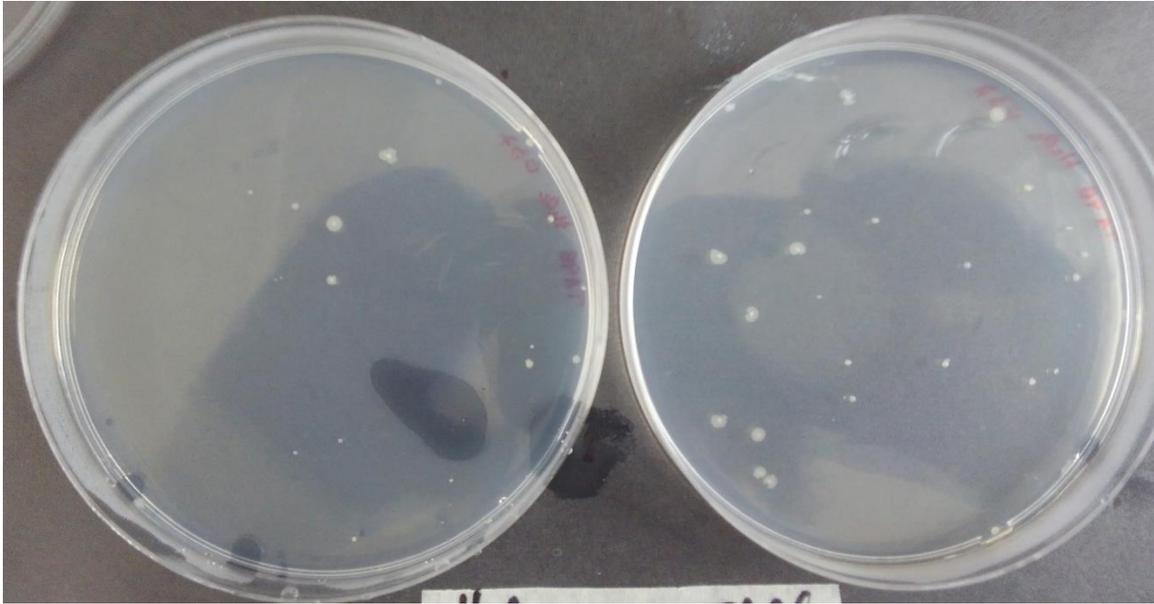
Tratamiento con aguas tratadas con la tecnología PCFH cepa TA100 *S. typhimurium*



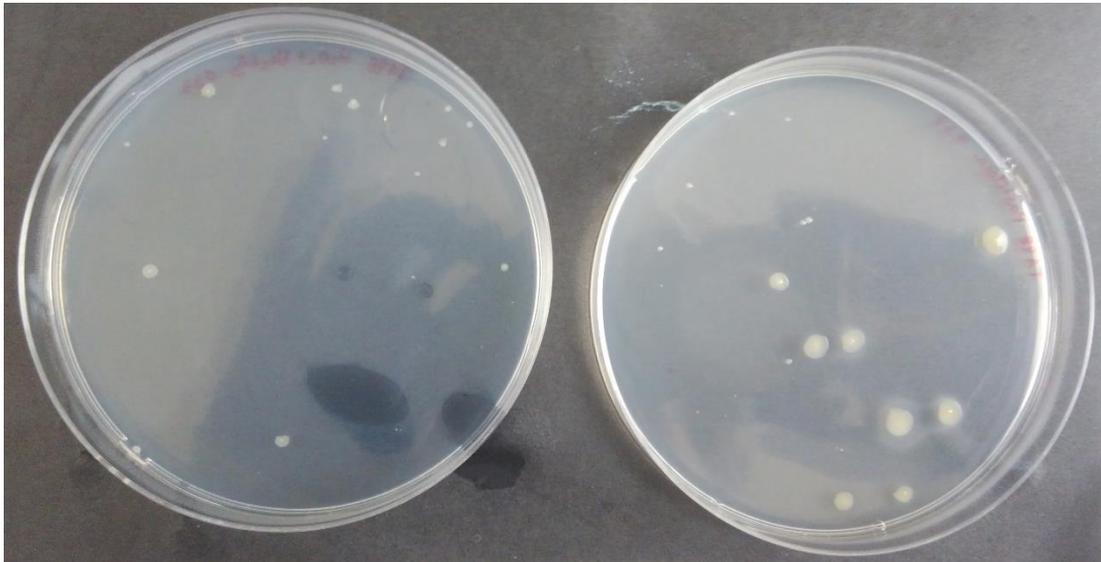
Control Negativo Cepa TA98 *S. typhimurium*



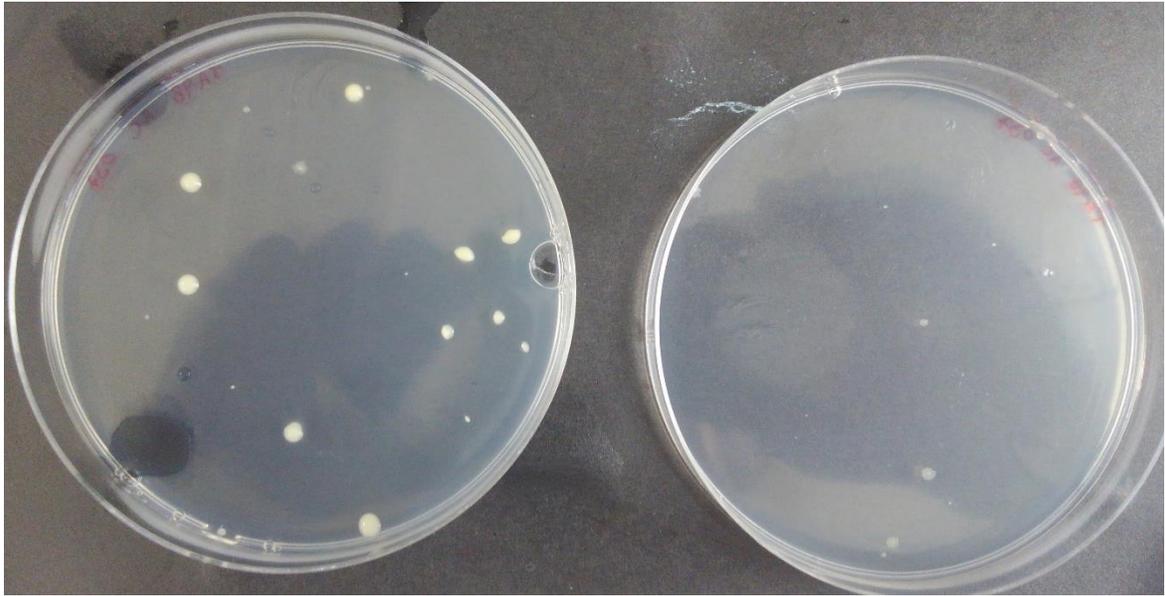
Control Positivo cepa TA98 *S. typhimurium*



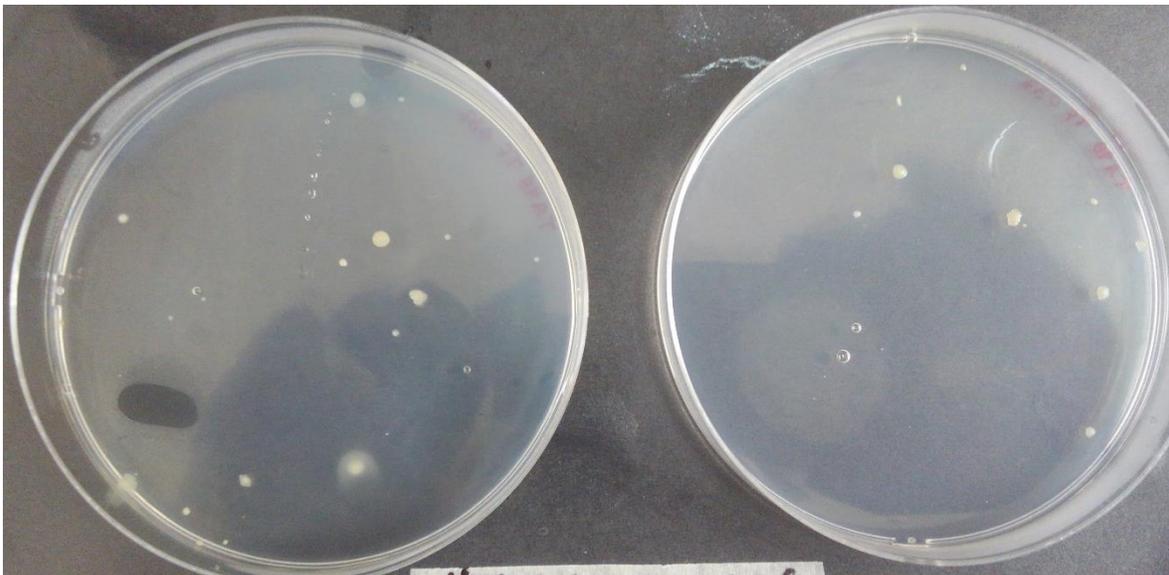
Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) cepa TA98 *S. typhimurium*



Peróxido de hidrogeno + sulfito de sodio ($H_2O_2 + Na_2SO_3$) cepa TA98 *S. typhimurium*



Sulfito de sodio (Na_2SO_3) cepa TA98 *S. typhimurium*



Tratamiento con aguas tratadas con la tecnología PCFH cepa TA100 *S. typhimurium*

