

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación y Prevalencia de Parásitos de Interés en Salud Pública, en Aguas de Riego y Hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca

Daniel Eduardo Ospina Santos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría Ciencias – Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
2022

Identificación y Prevalencia de Parásitos de Interés en Salud Pública, en Aguas de Riego y Hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca

Daniel Eduardo Ospina Santos

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director (a):

Ph.D., Carolina Ortiz Pineda

Codirector (a):

Ph.D., Martha Cristina Bustos López

Línea de Investigación: Parasitología

Grupo de Investigación RESA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C., Colombia

2022

Para mi FAMILIA

“Los fracasos son también útiles, porque, bien analizados pueden conducir al ÉXITO”

Alexander Fleming

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

DANIEL EDUARDO OSPINA SANTOS

Nombre

Fecha: 08/09/2022

Fecha

Agradecimientos

Antes que nada, agradezco a Dios, quien me ha permitido y dado la oportunidad de llegar a este momento de mi vida. A mis amados padres y hermana, por su apoyo y amor incondicional. Asimismo, agradezco a mis tíos y primos, quienes me acogieron, acompañaron y guiaron en mi continuo desarrollo profesional.

Agradezco de ante mano, a mi directora de tesis la Dra. Carolina Ortiz, quien me brindo su guía y sabiduría. A la Dra. Martha Bustos, por la confianza y sentido humano, y a la Dra. María Clara Echeverry por su consejo y apoyo.

Deseo agradecer a cada una de las personas que hicieron esto posible, mis compañeros de laboratorio: Catherine Aguilar, Alejandro Contreras, Carolina Vargas, Alejandra Valbuena, Cristian Rodríguez, Samanta Aponte, Keile Brugés, Jesús Espitia, Viviana Duarte, Carlos Sánchez, Cesar, Luis Carlos, Saul, Álvaro y Luis; gracias por su compañía durante esta experiencia. No menos importante, deseo brindarle un especial agradecimiento a Marcela Parra, gracias por tus consejos.

Quiero resaltar el apoyo recibido por parte de la Maestría en Ciencias Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia; a los docentes Martha Fontanilla y Daniel Uribe, por su sentido de pertenecía y profesionalismos.

Un total agradecimiento a Minciencias por financiar el trabajo experimental enmarcado en el macroproyecto titulado: *“Identificación de contaminantes emergentes y microbiológicos, análisis metagenómico bacteriano y perfil de resistencia a antibióticos en aguas de riego y hortalizas de la Sabana occidental de Cundinamarca”* del 2018, con código: 110180763785. Asimismo, al proyecto titulado: *“Evaluación de tratamientos para la remoción de fármacos presentes en aguas utilizadas para riego en La Ramada y caracterización de la contaminación por microorganismos de interés en salud pública”*, con código hermes: 42163, y al grupo de Investigación Resiliencia y saneamiento (RESA) de la Universidad Nacional.

GRACIAS.

Resumen

Identificación y Prevalencia de Parásitos de Interés en Salud Pública, en Aguas de Riego y Hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca

Debido al déficit hídrico producto de la sobrepoblación humana a nivel mundial, ha incrementado la preocupación por la presencia de contaminantes microbiológicos en aguas residuales, las cuales son vertidas a cuerpos de aguas superficiales sin un tratamiento adecuado, siendo usadas en la agricultura como acontece en el antiguo distrito de riego La Ramada. Esta práctica puede significar un riesgo para la salud pública. La OMS ha establecido el límite de ≤ 1 huevo/L para aguas de riego utilizadas en alimentos de consumo directo. El objetivo de este estudio fue identificar y determinar la prevalencia de parásitos de interés en salud pública, en aguas de riego y hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca. La metodología consistió en coleccionar muestras de agua para riego ($n=96$), y de hortalizas ($n=120$) en el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada. Para la detección de parásitos (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma gondii*) en aguas se utilizó la centrifugación directa (Método EPA 1693), seguido de extracción de ADN (FastDNA™ SPIN, Kit for SoilMP Bio) y qPCR. Para las hortalizas, se utilizó la técnica de Matosinhos *et al.*, 2016 (huevos de helminto), seguida de concentración Formol-Éter e Inmunofluorescencia (Kit A100FLK Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensiv, para detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.). Por último, se evaluó la remoción de huevos de *Ascaris suum* empleando el método de Bailenger Modificado, en dos sistemas piloto de tratamiento de aguas residuales: un reactor discontinuo secuencial (SBR) y un filtro anaerobio de flujo descendente (FAFD). Se detectó *Giardia* spp. por qPCR, en 10.41% (10/96) de las muestras de aguas en cuatro de los seis puntos de muestreo. La prueba chi cuadrado evidenció asociación entre la presencia de *Giardia* spp. con variables fisicoquímicas (EC, $\mu\text{S}/\text{cm}$) y microbiológicas (Coliformes totales (NMP/100mL) y *E. coli* (NMP/100mL)) $p < 0.05$. Para las hortalizas, se evidenció que el 33,3% (40/120), fueron positivas con al menos un huevo de helminto, siendo *Ascaris* spp el género predominante con un 27,5% (33/120) de prevalencia y un promedio del 0,433huevos/30g de muestra analizada. El 23,33% (28/120) de las hortalizas, fueron positivas con algún (oo)quiste de

protozoario, siendo *Entamoeba* spp. el protozoario más representativo, con un 15% (18/120) de prevalencia en las muestras, y un promedio de 0.45 quistes/30 g. De los 3 sitios muestreados para hortalizas, el sitio 1 registró la mayor prevalencia de helmintos (38,70%; 36/93) y protozoarios (22,58%; 21/93) en los alimentos. La evidente presencia de parásitos intestinales en hortalizas y agua podría estar fuertemente asociada a los vertimientos de origen doméstico a los canales de riego del antiguo distrito; además de la ganadería, porcicultura y avicultura presente en la zona. En razón al tratamiento de aguas residuales sintéticas, los ensayos piloto demostraron porcentajes de remoción de huevos de *A. suum* entre el 99.94% (FAFD) y el 100% (SBR), demostrándose así, el alto potencial de los biorreactores para el tratamiento de aguas con presencia de huevos de helmintos. Los datos obtenidos en aguas y vegetales pueden significar la diseminación de enfermedades parasitarias, si no se fomentan medidas preventivas y el tratamiento del recurso hídrico, que permitan reducir el riesgo de contaminación de estos alimentos con parásitos intestinales.

Palabras clave: Protozoos y helmintos Intestinales, Aguas residuales, Hortalizas, Riego agrícola, Colombia.

Abstract

Identification and Prevalence of Parasites of Interest in Public Health, in Irrigation Waters and Vegetables of the Cundinamarca Western Savannah

Due to the deficit in the water product of human overpopulation worldwide, concern has increased about the presence of microbiological contaminants in wastewater, which is discharged into the surface water, without adequate treatment, being used in agriculture, such as occurs in the old La Ramada irrigation district. This practice can pose a risk to public health. The OMS has established the limit of ≤ 1 egg/L for irrigation water used in food for direct consumption. The objective of this study was to identify and determine the prevalence of parasites of interest in public health, in irrigation water and vegetables in the Western Savannah of Cundinamarca. The methodology consisted of collecting water samples for irrigation (n=96), and vegetables (n=120) in the old La Ramada irrigation and drainage district. For the detection of parasites (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*) in water, direct centrifugation (EPA Method 1693) was achieved, followed by DNA extraction (FastDNA™ SPIN, Kit for SoilMP Bio) and qPCR. For vegetables, the technique of Matosinhos *et al.*, 2016 (helminth eggs) was performed, followed by Formol-Ether concentration and Immunofluorescence (A100FLK Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit, for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.). Finally, the removal of *Ascaris suum* eggs was evaluated using the Modified Baileger method, in two pilot wastewater treatment systems: a sequential batch reactor (SBR) and a downflow anaerobic filter (FAFD). *Giardia* spp. by qPCR, in 10.41% (10/96) of the water samples in four of the six sample points. The chi-square test shows an association between the presence of *Giardia* spp. with physicochemical (EC, $\mu\text{S/cm}$) and microbiological variables (total coliforms (NMP/100mL) and *E. coli* (NMP/100mL)) $p < 0.05$. For vegetables, it was shown that 33.3% (40/120) were positive with at least one helminth egg, *Ascaris* spp being the predominant genus with 27.5% (33/120) prevalence and an average of 0.433 eggs/30g of the analyzed sample. 23.33% (28/120) of the vegetables were positive with some protozoan (oo)cyst, *Entamoeba* spp. the most representative protozoan, with a 15% (18/120) prevalence in the samples, and an average of 0.45 cysts/30 g. Of the 3 sites sampled for vegetables, site 1 had the highest prevalence of helminths (38.70%; 36/93) and protozoa (22.58%; 21/93) in

food. The evident presence of intestinal parasites in vegetables and water could be associated with discharges of domestic origin to the irrigation canals of the old district; in addition to livestock, pig farming, and poultry farming present in the area. Due to the treatment of synthetic wastewater, the pilot tests demonstrated elimination percentages of *A. suum* eggs between 99.94% (FAFD) and 100% (SBR), thus demonstrating the high potential of bioreactors for the treatment of wastewater. waters with the presence of helminth eggs. The data obtained in water and vegetables can mean the spread of parasitic diseases if preventive measures and the treatment of water resources are not promoted, which allows reducing the risk of contamination of these foods with intestinal parasites.

Keywords: Intestinal protozoa and helminths, Wastewater, Vegetables, Agricultural irrigation, Colombia.

Contenido

Resumen.....	IX
Índice de tablas.....	16
Índice de figuras.....	18
Lista de abreviaturas.....	19
1. Introducción.....	21
2. Marco teórico.....	25
2.1 Agua para riego.....	25
2.2 Tratamiento de aguas para riego agrícola.....	26
2.3 Parásitos en aguas reutilizadas para el riego de cultivos.....	28
2.4 Protozoarios parásitos intestinales: resistencia a condiciones ambientales adversas.....	29
2.5 Parásitos transmitidos por alimentos.....	30
2.5.1 <i>Giardia</i> spp.....	31
2.5.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	33
2.5.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	35
2.6 Helmintos parásitos intestinales.....	37
2.7 Normativa nacional e internacional para el uso seguro del agua en la agricultura	39
3. Objetivos.....	41
4. Metodología:.....	43
4.1 Zona de estudio: Antiguo Distrito de riego y drenaje La Ramada:.....	43
4.2 Muestreo de aguas.....	44
4.2.1 Análisis parasitológico para la detección de Protozoarios en muestras de aguas: Concentración.....	46
4.2.2 Extracción del ADN.....	47

4.2.3	Detección de <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Toxoplasma gondii</i> y por qPCR.	48
4.3	Muestreo de hortalizas irrigadas con aguas de La Ramada	49
4.3.1	Análisis parasitológico, (Protozoarios y Helmintos):.....	51
4.3.2	Método de concentración de formol –éter (Ritchie modificado)	51
4.3.3	Detección de quistes de <i>Giardia</i> spp y <i>Cryptosporidium</i> spp por inmunofluorescencia.	52
4.4	Ensayos piloto para la remoción de huevos de <i>Ascaris suum</i> ., como indicador de calidad parasitológica en agua de riego.....	52
4.4.1	Diagnóstico de huevos de helmintos en los efluentes producidos por un SBR y un sistema FAFD.....	55
4.4.2	Enriquecimiento de Agua Residual Sintética con Huevos de <i>A. suum</i>	57
4.4.3	Remoción de Huevos de <i>A. suum</i> en un SBR, y un sistema FAFD.	59
4.4.4	Análisis posterior a los ensayos piloto de remoción de huevos de <i>A. suum</i> en los dos sistemas de tratamientos.	60
4.5	Análisis de resultados	60
5.	Resultados	61
5.1	Determinación de protozoarios e identificación de <i>Giardia</i> spp <i>Toxoplasma gondii</i> , y <i>Cryptosporidium</i> spp. presentes en aguas de riego.....	61
5.1.1	Correlación de los resultados de la detección de <i>Giardia</i> spp., mediante qPCR con algunas variables fisico-químicas y microbiológicas consideradas en el estudio	63
5.2	Evaluación de la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas.	65
5.3	Ensayos piloto para la remoción de huevos de <i>Ascaris suum</i> ., como indicador de calidad parasitológica en agua de riego.....	71
5.3.1	Diagnóstico de huevos de helmintos en los efluentes producidos por un SBR y un sistema FAFD.....	71

5.3.2	Enriquecimiento de Agua Residual Sintética con Huevos de <i>A. suum</i>	71
5.3.3	Remoción de Huevos de <i>A. suum</i> en un SBR, y un sistema FAFD.	71
5.3.4	Análisis posterior a los ensayos piloto de remoción de huevos de <i>A. suum</i> en los dos sistemas de tratamientos.	73
6.	Discusión.....	75
6.1	Determinación de protozoarios e identificación de <i>Giardia</i> spp <i>Toxoplasma gondii</i> , y <i>Cryptosporidium</i> spp. presentes en aguas de riego.....	75
6.1.1	<i>Giardia</i> spp.....	75
6.1.2	<i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Toxoplasma gondii</i>	79
6.2	Evaluación de la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas. 83	
6.3	Ensayos piloto para la remoción de huevos de <i>A. suum</i> ., como indicador de calidad parasitológica en agua de riego.....	91
6.3.1	SBR.....	91
6.3.2	Sistema FAFD	94
7	Conclusiones y recomendaciones	98
7.2	Recomendaciones.....	99
8	Referencias bibliográficas	101
9	Anexos	116

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 2.1. Microorganismos asociados con el uso de aguas residuales en la agricultura	26
Tabla 2.2. Genotipos de <i>G. duodenalis</i>	31
Tabla 2.3. Valores guía, para el monitoreo de verificación en sistemas de tratamiento a gran escala de aguas residuales, excretas y lodos fecales para uso en agricultura.	39
Tabla 4.1. Fecha y número de muestras colectadas en el distrito La Ramada.	44
Tabla 4.2. Sondas y Primes específicos utilizados en el presente estudio.....	49
Tabla 4.3. Fecha y número de muestras colectadas por sitio de muestreo.....	50
Tabla 4.4. Composición del agua residual sintética	55
Tabla 4.5. Composición del agua residual sintética	57
Tabla 5.1. Resultados obtenidos en la detección molecular de <i>Giardia</i> spp. en muestras de agua provenientes del antiguo distrito La Ramada.	61
Tabla 5.2. Resultados obtenidos en la detección molecular de <i>Giardia</i> spp. por sitio de muestreo y temporada de colecta (Lluvia y Seca).	62
Tabla 5.3. Prevalencia de parásitos detectados en el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.....	65
Tabla 5.4. Prevalencia de parásitos detectados en tres sitios de muestreo del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.	67
Tabla 5.5. Prevalencia de parásitos detectados en lechuga y apio, provenientes del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.	68
Tabla 5.6. Prevalencia de parásitos detectados en hortalizas colectadas en temporada lluvia y seca, en el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.....	69
Tabla 5.7. Prevalencia de Larvas spp. detectadas en muestras de hortalizas.	70
Tabla 5.8. Detección de huevos de <i>Ascaris</i> spp. en un SBR. (Ensayo remoción).....	72

Tabla 5.9. Detección de huevos de <i>Ascaris</i> spp. en un Sistema de Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (FAFD). (Ensayo remoción)	72
Tabla 6.1. Volumen por reacción para la detección de <i>Giardia</i> spp.	75
Tabla 6.2. Perfil térmico para la detección de <i>Giardia</i> spp. en muestras ambientales	75
Tabla 6.3. Volumen por reacción para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.	79
Tabla 6.4. Perfil térmico para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp. en muestras ambientales.....	80
Tabla 6.5. Volumen por reacción para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	81
Tabla 6.6. Perfil térmico para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras ambientales.....	81

Índice de figuras

	Pág.
Figura 2.1. Ciclo biológico de <i>Giardia duodenalis</i>	32
Figura 2.2. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium hominis</i>	34
Figura 2.3. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	36
Figura 4.1. Distribución geográfica de los sitios muestreados de Aguas utilizadas para riego de hortalizas, del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.....	45
Figura 4.2. Diagrama de flujo para la detección de parásitos protozoarios en aguas empleadas para riego agrícola	46
Figura 4.3. Diagrama de flujo, ensayos piloto para la remoción de huevos de <i>A. suum</i> , en un SBR y un sistema FAFD.....	54
Figura 4.4. Diseño y esquema del SBR.....	56
Figura 4.5. Diseño del Sistema del Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (FAFD)..	57

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
CAR	Corporaciones Autónomas Regionales
CDC	Centro para Control y Prevención de Enfermedades
DAMA	Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTPs	Desoxinucleótidos
ECDC	Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FAO	La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
IDEAM	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia
ITFC	Isotiocianato de fluoresceína
MINSALUD	Ministerio de Salud y Protección Social
NOM	Normas Oficiales Mexicanas
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTAR	Planta de tratamiento de aguas Residuales
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
UNEP	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
USEPA	Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos

1.Introducción

El agua es un recurso indispensable para el desarrollo y bienestar de las poblaciones humanas. De acuerdo con la Asamblea General de las Naciones Unidas, para el año 2010, se logró reconocer el derecho humano al agua, y al saneamiento de la misma; estipulando que toda persona debe tener acceso a agua segura, continua, y asequible para su uso (WHO, 2019). Dependiendo de la actividad para la que se destine, esta debe contar con criterios de calidad que garanticen su utilidad; ya sea para consumo humano, uso doméstico, agricultura, industria y fines recreativos (así como para la generación y el transporte de energía) (Cirelli, 2012).

La salud humana depende estrictamente de dicha calidad. En 2017, la organización mundial de la salud (OMS), logró estimar que alrededor de 842.000 personas, mueren cada año en el mundo por diarrea como consecuencia de la insalubridad del recurso hídrico (WHO, 2019). El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, estipuló para ese mismo año, que la diarrea fue la enfermedad que ocasionó la mayor tasa de mortalidad en niños menores de 5 años, llegando a representar el 8% de las muertes de infantes en el mundo a falta de buenas prácticas higiénico-sanitarias (Elmi & Dioso, 2017; UNICEF, 2021).

La presión y contaminación de las fuentes hídricas debido a múltiples causas es progresiva; dado el crecimiento demográfico, la rápida urbanización, el cambio climático y el incremento en la demanda de agua dulce para consumo y producción de alimentos, contribuyen en el déficit hídrico y en el aumento en la generación de aguas residuales. La agricultura juega un papel fundamental, al ser el sector que requiere una mayor demanda (Cirelli, 2012). Por tal razón, los agricultores y productores, han buscado alternativas de abastecimiento, considerando a las aguas residuales como un suministro en la producción de cultivos (Hettiarachchi & Ardakanian, 2017; Stevens *et al.*, 2017).

Debido a su composición variada, las aguas residuales procedentes de usos urbanos, industriales, agropecuarios y domésticos, pueden contar con microorganismos que afectarían la calidad microbiológica de las fuentes de aguas superficiales, sino no se emplea un tratamiento adecuado antes de su vertimiento (Romero-Aguilar *et al.*, 2009). Según las Naciones Unidas, se estima que en 20 millones de hectáreas en todo el mundo,

se realiza esta práctica (FAO 2017). En Israel, el 67% de este recurso es empleado para riego; mientras que en India, y Sudáfrica se aprovechan el 25% y 24%, respectivamente (World Health Organization, 2007). En países de América Latina como es el caso de México, las aguas residuales son destinadas para el riego de aproximadamente 1,45 Millones de hectáreas (Silva *et al.*, 2008) .

En los últimos 35 años, la población colombiana ha crecido en un 65%, generando un incremento en la demanda del agua (Ministerio de vivienda, 2018). De acuerdo con el Ministerio de vivienda, Colombia contó con un servicio de alcantarillado total nacional del 88.2% para el año 2017; no obstante, la superintendencia de servicios públicos indicó en el año 2018, que solo un 42.85% de las aguas residuales urbanas generadas en el territorio nacional, contaron con algún tratamiento antes de ser vertidas al medio ambiente (Ministerio de vivienda, 2018; Departamento de Planeación Nacional - DNP, 2020).

En muchos casos, las aguas residuales diluidas sin tratamiento previo en fuentes superficiales son utilizadas para el riego de diferentes cultivos, como los de hortalizas, muchas de las cuales, al ser de consumo directo, constituyen un posible vehículo para la transmisión de microorganismos patógenos (Polo *et al.*, 2016; Cubides, 2018; Montañez *et al.*, 2020). Varias de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), se relacionan con parásitos presentes en vertimientos de origen doméstico (Pérez-Cordón *et al.*, 2008). Entre los parásitos más relevantes, se encuentran diferentes especies de protozoarios y helmintos patógenos, frecuentes en humanos y animales (Iannacone, 2002) los cuales son responsables de diferentes patologías, como la ascariasis, cisticercosis, tricuriasis, giardiasis, toxoplasmosis, criptosporidiosis, entre otras (Guadagnini *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2010).

Uno de los factores más influyente en la transmisión de parásitos patógenos, es la contaminación del ambiente con residuos fecales (Ortiz *et al.*, 2020; Campos *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2019; Pérez-Cordón *et al.*, 2008), lo que no solo representaría un riesgo para las poblaciones humanas, sino además para las poblaciones de los animales y del medio ambiente. La tríada “*One Health*” (la cual expone la interdependencia de la salud humana,

animal y de los ecosistemas al estar relacionados con el agua), estipula que una promoción de la salud y prevención de enfermedades parasitarias, se lograría no solo partiendo de la comprensión de aspectos ambientales, epidemiológicos y etiológicos de este grupo de individuos; sino que implementando un conocimiento interdisciplinar y colaborativo, se promoverían sinergias globales a favor del bienestar de las poblaciones humanas, animales y del medio ambiente (Thompson & Polley, 2014; Robertson *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2016; OMS, 2022; Mora *et al.*, 2009).

Algunos géneros de helmintos y protozoarios han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal de los recursos hídricos (Campos *et al.*, 2018). La mayoría de helmintos patógenos, se caracterizan por desarrollar parte de su ciclo de vida en el ambiente; sus huevos, son de gran importancia en salud pública dada su alta resistencia a condiciones medioambientales adversas (Temperatura, pH, desecación y humedad), y a procesos de desinfección como la cloración (Maya *et al.*, 2012). Los protozoarios no son la excepción, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., cuentan con estructuras denominadas (oo)quistes, las cuales se encuentran en el ambiente (desde días a meses) que les confieren resistencia a factores externos, entre ellos la cloración (usada en el tratamiento) (Adam *et al.*, 2016). Estas especies han sido asociadas a brotes epidémicos alrededor del mundo, donde el agua y los alimentos son el principal vehículo (Leal *et al.*, 2013).

En Colombia, la encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar realizada en 2015 demostró que cerca del 81% de los infantes presentaba parásitos intestinales; siendo *Trichuris trichiura* el helminto más prevalente (18,4%), seguido de *Ascaris lumbricoides* (11,3%) y Uncinarias (6,4%). Asimismo, reportó a *Blastocystis* spp. con un 60,3% de prevalencia, seguido por el complejo *Entamoeba histolytica/dispar* (48,0%) y *Giardia lamblia*, (37,3%) (MINSALUD, 2015; Guillen *et al.*, 2013).

Para reducir la contaminación de alimentos y la transmisión de parásitos por agua, la OMS legisla a partir de sus directrices los valores máximos permisibles de huevos de helmintos (≤ 1 huevo de helminto/L) para un uso seguro del recurso en la agricultura, como en los cultivos de consumo directo (frutas y hortalizas) (WHO & UNEP, 2006). Para lo anterior, se recomienda el uso de tratamientos multi barrera, como los reactores discontinuos secuenciales (SBR) y los filtros anaerobios de flujo descendente (FAFD), que contribuyen

a través de procesos biológicos, eliminar contaminantes presentes en las aguas (Secretaría de ambiente, 2008). Con el fin de promover la salud y prevención de enfermedades parasitarias, es necesaria una atención integral y colaborativa con distintas disciplinas, que permitan evaluar continuamente nuevas tecnologías para mejorar estos procesos (Vargas, 2008).

En el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada (ubicado en la sabana occidental de Cundinamarca), se ha evidenciado el vertimiento de aguas residuales crudas al interior de los canales de riego (CAR, 2009; Cubides, 2018). Debido a que en la zona se cultiva un 75% de suelo cultivable con productos de consumo directo como: lechuga, apio, espinaca, cilantro, brócoli entre otras hortalizas, es de especial interés conocer la situación actual de la calidad parasitológica de estos alimentos (DANE, 2002; Alcaldía Mayor de Santa Fé de Bogotá y DAMA, 2012).

El objetivo del presente estudio fue identificar y determinar la prevalencia de parásitos de interés en salud pública, en aguas de riego y hortalizas cultivadas en los municipios de Mosquera y Funza (Cundinamarca). La identificación de los géneros parasitarios en hortalizas se realizó a partir de la metodología descrita por Matosinhos *et al*, (2016), seguido por microscopía óptica y de inmunofluorescencia. Para el análisis de aguas, se siguió la metodología de centrifugación directa, descrita en el método 1693 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA), donde posteriormente se extrajo el material genético, y se procedió a la amplificación de ADN por qPCR, para la detección de los géneros *Giardia*, *Cryptosporidium* y *Toxoplasma* (Osorio, 2014; Temesgen *et al*. 2019).

El presente trabajo de Tesis, se encuentra enmarcado en el macro proyecto titulado: *“Identificación de contaminantes emergentes y microbiológicos, análisis metagenómico bacteriano y perfil de resistencia a antibióticos en aguas de riego y hortalizas de la Sabana occidental de Cundinamarca”* del 2018, financiado por Minciencias con código: 110180763785; y en el proyecto titulado: *“Evaluación de tratamientos para la remoción de fármacos presentes en aguas utilizadas para riego en La Ramada y caracterización de la contaminación por microorganismos de interés en salud pública”*, con código Hermes: 42163.

2.Marco teórico

2.1 Agua para riego

El agua es un recurso esencial para el bienestar del ser humano; se estima que en promedio se requieren 3.000L de agua por persona para el desarrollo de productos necesarios en la alimentación cotidiana (UNESCO, 2006). Boretti & Rosa (2019) estiman que la demanda de alimentos para el año 2050, aumentará en un 60%, lo que no solo requerirá una mayor área de suelo cultivable, sino que demandará un mayor consumo del recurso hídrico (Boretti & Rosa, 2019).

Debido a la escasez de agua, el uso de efluentes contaminados con aguas residuales para el riego de cultivos se ha convertido en una práctica común. (FAO, 2017; Organización de las Naciones Unidas, 2017). Por ejemplo, en la provincia de Mendoza (Argentina), se logró disponer de suficiente caudal, para la irrigación de 15.000 hectáreas cultivadas (Torregosa *et al.*, 2012). En Tacna (Perú), alrededor del 100% de las aguas residuales urbanas, son empleadas para el riego de 1.500 hectáreas agrícolas. Cabe destacar que el aprovechamiento de este recurso, no solo mejora los rendimientos agrícolas por el contenido de nutrientes-fertilizantes, sino que fomentan un uso óptimo del agua dulce en función a las comunidades humanas y al medio ambiente (Mok & Hamilton, 2014; Moscoso, 2016; FAO, 2017).

Sin embargo, el reúso de estas aguas sin los debidos estándares de calidad requeridos, puede llegar a ocasionar riesgos para la salud en poblaciones humanas y animales, al igual que contaminar el medio ambiente (Metcalf Eddy, 2003). Bacterias, parásitos y virus, representan una importante amenaza ya que son transportados por aguas residuales que no cuenten con un tratamiento adecuado(ONU, 2017). En la Tabla 2.1, se presentan algunos de los parásitos asociados al uso de aguas residuales en la agricultura (WHO & UNEP, 2006; Ortega, 2017)

Tabla 2.1. Microorganismos asociados con el uso de aguas residuales en la agricultura (Adaptado de WHO & UNEP, 2006).

Agente patógeno	Importancia para la salud	Resistencia al cloro	Ruta de exposición	Comentarios
Helmintos				
<i>Trichuris spp.</i>	Alta	Moderada		
<i>Schistosoma spp.</i>	Alta	Moderada	Contacto y Consumo	Los huevos de diferentes helmintos como <i>Ascaris spp.</i> , <i>Ancylostomideos</i> , <i>Necator</i> , <i>Hymenolepis</i> , etc. pueden sobrevivir en el medio ambiente desde meses, hasta 6-7 años
Ancilostomideos	Alta	Moderada		
<i>Hymenolepis</i>	Alta	Moderada		
<i>Ascaris spp.</i>	Alta	Alta (Brownell & Nelson, 2006)		
Protozoarios				
<i>Giardia spp.</i>	Alta	Alta	Contacto y Consumo	Protozoos se han encontrado en hortalizas irrigadas con aguas residuales en el punto de cosecha y en punto de venta (mercados).
<i>Cryptosporidium spp.</i>	Alta	Alta		
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Alta		
<i>Entamoeba spp.</i>	Alta	Alta		

2.2 Tratamiento de aguas para riego agrícola

Para eliminar los huevos y quistes de parásitos en las aguas que serán utilizadas para riego, se recomiendan sistemas de tratamiento multibarrera, que incluyen procesos como la sedimentación, pre-filtración, filtración lenta en arena, coagulación, floculación, sedimentación, filtración rápida en arena, aireación y desinfección a través de ebullición, radiación UV, cloro y ozono (Ortega, 2017).

Entre los sistemas de tratamientos de aguas residuales empleados en la remoción de carga orgánica, se encuentran los reactores discontinuos secuenciales y los filtros anaerobios de flujo descendente.

Los reactores discontinuos secuenciales también conocidos como SBR, por sus siglas en inglés: *Sequencing Batch Reactor*, trabajan con un sistema microbiológico aerobio basado en lodos activos, operado en una secuencia de ciclos de llenado. El consorcio microbiano de los lodos granulares aerobios, consisten principalmente en bacterias metanogénicas, acetogénicas sintróficas y bacterias fermentativas hidrolíticas (Hickey *et al.*, 1991). La biomasa de los flóculos es un ecosistema donde la depredación y la adsorción, promueven la inactivación o destrucción de patógenos.

El filtro anaeróbico de flujo descendente (FAFD) consiste en un mecanismo de contacto, en el que las aguas residuales pasan por una masa de sólidos biológicos contenidos en el interior del sistema. La biomasa puede encontrarse en tres formas diferentes: 1) Biopelícula delgada, adherida a las superficies de un material comúnmente conocido como medio de soporte, o lecho filtrante; 2) Capa de biomasa dispersa retenida en los intersticios del medio de empaque; y 3) Flóculos o gránulos ubicados en la parte inferior del reactor (Lemos, 2007).

El sistema de biopelícula (sistema de filtro evaluado en el presente estudio), se caracteriza por descomponer los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales; dichos compuestos solubles contenidos en estas aguas, entran en contacto con la biomasa, difundiendo a través de las superficies de la biopelícula, para posteriormente convertirse en productos intermedios y finales; específicamente metano y dióxido de carbono, por acción del consorcio microbiano (Comisión Nacional del Agua, 2015).

En Colombia, los filtros anaerobios son uno de los sistemas de tratamientos de aguas residuales, que se han venido usando con mayor frecuencia en muchas zonas del territorio nacional. Al combinarse estos sistemas con tanques sépticos como pre-tratamiento, han permitido obtener eficiencias mayores. (Gomez & Alvarez, 2008). Si bien los filtros anaeróbicos se pueden usar como la unidad principal de tratamiento de aguas residuales, se conoce que, son especialmente apropiados para el tratamiento posterior; lo que agrega seguridad operativa y estabilidad al sistema de tratamiento en su conjunto. El efluente de

los filtros anaerobios suele estar clarificado y poseer una concentración baja de materia orgánica, lo que a su vez reflejaría la disminución y remoción de la concentración de microorganismos patógenos que pudieran ser transportados con dicha materia orgánica, como los huevos de helmintos (Lemos, 2007; Gonçalves *et al.*, 2001).

2.3 Parásitos en aguas reutilizadas para el riego de cultivos.

Las parasitosis intestinales se definen como infecciones, que pueden generarse tanto por la ingesta de (oo)quistes de protozoarios o huevos y larvas de helmintos; siendo el tracto gastrointestinal del huésped el hábitat natural de dichos microorganismos (Medina Claros *et al.*, 2011). A nivel mundial, 2000 millones de personas presentan enfermedades relacionadas con el parasitismo intestinal, siendo principalmente afectadas las comunidades que habitan en países en vías de desarrollo. Estas patologías a menudo llevan a sufrir consecuencias graves como: alteraciones cognitivas, desnutrición, síndrome de mala absorción, anemia, y en algunos casos la muerte. La asociación con contaminación fecal del suelo y de los alimentos, la carencia de agua potable, el reúso de las aguas residuales, baja escolaridad, ausencia de saneamiento ambiental y bajo nivel socioeconómico hace que continúen siendo un problema de salud pública en países como Colombia.

Diversos reportes han sido publicados informando la concentración de huevos de helmintos en aguas empleadas para riego, en los cuales, algunos sobrepasan los valores establecidos por las normativas nacionales e internacionales (Ortiz *et al.* 2012, Jimenez *et al.* 2007). Estos reportes procedentes de diferentes países (México, Brasil, Estados Unidos, Inglaterra, Colombia, Alemania, entre otros), tanto desarrollados como en vía de desarrollo, y que utilizan sistemas de tratamiento muy diferentes, confirman que en algunos lugares existe riesgo de transmisión. De ahí la importancia de realizar la vigilancia de la calidad parasitológica de estas matrices, teniendo a los huevos de helmintos como uno de los principales grupos indicadores de contaminación microbiológica.

2.4 Protozoarios parásitos intestinales: resistencia a condiciones ambientales adversas.

Los protozoos son microorganismos unicelulares pertenecientes al dominio *Eukarya*, y se caracterizan por presentar formas infecciosas denominadas (oo)quistes, que les conceden la capacidad de resistir y sobrevivir bajo condiciones ambientales y antrópicas adversas, como la cloración y otros procesos habituales de desinfección de fuentes hídricas (Guadagnini *et al.*, 2013). La preocupación en salud pública de dichos microorganismos, se debe a su alta prevalencia en el medioambiente, y a la resistencia a tratamiento habituales del agua, cualidad otorgada principalmente a la composición de la pared de sus estructuras (oo)quísticas (Burnet *et al.*, 2014; Keegan *et al.*, 2008).

La pared del quiste de *Giardia duodenalis* posee un grosor de 300 a 500 nm y consiste principalmente en una capa filamentosa superficial. La composición bioquímica y la disposición estructural de esta capa se compone de una densa red de fibrillas rizadas de N-acetilgalactosamina, que mide 10 nm de diámetro. Estas fibrillas están asociadas con ciertas proteínas de la pared llamadas proteínas de la pared del quiste (CWP). Se ha demostrado que la gruesa capa exterior filamentosa de la pared del quiste es totalmente impermeable, lo que contribuye a la supervivencia de los quistes en el agua y a su resistencia a diversos desinfectantes. Los ooquistes de *Cryptosporidium* poseen una pared multicapa compleja, que mide de 50 a 80 nm de espesor, constituida por una capa interna de glicoproteínas y una capa central de lípidos y proteínas cubierta por un glicocálix externo rico en glucosa. Las proteínas de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP), forman extensos puentes disulfuro y, en consecuencia, matrices en la capa interna, que proporciona gran resistencia (Dumètre *et al.*, 2012).

La pared de doble capa del ooquiste de *Toxoplasma gondii* forma una cubierta altamente resistente e impermeable al medio ambiente. Esta pared posee un espesor de 100 nm y está compuesta en más del 90% por proteínas ricas en cisteína (localizadas específicamente en la capa externa) y tirosina. La tirosina es una molécula que forma enlaces cruzados proteína-proteína (ditirosina) responsable del endurecimiento y la auto-fluorescencia azul natural de los ooquistes bajo luz ultravioleta. (Dumètre *et al.*, 2012).

2.5 Parásitos transmitidos por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son definidas como el síndrome generado por la ingesta de agua y alimentos contaminados con agentes etiológicos en concentraciones lo suficientemente altas, para afectar la salud del consumidor (Instituto Nacional de Salud, 2017). Las ETA representan problemáticas sanitarias relevantes, ya que varias frutas y verduras pueden servir como vehículo de una amplia carga de microorganismos patógenos en todo el mundo. Según lo estipulado por la OMS (2007), en países en desarrollo, las ETA constituyen la causa principal de patologías y muertes en la población humana, relacionadas conjuntamente a aspectos socio-económica considerables, como la escases de recursos hídricos implementados en la agricultura; el reconocimiento de dichas enfermedades está dada por la complejidad sintomatológica en el tracto gastrointestinal, como: vómito, diarreas, dolores abdominales, fiebre, entre otras sintomatologías. En los últimos años se ha estimado que alrededor del 70% de las diarreas, son producidas por el consumo de alimentos contaminados con agentes químicos y/o biológicos, entre los que se encuentran los parásitos (Olea *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2016).

Hoy en día, los parásitos transmitidos por alimentos constituyen uno de los grupos etiológicos más representativos y relevantes en salud pública. Esto se genera no solo por el uso de efluentes contaminados con agua residual y biosólidos en cultivos de consumo directo, sino por la inapropiada manipulación de frutas y verduras durante su cadena de producción (cultivo, distribución, transformación, empaque y venta), la cual puede contribuir como una de las causas de contaminación (Briñez *et al.*, 2012). Entre los parásitos relevantes transmitidos por alimentos, se hallan géneros y especies como *Ascaris lumbricoides*, *Tenia solium*, *Trichuris trichiura*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, entre otros; (Montañez *et al.*, 2020).

Debido a su alta incidencia y prevalencia en alimentos de consumo directo, se exponen a continuación algunos parásitos de interés en salud pública usualmente transmitidos por alimentos y aguas empleadas en el riego de cultivos:

2.5.1 *Giardia* spp.

Las especies pertenecientes al género *Giardia*, se identifican por ser parásitos protozoarios cosmopolitas, entéricos, unicelulares flagelados y por habitar el tracto intestinal de una amplia gama de mamíferos (incluido el ser humano) (Ortega, 2013). La giardiasis, enfermedad producida por este parásito, se destacó en la “Iniciativa de Enfermedades Desatendidas” de la OMS en el año 2004, debido a su prevalencia en zonas con alto índice de pobreza (Savioli *et al.*, 2006). Países tanto de Asia, como África y América Latina cuentan con millones de personas con giardiasis sintomática (Yaoyu & Xiao, 2011). Los síntomas pueden variar desde diarrea crónica, dolor abdominal, deshidratación y malabsorción de los nutrientes, lo que en niños se traduce en un impacto adverso en su crecimiento y desarrollo intelectual (Ramírez *et al.*, 2015; Ortega, 2017). También puede cursar como enfermedad asintomática.

En Argentina, Perú y Colombia, las tasas de infección por *Giardia* varían entre el 6% al 42%, lo que depende del factor socioeconómico y sanitario de la población analizada (Rosado-García *et al.*, 2017). Según lo reportado por Ramírez y colaboradores (2015), en Colombia la prevalencia de *Giardia* oscila entre el 11% y 61% en la población infantil.

Algunos investigadores han propuesto seis especies distintas; cinco de estas se relacionan a: anfibios (*G. agilis*), aves (*G. ardeae*, *G. psittaci*), roedores (*G. muris*) y ratones de campo (*G. microti*); la sexta hace referencia a cepas de *Giardia* aisladas de una gran variedad de mamíferos; y se han agrupado en una sola especie por poseer características morfológicas muy similares. Dicha especie se ha clasificado como *G. duodenalis*, (sinónimo de *G. intestinalis* y/o *G. lamblia*) (Monis *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2013). De acuerdo a la información genética recopilada, se ha discriminado a la especie *G. duodenalis* en 8 genotipos que van desde la A a la H (Tabla 2.2) (Yaoyu & Xiao, 2011; Ortega, 2017)(Yaoyu & Xiao, 2011; Ortega, 2017).

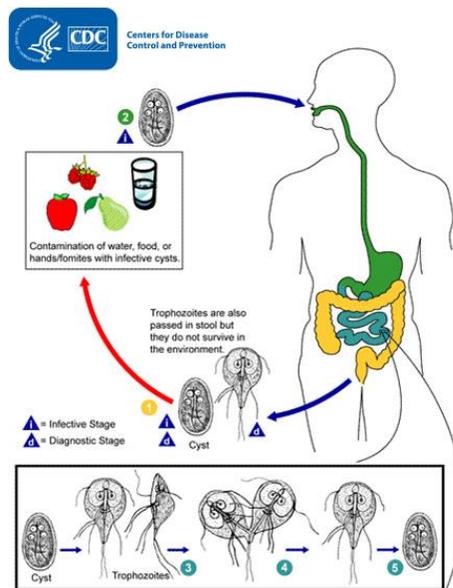
Tabla 2.2. Genotipos de *G. duodenalis*. Adaptado de:(Ryan & Cacciò, 2013; Ortega, 2017)

Genotipo	Hospedero	Nombre propuesto de la especie
A	Seres humanos y otros primates, ganado, perros, gatos y algunas especies de mamíferos salvajes	<i>Giardia duodenalis</i>

B	Humanos y otros primates, perros, gatos y algunas especies de mamíferos salvajes	<i>Giardia enterica</i>
C-D	Perros y otros cánidos	<i>Giardia canis</i>
E	Ganado ungalado	<i>Giardia bovis</i>
F	Gatos	<i>Giardia cati</i>
G	Ratas	<i>Giardia simondi</i>
H	Animales marinos: Focas (Pinnipedia) y gaviotas	-

El ciclo biológico de *Giardia* comprende dos fases: el trofozoíto que es la forma vegetativa, y el quiste que es la forma resistente e infectante; la cual garantiza la supervivencia del parásito fuera del hospedador. La infección puede ocurrir por la ingesta de agua y alimentos contaminados con quistes viables, o por vía fecal-oral, ya sea por medio del contacto persona-persona, o animal-persona (Una Ryan & Cacciò, 2013). En la Figura 2.1 se representa el ciclo biológico del *Giardia duodenalis*.

Figura 2.1. Ciclo biológico de *Giardia duodenalis* Fuente:(CDC, 2021)



Una vez los quistes se ingresan en el tracto intestinal del hospedador, el quiste se posiciona en el duodeno del intestino delgado. Allí la cubierta protectora del quiste se rompe y se liberan dos trofozoítos, los cuales se adhieren y multiplican (por fisión binaria) en el revestimiento luminal del intestino delgado. Muchos de los trofozoítos se dirigen al colon,

donde inician su proceso de enquistamiento; liberando quistes en las heces para ser expulsados y de esta forma continuar con su ciclo biológico (Ortega, 2013).

2.5.2 *Cryptosporidium* spp.

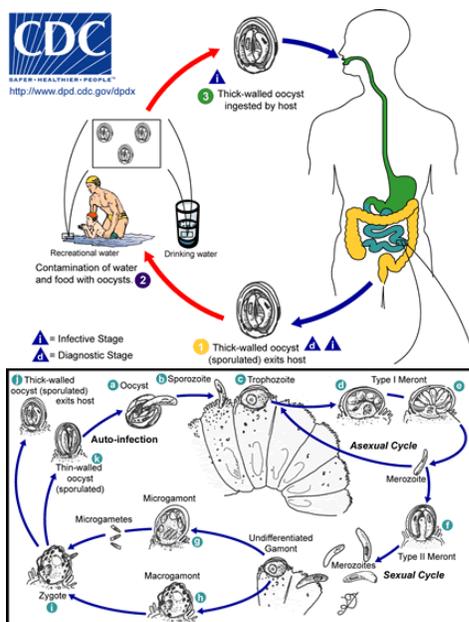
El género *Cryptosporidium* pertenece al filo Apicomplexa, orden Eucoccidiorida y familia Cryptosporidiidae. Estudios genómicos han sido empleados para la transferencia formal de *Cryptosporidium* de la subclase Coccidia, clase Coccidiomorpha, a una nueva subclase, Cryptogregaria, dentro de la clase Gregarinomorpha, donde se han descrito hasta la fecha más 38 especies (Arias-agudelo *et al.*, 2019; Chalmers *et al.*, 2019; Montañez *et al.*, 2020). *C. parvum* y *C. hominis* constituyen alrededor del 90 % de la criptosporidiosis en seres humanos en el mundo, el 10% restante, se le atribuye a *C. meleagridis*. Según lo reportado por Xiao (2010), ciudades como Lima - Perú y Bangkok - Tailandia, *C. meleagridis* llega a ser tan prevalente en la población humana, como la especie *C. parvum*, siendo responsable del 10 al 20 % de los casos de criptosporidiosis reportados en dichas ciudades.

Cryptosporidium se reconoce por ser un parásito intracelular obligado. Este parásito infecta e invade principalmente células epiteliales de las vías del tracto gastrointestinal, de humanos y animales (Quintero-Betancourt *et al.*, 2002). En una gran variedad de especies de vertebrados, como peces, reptiles, aves, pequeños mamíferos (roedores, gatos, perros), y grandes mamíferos (en particular ganado vacuno y ovino); se ha reportado la presencia del parásito (Venturini *et al.*, 2006). *Cryptosporidium* es el agente causal de la criptosporidiosis, enfermedad que afecta las células epiteliales del tracto intestinal. Los efectos de la enfermedad van desde la ausencia de síntomas hasta la muerte del paciente; esto depende del estado inmunitario del hospedero. El principal síntoma de la criptosporidiosis es la diarrea, la cual puede relacionarse con deshidratación, pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos. La criptosporidiosis ocurre a nivel mundial, no obstante, en regiones con saneamiento e higiene inadecuados donde su prevalencia es mayor (Hofstra *et al.*, 2013). En Suramérica se reportan cifras de infección entre el

1 % y el 37 %, al evaluar heces de pacientes con gastroenteritis, siendo la población infantil la de mayor vulnerabilidad (Rosado-García *et al.*, 2017; Ortega, 2017).

De acuerdo a la clasificación para parásitos transmitidos por alimentos a nivel mundial desarrollada por la FAO y la OMS, *Cryptosporidium* se sitúa entre los 5 parásitos de mayor interés (Food and Agriculture Organization of the United Nations & WHO, 2014). Para el período 2009-2017 se notificaron 183 (41.2%) brotes que resultaron en 5,015 (67.2%) casos transmitidos por el agua. El número anual de brotes de criptosporidiosis informados en general aumentó en promedio cerca del 13% al año (Gharpure *et al.*, 2019). En la Figura 2.2 se aprecia el ciclo biológico de *Cryptosporidium hominis*.

Figura 2.2. Ciclo biológico de *Cryptosporidium hominis* Fuente: (CDC, 2021)



El ciclo biológico de *Cryptosporidium* es monoxeno (se realiza en un único hospedero) y comprende de dos fases: el esporozoíto y el ooquiste, el cual corresponde a la forma infectante del parásito; el tamaño de los ooquistes oscila alrededor de los 4 a 6 μm de diámetro; poseen una morfología redonda, aunque

pueden llegar a ser ligeramente ovoides. Los ooquistes cuentan con una pared protectora resistente que les permite sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables (Navarro-I-Martinez *et al.*, 2011; Jenkins *et al.*, 2010).

2.5.3 *Toxoplasma gondii*

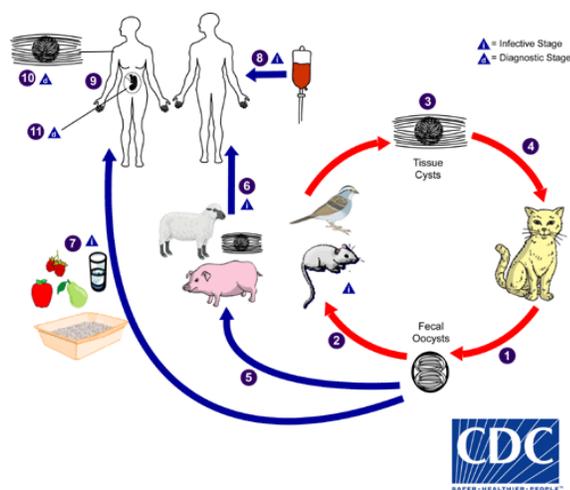
La toxoplasmosis es una enfermedad causada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. Se estima que aproximadamente un tercio de la población humana se encuentra infectada con el parásito. Es una de las infecciones parasitarias más relevante y reconocida en el mundo (Saadatiania & Golkar, 2012). La prevalencia de casos positivos pueden variar ampliamente, no solo entre países (10% - 80%), sino entre diferentes comunidades de la misma región (Montoya & Liesenfeld, 2004; Pappas *et al.*, 2009). En América del Norte, sudeste asiático, norte de Europa y países africanos, se han reportado seroprevalencias que van desde el 10% al 30%. En Europa central y meridional, se han informado prevalencias entre el 30% al 50%. En América Latina y países de África tropical, los reportes evidencian prevalencias mucho más altas (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

La toxoplasmosis puede ser aguda o crónica, sintomática o asintomática. La infección aguda recientemente adquirida suele ser asintomática. En muchas ocasiones los síntomas suelen ser de corta duración y autolimitados. En el desarrollo de quistes tisulares, el paciente no suele tener manifestaciones clínicas (infección crónica). Los síntomas de la toxoplasmosis se encuentran relacionados con la hinchazón de los ganglios linfáticos, hígado, bazo, dolor muscular y fiebre; no obstante, la sintomatología puede variar dependiendo tanto la cepa del parásito, como del estado inmune del hospedero (Gallas-Lindemann *et al.*, 2013; Rosado-García *et al.*, 2017). En pacientes inmunocomprometidos, la infección llega a resultar en toxoplasmosis diseminada, por medio de la multiplicación del parásito en el músculo, pulmones, tejido neural y ocular. En mujeres embarazadas, puede producirse aborto y efectos adversos al feto (infección congénita) (Shapiro *et al.*, 2010).

T. gondii posee un ciclo de vida con fase sexual y asexual. La fase sexual ocurre únicamente en individuos pertenecientes a la familia *Felidae* (huéspedes definitivos de dicho parásito). Durante su ciclo de vida, *T. gondii* presenta tres etapas de desarrollo que pueden infectar las células del huésped, el taquizoíto, la cual es una forma de multiplicación rápida; el bradizoíto, es una forma de multiplicación lenta ; y el esporozoíto, el cual se produce solamente en felinos durante la reproducción sexual, y son liberados en los ooquistes a través de las heces felinas (Attias *et al.*, 2020).

Este parásito llega a diferenciarse en gametocitos masculinos y femeninos en el epitelio intestinal de los felinos, lo que hace posible su reproducción sexual. En este tipo de reproducción, los gametocitos se fusionan para originar un cigoto originara un ooquiste con esporozoitos. Los felinos infectados defecan alrededor de millones de ooquistes; una vez el ooquiste es expulsado al ambiente, realiza el proceso denominado esporulación, que puede generarse entre 1 y 21 días. Dada la esporulación, los cuatro esporozoítos haploides contenidos en cada uno de los dos esporoquistes del ooquiste, “maduran” lo que a su vez da lugar a ooquistes infecciosos. En la Figura 2.3 se representa el ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Figura 2.3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Fuente: (CDC, 2020)



La mayoría de las transmisiones en el humano, son causadas por la ingestión de quistes tisulares presentes en carne infectada, o por la ingesta de agua y/o alimentos

contaminados con ooquistes esporulados derivados del medio ambiente (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

A nivel mundial se han documentado varios casos de brotes de toxoplasmosis que se debieron al consumo de agua contaminada con ooquistes esporulados (Rosado-García *et al.*, 2017). De acuerdo a lo reportado por Attias (2020), en EEUU se estima que el 11% de la población de niños mayores de seis años, ha sido infectada con *T. gondii*. Mérida, ciudad capital de Yucatán-México, es considerada como área endémica de *T. gondii*, ya que cuenta con un alto porcentaje de seroprevalencia en la población humana, con rangos que oscilan entre el 25% y el 91%, asociados al consumo de agua (Hernandez *et al.*, 2017).

En una investigación desarrollada por Pino y colaboradores (2009), realizada en La Macarena, Meta – Colombia, logro reportar un brote epidémico causado por *Toxoplasma gondii* en personal militar durante el desarrollo de operaciones en campo. Los síntomas relevantes de los pacientes fueron fiebre, adenopatías y compromiso pulmonar y gastrointestinal. La hipótesis que manejaron los autores con base al brote epidémico fue en relación con el posible consumo de agua contaminada con ooquistes esporulados.

2.6 Helmintos parásitos intestinales

Las helmintiasis son una de las parasitosis más comúnmente descritas en el mundo, llegando a afectar a las comunidades más desfavorecidas. Según la OMS, se estima que, en el 2018, el 25% de la población mundial se encontraba infectada con helmintos (Vidal-Anzardo *et al.*, 2020). Las helmintiasis están ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales, y se clasifican entre los filos Nematoda o nematelmintos (gusanos redondos) y Platelminthes (gusanos planos); estos últimos se subdividen en cestodos (Tenias) y trematodos (*Fasciola*, *Esquistosoma* y *Paragonimus*) (Coakley *et al.*, 2016; Guadagnini *et al.*, 2013; Prieto-pérez *et al.*, 2016). Según la OMS, los helmintos se transmiten principalmente a través de la ingesta de huevos por alimentos contaminados con residuos fecales (OMS, 2012).

Entre las infecciones con mayor registro a nivel mundial, se encuentran la ascariasis, trichuriasis, fasciolosis, teniasis, cisticercosis entre otras patologías. aproximadamente mil millones de personas alrededor del mundo se encuentran infectadas por la especie *Ascaris lumbricoides* (parásito de distribución mundial) (Guadagnini *et al.*, 2013; Burnet *et al.*,

2014). El ciclo biológico puede variar dependiendo de la especie. La infección se genera a partir de la ingesta de huevos viables, los cuales eclosionan y liberan larvas inmaduras dentro del intestino delgado para iniciar su desarrollo (Collender *et al.*, 2015). Según el informe de la FAO / OMS (2014), el cual presentó una clasificación de parásitos transmitidos por alimentos; resalto en su ranking a *Ascaris* spp. en el noveno lugar de relevancia. De alrededor de 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en 2010, *Ascaris* spp. se reportó como el más frecuente, causando 14 millones de casos en todo el mundo (OMS, 2015).

Los nematodos o nematelmintos, se caracterizan por presentar formas cilíndricas, las cuales están cubiertas por una capa no segmentada; poseen un aparato reproductor completo, gran parte de los individuos son dioicos, con dimorfismo sexual, donde las hembras presentan generalmente un mayor tamaño que los machos; estos a su vez, se caracterizan por presentar un extremo posterior curvo, con espículas copulatorias. Entre los nematodos más representativos a nivel clínico, se encuentran las especies: *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, Uncinarias (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) y *Strongyloides stercoralis* (Navone *et al.*, 2011).

La clase Tremátoda, comprende un grupo importante de gusanos planos parásitos de importancia médica y veterinaria. Los tremátodos se caracterizan por ser aplanados dorsoventralmente, con simetría bilateral, y por poseer órganos de fijación (ventosa), los cuales les permiten su adhesión a diferentes superficies; gran parte de los individuos parasitarios son hermafroditas. (R. Toledo *et al.*, 2006).

Los cestodos son helmintos parásitos de humanos y animales. Comprende el grupo de helmintos acintados o planos, los cuales se caracterizan por ser parásitos hermafroditas en su fase adulta, y por presentar cuerpos compuestos por segmentos que incluyen un escólex. El escólex cuenta con órganos de fijación (ventosas) que permiten la unión a la mucosa intestinal. El cuerpo de estos individuos también constan de un cuello, y segmentos denominados proglótides que transportan los órganos reproductores (Craig & Ito, 2007). Cada proglótide posee órganos reproductores masculinos y femeninos que maduran a

medida que emergen del cuello y crecen distalmente. Dentro de esta Clase, se encuentran *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia saginata* y *Taenia solium* (Webb & Cabada, 2017).

2.7 Normativa nacional e internacional para el uso seguro del agua en la agricultura

El uso seguro de agua residual en la agricultura contempla las guías que reglamentan el reciclaje del recurso a través de las directrices de la Organización Mundial de la Salud. El principal objetivo de estas Directrices es proteger y promover la salud pública. Dichas guías son un marco integrado de gestión preventiva para maximizar los beneficios del uso de aguas residuales y excretas en la agricultura y la acuicultura, sin afectar la salud de las poblaciones (WHO & UNEP, 2006).

Tabla 2.3. Valores guía, para el monitoreo de verificación en sistemas de tratamiento a gran escala de aguas residuales, excretas y lodos fecales para uso en agricultura. Adaptado de WHO & UNEP, (2006)

	Huevos de helmintos (N° por gramo de sólidos totales o por litro)	<i>E. coli</i> (número por 100 mL)
Heces tratadas y lodos fecales	<1/g de sólidos totales	<1000/g sólidos totales
Aguas grises para uso en:	<1/L	<10 ^{5a}
• Riego restringido		a <10 ⁶ cuando la exposición es limitada o es probable que vuelva a crecer
• Riego no restringido de cultivos consumidos crudos	<1/L	<10 ³ a <10 ⁴ para cultivos de hojas de alto crecimiento o riego por goteo

^a Estos valores son aceptables debido al potencial de crecimiento de *E. coli* y otros coliformes fecales en agua residual.

Las Directrices se basan en un componente sanitario y un componente de implementación, la protección de la salud depende de ambos elementos. En la Tabla 2.3, se ilustran los valores guía, para el monitoreo de verificación en sistemas de tratamiento a gran escala de aguas residuales, excretas y lodos fecales para uso en agricultura (WHO & UNEP, 2006). En general, los países que poseen una legislación referente a la reutilización de

aguas residuales, toman como directriz lo estipulado por la OMS (Silva & Torres, 2008; Heredia & Sánchez, 2014).

Referente al territorio nacional, Colombia cuenta con el Decreto 1076 de 2015, numerales 2.2.3.3.2.5 y 2.2.3.3.2.8, donde se establecen los criterios de calidad para uso agrícola; no obstante, desde el punto de vista microbiológico solamente se considera el Número Más Probable (NMP) de coliformes totales y de coliformes fecales. En dicho decreto, no se establecen criterios de calidad basados en los límites máximos para microorganismos parásitos patógenos como huevos de helmintos y (Oo)quistes de protozoarios (Departamento Administrativo de la Función Pública, 2015).

Por otro lado, la Resolución 1256 de 2021 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, reglamenta el uso de las aguas residuales, en el artículo 5 establece los criterios mínimos de calidad, dentro de los cuales no se consideran los parásitos (helmintos y protozoarios) en aguas a reutilizar, y no se estipulan valores para alimentos de consumo directo como las hortalizas (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2021)

3.Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Identificar y determinar la prevalencia de parásitos de interés en salud pública, en aguas de riego y hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la presencia de protozoarios en aguas utilizadas para riego de hortalizas en La Sabana Occidental de Cundinamarca.
2. Identificar los protozoos de interés en salud pública (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.), presentes en aguas de riego, utilizando técnicas moleculares.
3. Evaluar la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas cultivadas en el distrito de riego La Ramada, mediante el uso de técnicas parasitológicas.
4. Realizar un ensayo piloto para la remoción de huevos de *Ascaris* spp., como indicador de calidad parasitológica en agua de riego.

4. Metodología:

4.1 Zona de estudio: Antiguo Distrito de riego y drenaje La Ramada:

El estudio se llevó a cabo en el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada, ubicado en los municipios de Mosquera y Funza del departamento de Cundinamarca (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2010). El agua que circula por el distrito, es captada de la cuenca media del río Bogotá (CAR, 2011), efluente caracterizado por ser uno de los sistemas hídricos más alterados del país (Alcaldía Mayor de Santa Fé de Bogotá 2012). Actualmente, La Ramada se encarga de proporcionar un servicio permanente de irrigación y drenaje de las aguas provenientes del río Bogotá mediante obras de infraestructura hidro-agrícola, las cuales se extienden por los municipios de Mosquera, Tenjo, Funza, Cota, Madrid y Bojacá (CAR, 2009).

El antiguo distrito La Ramada comprende un área aproximada de 23.000 ha, y se encuentra constituido por tres unidades principales: La Unidad I-La Ramada, es la de mayor antigüedad, abarca los municipios de Mosquera y Funza, con aproximadamente 6.500 hectáreas. La Unidad II-La Isla, cubre los municipios de Funza, parte de Cota y Tenjo y posee un área aproximada de 2.540 hectáreas. Finalmente, la Unidad III-La Herrera, corresponde al sector Bojacá, ubicado en el costado suroccidental de la Sabana de Bogotá, y cuenta con cerca de 4.100 hectáreas. Existen además las unidades IV y V que corresponden a las etapas de ampliación III, IV y V del antiguo distrito de riego y drenaje (CAR, 2011).

En la zona predominan diferentes cultivos de hortalizas, con un porcentaje de área cultivada del 75%, seguido por los cultivos de papa y el sector floricultor, con un 20% y 5% (respectivamente); por lo que se benefician cerca de 800 usuarios y productores. Muchos de estos cultivos se encuentran aledaños a zonas urbanas e industriales, las cuales, aparte de verter aguas residuales domésticas e industriales a los canales de riego, no son tratadas de manera adecuada para su reúso en la agricultura (DANE, 2002). De acuerdo con estudios reportados por otros autores, se conoce que la calidad microbiológica y

parasitológica del agua empleada para riego de cultivos, no cumple con la normatividad Nacional e Internacional.

4.2 Muestreo de aguas

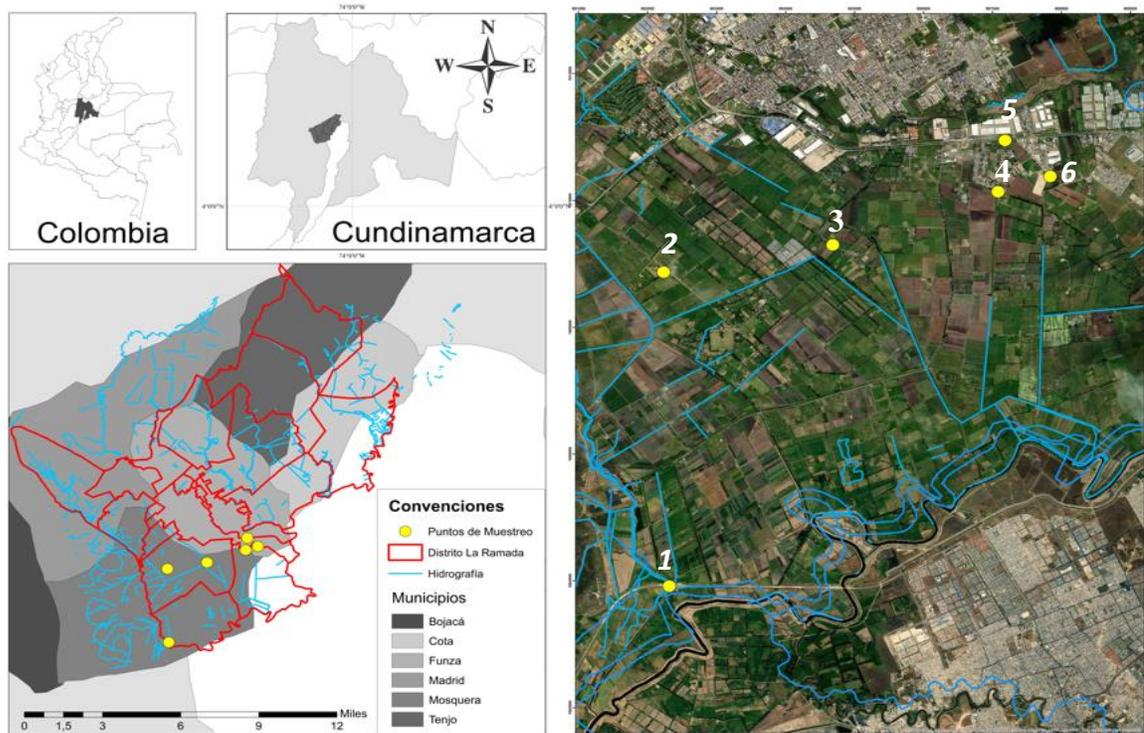
Se colectaron 96 muestras de aguas durante los meses de junio a noviembre del año 2019, en 6 puntos estratégicos del antiguo distrito La Ramada, como sigue: Tabaco (sitio 1; longitud: -74,240309, Latitud: 4,634444), Venecia (sitio 2; longitud: -74,196457, Latitud: 4,698042), Marengo (sitio 3; longitud: -74,218966, Latitud: 4,683125), Villa Cetty (sitio 4; longitud: -74,197369, longitud: 4,690720), Entrada (sitio 5; longitud: -74,196457, Latitud: 4,698042) y Lucero (sitio 6; longitud: -74,190544, Latitud: 4,692900) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Fecha y número de muestras colectadas en el distrito La Ramada.

Muestreo	n	Temporada de lluvia	Muestreo	n	Temporada seca
1	6	6/06/2019	1	6	2/07/2019
2	6	11/06/2019	2	6	26/07/2019
3	6	18/10/2019	3	6	31/07/2019
4	6	19/10/2019	4	6	8/08/2019
5	6	12/11/2109	5	6	12/08/2019
6	6	14/11/2019	6	6	31/08/2019
			7	6	4/09/2019
			8	6	12/09/2019
			9	6	15/09/2019
			10	6	20/09/2019
Total:	36			60	

Los 6 puntos se clasificaron en dos zonas de acuerdo a su actividad: zona con actividad agrícola (puntos 1, 2 y 3) y zona de actividades mixtas (urbanas, industrial y agrícola) (puntos 4, 5 y 6) (Figura 4.1). En los anexos del 1 al 6, se presenta el registro fotográfico para cada lugar de muestreo.

Figura 4.1. Distribución geográfica de los sitios muestreados de Aguas utilizadas para riego de hortalizas, del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada. Fuente: Elaboración propia, usando el software ArcMap 10.8.

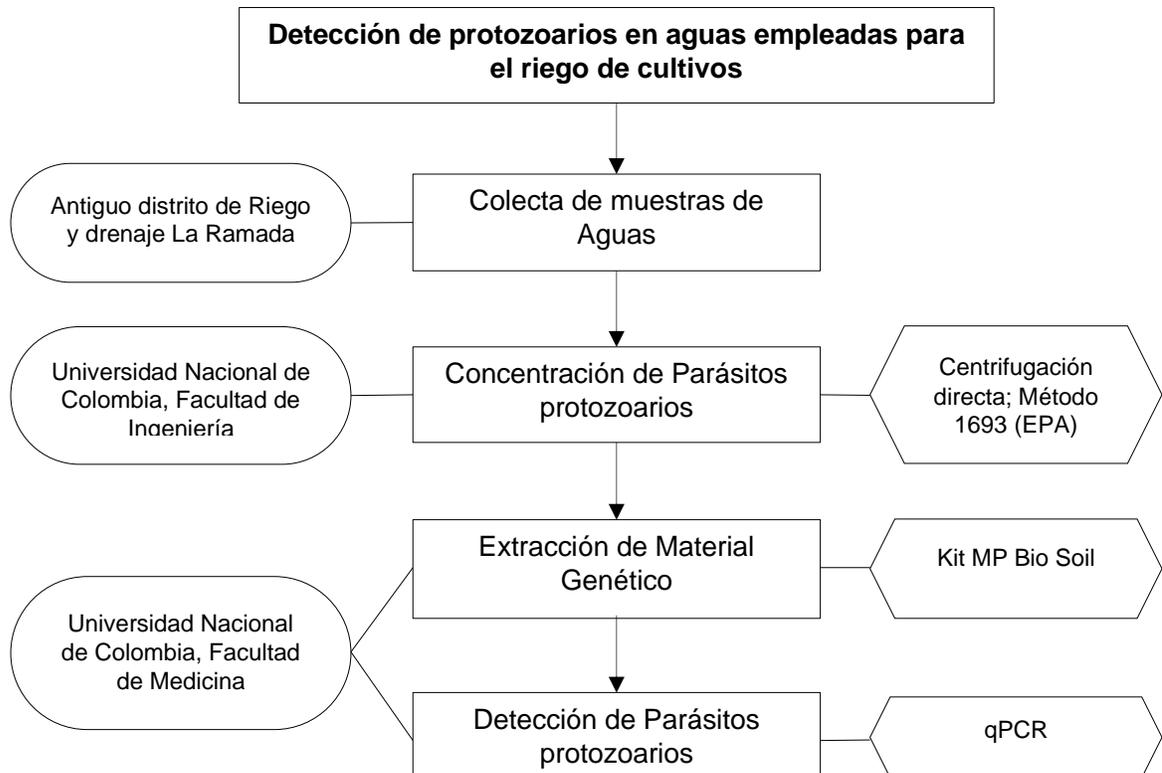


Para la identificación de protozoarios, se tomó como mínimo un volumen total de 1 litro (L). Las muestras se transportaron en recipientes de plástico con capacidad de 2 L, los cuales fueron previamente desinfectados y enjuagados con Solución de Tween 80, para evitar la adherencia de los (oo)quistes al recipiente. (Chandillo & Sánchez 2020). Las muestras se trasladaron en cadena de frío al laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento.

Adicionalmente se tomaron muestras para análisis fisicoquímicos y microbiológicos, cuyos resultados fueron presentados en las tesis de maestría de Carlos Sánchez, titulada: *“Evaluación de la toxicidad en sedimentos de los canales del Distrito de Riego de La Ramada mediante la utilización de dos bioensayos”* y Alejandra Oviedo, titulada: *“Identificación de bacterias resistentes a betalactámicos en aguas para riego agrícola en La Ramada, Cundinamarca”* y se utilizaran como complemento para la discusión de los resultados aquí obtenidos. Las cuales hacen parte del macroproyecto titulado: *“Identificación de contaminantes emergentes y microbiológicos, análisis metagenómico*

bacteriano y perfil de resistencia a antibióticos en aguas de riego y hortalizas de la Sabana occidental de Cundinamarca” del 2018.

Figura 4.2. Diagrama de flujo para la detección de parásitos protozoarios en aguas empleadas para riego agrícola



4.2.1 Análisis parasitológico para la detección de Protozoarios en muestras de aguas: Concentración

La concentración de protozoos intestinales que pudieran estar presentes en las 96 muestras colectadas, se desarrolló empleando la metodología de centrifugación directa descrita en el método 1693 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2014). Dicha técnica, se escogió teniendo en cuenta la alta turbidez que presentaron las muestras ("muestras no filtrables"). El método utiliza una solución de Tween® 80, la cual ayuda a solubilizar las grasas, aceites y compuestos orgánicos que puedan estar presentes en el agua, facilitando la recuperación y detección de los parásitos protozoarios de interés (EPA, 2014).

Para ello, se midió y colocó 1 L del agua de riego en un vaso de precipitado limpio con capacidad de 2 L, el cual fue agitado en una plancha con la ayuda de una barra magnética. Durante la agitación, se adicionaron 50 mL de Tween 80 al 20%, mezclando durante 15 minutos. Luego, esta mezcla fue transferida a tubos de centrifuga de 50 mL, y se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos. Una vez centrifugados, se usó una pipeta Pasteur para retirar el sobrenadante, dejando 5 mL de este junto al sedimento obtenido. Finalmente, se transfirieron y combinaron los sedimentos en un único tubo de centrifuga, se repitió la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y se registró el volumen total del sedimento, el cual fue almacenado a 4°C hasta el paso de extracción de ADN (EPA, 2014).

4.2.2 Extracción del ADN

Una vez obtenido el sedimento, se procedió a extraer el ADN por medio del FastDNA™ SPIN Kit for Soil(MP Bio), con la ayuda del instrumento *Super FastPrep-2^{MT}*(MP Bio). El procedimiento se describe a continuación:

1. *Preparación de la muestra:*

- Después de obtener la muestra concentrada, realizar Vortex por 40 segundos para su homogeneización.
- Adicionar 250 uL de muestra en un tubo de *Lysing Matrix E*, junto con 978 ul del buffer fosfato de sodio, y 122 uL del *buffer MT* (Solución detergente).

2. *Homogenización:*

- Colocar el tubo de *Lysing Matrix E* en el instrumento *Super FastPrep-2^{MT}*, a velocidad de 6.0 m/s durante 40 segundos. Repetir este paso, con un intervalo de reposo de 30 segundos entre cada homogenización.
- Centrifugar a 14.000 g por 15 minutos.

3. *Precipitación de proteínas:*

- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 2.0 mL. Añadir 250 uL de PPS (Solución para la precipitación de proteínas). Mezclar el tubo por inversión (10 veces).
- Centrifugar a 14000 g por 5 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 15 mL. Adicionar 1 mL del *Binding Matrix*. Agitar por inversión durante 3 - 5 minutos para permitir la unión del ADN a la matriz.

- Transferir 600 μ L a un tubo *SPIN Filter*.
 - Centrifugar a 14000 g por un minuto. Eliminar el sobrenadante.
 - Añadir nuevamente 600 μ L de la mezcla restante del tubo de 15 mL. Repetir la centrifugación del paso anterior. Eliminar el sobrenadante.
4. *Lavado del SPIN Filter*
- Añadir 500 μ L de *SEWS-M* preparado a una concentración del 100%, al tubo *SPIN Filter*.
 - Centrifugar a 14000 g por un min
5. *Secado del filtro SPIN*
- Transferir el *SPIN Filter* a un tubo de captura nuevo y limpio de 2 mL.
 - Sin adicionar ningún líquido, centrifugar a 14000 g por 2 min.
 - Dejar secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. *Elución del ADN*
- Adicionar cuidadosamente 50 μ L de *DES* (DNAsa / Progen-Free Water) al tubo. Centrifugar a 14000 g por un minuto para eluir el ADN dentro del tubo de captura.
 - Descartar el *SPIN Filter*. Almacenar el ADN -20°C hasta su uso.

Se efectuó el control de calidad sobre la ejecución del procedimiento, donde se incluyó un control o blanco de extracción cada 15 montajes. Este fue desarrollado en la misma área, con los mismos reactivos y al mismo tiempo de la extracción en las muestras procesadas. La cuantificación del ADN extraído se realizó por duplicado utilizando un sistema NanoDrop®

4.2.3 Detección de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma gondii* y por qPCR.

Los cebadores y la sonda usados para la detección de *Giardia duodenalis* en este estudio, han sido descritos por Mejía *et al.* (2013); la sonda cuenta con un reportero 6-FAM (Max excitación: 494 nm; Max emisión: 525 nm). Para *Cryptosporidium* spp. Se siguió el protocolo publicado por Burnet *et al.*, (2013); y para la detección de *T. gondii* se usaría el protocolo propuesto por Temesgen *et al.*, 2019; y Opsteegh *et al.*, 2010. (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Sondas y Primes específicos utilizados en el presente estudio.

Parásito	Tamaño del amplicon	forward	Región Blanco	Referencia
		reverse sonda		
<i>Giardia Duodenalis</i>	88pb	CATGCATGCCCCGCTCA AGCGGTGTCCGGCTAGC	18S ARNr	(Mejia <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	107pb	GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGT-TAGG GAGTAAGGAACAACCTCCAA-TCTCTAG	18S ARNr	(Burnet <i>et al.</i> , 2013)
<i>Toxoplasma gondii</i>	162pb	AGGAGAGATATCAGGACTGTAG GCGTCGTCTCGTCTAGATCG Cy5-CCGGCTTGGCTGCTTTTCCT-MGBEQ	B1 gene	(Temesgen <i>et al.</i> , 2019); (Opsteegh <i>et al.</i> , 2010)

4.3 Muestreo de hortalizas irrigadas con aguas de La Ramada

Se colectaron 120 muestras de hortalizas en 3 zonas estratégicas localizadas en el área de influencia del antiguo distrito de riego La Ramada: sitio 1, sitio 2 y sitio 3. Las muestras de hortalizas se colectaron en el momento de cosecha, donde se tuvo en cuenta plantas de consumo directo como: la lechuga y el apio. Se realizaron un total de ocho muestreos durante los años 2019 y 2021 en temporada de lluvia y seca. En el anexo 7, se puede apreciar el registro fotográfico de los sitios muestreados.

Para cada año se efectuaron 4 muestreos, completando un total de 60 muestras por año. En el año 2019, se realizaron las colectas en tres diferentes sitios de muestreo: Sitio 1 (n=93), sitio 2 (n=21) y sitio 3 (n=6); durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre (12 muestras de apio y 48 muestras de lechuga). Debido a las dificultades presentadas por la pandemia actual (COVID-19), no fue posible desarrollar colectas durante el año 2020, y en el año 2021, únicamente se muestreo el Tabaco (n=60), durante julio, agosto, septiembre y octubre. Las 120 muestras de hortalizas se distribuyeron como se representa en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Fecha y número de muestras colectadas por sitio de muestreo.

Sitio de muestreo	Hortaliza	Fecha	n
Villa Cetty	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	23/10/2019	6
Total de muestras colectadas en Villa Cetty			6
Marengo	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	24/08/2019	9
		18/11/2019	12
Total de muestras colectadas en Marengo			21
Tabaco	Apio (<i>Apium graveolens</i>)	23/10/2019	6
		14/11/2019	6
		2/09/2019	9
	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	14/11/2019	12
		12/07/2021	17
		30/08/2021	17
		28/09/2021	13
	20/10/2021	13	
Total de muestras colectadas en Tabaco			93
TOTAL DE MUESTRAS COLECTADA EN LA RAMADA			120

Para la toma de muestras se propuso un diseño experimental netamente aleatorio. Consideraciones importantes de los cultivos de hortalizas fueron fundamentales como: el sistema de riego; distancia y densidad de la siembra; duración del ciclo de cultivo, entre otros parámetros (Elizondo, 2019). Por ejemplo, para el caso del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*), la toma de muestras fue al azar y de esta forma se minimizó el efecto de variabilidad que existe entre cada finca muestreada. Los cultivos de *L. sativa* se caracterizaron por presentar un sistema de siembra basado en camas de 1,2 m de ancho*100m de largo; una distancia de siembra de 0,3m*0,3m; una densidad de siembra de $\pm 100,000$ plantas/ha; una duración del ciclo de cultivo de 3 a 4 meses y un sistema de riego basado en aspersores, cada uno con un rango de riego de 6 a 8m de distancia (Sánchez, 2020).

La colecta de hortalizas utilizó el método de cuarteo descrito por Campos *et al.* (2017). Dicho método, consistió en realizar un proceso de división sistemático; permitiendo un muestreo representativo del cultivo (Sánchez, 2020).

Se seleccionaron nueve sitios de manera aleatoria, distribuidos en una parcela. Posteriormente, se colectaron nueve lechugas en cada sitio seleccionado. Cada lechuga representó una Pseudoréplica, mientras que el conjunto de nueve lechugas conformó la réplica. Cada réplica fue introducida individualmente en bolsas plásticas limpias, descartables, de primer uso, debidamente identificadas. Estas fueron transportadas inmediatamente en cadena de frío al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia; donde posteriormente se realizó el cuarteo de cada réplica para la obtención de cada muestra (Ortiz & Laura, 2008).

4.3.1 Análisis parasitológico, (Protozoarios y Helmintos):

Para la recuperación de parásitos intestinales en muestras de hortalizas, se siguió la metodología descrita por Matosinhos *et al.*, (2016). Se procedió a lavar manualmente 30 g de hortaliza con 200 mL de una solución de glicina 1M, con pH 5.5 y $d = 1,025$, en bolsas plástica limpias, durante 3 min. Posteriormente, las hojas fueron retiradas con pinzas, mientras que el líquido resultante en la bolsa fue tamizado en coladores y puesto a sedimentar durante 24 horas en un vaso cónico. A continuación, se retiró el sobrenadante cuidadosamente usando una pipeta de vidrio. El sedimento obtenido fue transferido a tubos de centrifuga de 15 mL para su posterior centrifugación a 1120 g durante 5 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, el sedimento fue observado entre lámina y laminilla en un microscopio bajo los objetivos de 10X y 40X (Matosinhos *et al.*, 2016). Esta metodología permitió la observación de huevos de helmintos presentes en las muestras.

4.3.2 Método de concentración de formol -éter (Ritchie modificado)

Para permitir la adecuada observación de los posibles (oo)quistes de protozoarios presentes en las muestras, fue necesario un paso adicional de purificación y concentración, empleando la técnica de Ritchie Modificado. Esta técnica se caracteriza por emplear formol-éter y centrifugación. El éter elimina los detritos orgánicos, mientras que el formol mantiene la integridad de las formas parasitarias (Triviño-Valencia *et al.*, 2016).

Los sedimentos fueron colocados en tubos de vidrio de 15 mL, agregando 2 mL de solución de formalina al 10%, y 1.2 mL de éter dietílico al 99% (en un volumen de muestra de 2 mL). Se mezcló en vortex durante 2 minutos para garantizar el contacto del éter dietílico con el sedimento. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 minutos, consiguiendo visualizar las capas diferenciales: (I) un sedimento en la parte inferior, (II) solución salina, (III) restos de agua y (IV) éter dietílico en la parte superior. Las tres capas superiores producto de la centrifugación fueron descartadas y se adicionaron 500 ul de solución salina al 0,85%, al sedimento obtenido, para proceder a la lectura entre lámina y laminilla en un microscopio bajo los objetivos de 10X y 40X.

4.3.3 Detección de quistes de *Giardia spp* y *Cryptosporidium spp* por inmunofluorescencia.

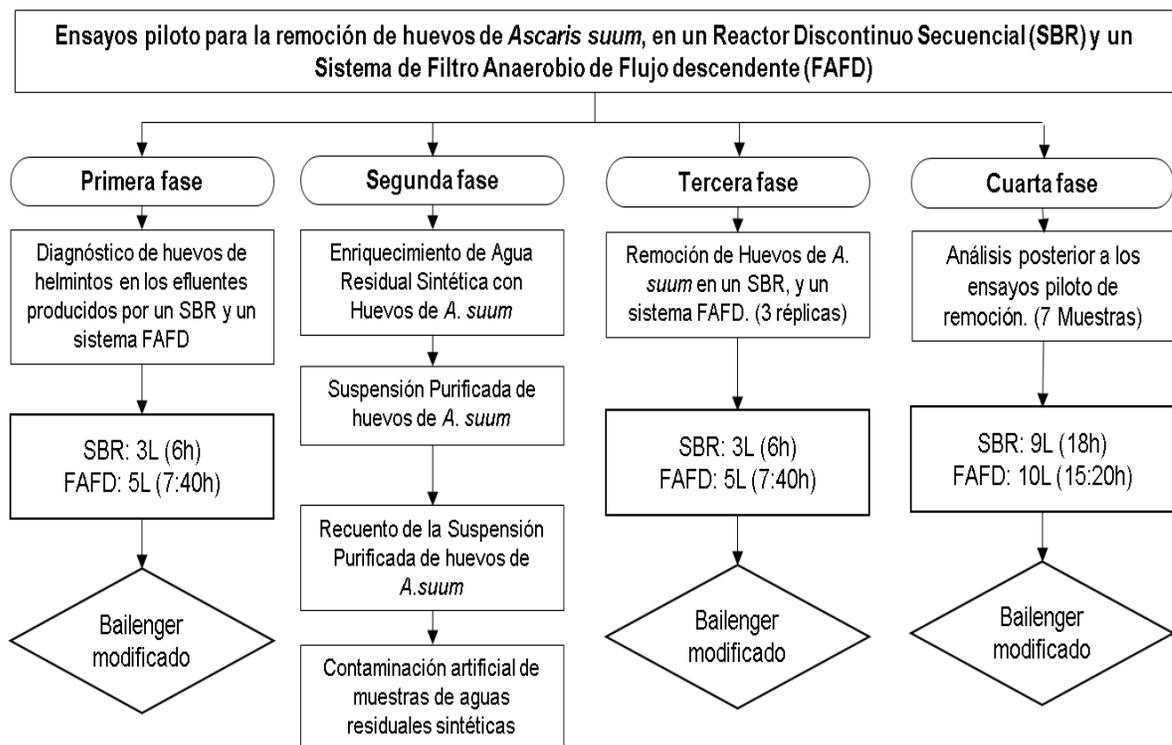
Realizada A partir del sedimento obtenido por el método de Ritchie modificado, se utilizó el Kit A100FLK Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensiv, para la detección de (oo)quistes de *Giardia* y *Cryptosporidium*. Este kit utiliza dos fluorocromos: el FITC (Isotiocianato de fluoresceína), visualizado en la membrana (oo)quística de los protozoarios, y el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual resalta los núcleos y/o citoplasmas de las células. Las estructuras (oo)quísticas aparecen de color verde manzana brillante cuando se observan bajo un filtro FITC (filtro de excitación en el rango de 450 - 490 nm), y azul brillante bajo el filtro DAPI (filtro de excitación de 350 nm). Los criterios de positividad se basaron en las características morfológicas establecidas en el método EPA 1693 (EPA, 2014).

Los quistes de *Giardia spp*, presentan un color verde manzana brillante, y miden de 5 a 15 µm de ancho por 8 a 18 µm de largo. Pueden presentar una forma redondeada u ovoide. Con DAPI, se pueden visualizar hasta cuatro núcleos teñidos con azul brillante (EPA, 2012). Los ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, también presentan un color verde manzana brillante, con un tamaño entre los 4 a 6 µm, la forma es esférica – ovoide. Bajo un filtro DAPI, se deberán visualizar hasta cuatro núcleos teñidos con azul brillante (EPA, 2012).

4.4 Ensayos piloto para la remoción de huevos de *Ascaris suum.*, como indicador de calidad parasitológica en agua de riego

Se evaluó la remoción de huevos de *Ascaris suum* (*A. suum*), en dos sistemas de tratamiento de aguas para riego a escala piloto y de laboratorio: un reactor discontinuo secuencial (SBR), y un sistema de filtro anaerobio de flujo descendente (FAFD). Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. En la figura 4.3, se presenta el diagrama de flujo con los pasos metodológicos desarrollados para esta actividad.

Figura 4.3. Diagrama de flujo, ensayos piloto para la remoción de huevos de *A. suum*, en un SBR y un sistema FAFD.



El SBR fue diseñado por la Ingeniera Viviana Duarte para la tesis de maestría titulada: “Desarrollo de un lodo granular aerobio para el tratamiento de aguas en un reactor discontinuo secuencial”; mientras que el sistema FAFD, lo diseñó el ingeniero Jesús Espitia para la tesis de maestría titulada: “Evaluación de un sistema de tratamiento a escala de laboratorio, para reducir la concentración de carga orgánica, bacterianas y/o parásitos utilizando agua residual sintética, con miras a su aplicabilidad en irrigación de cultivos en la sabana occidental de Bogotá – Cundinamarca”. Estas tesis hacen parte del proyecto: “Evaluación de tratamientos para la remoción de fármacos presentes en aguas utilizadas para riego en La Ramada y caracterización de la contaminación por microorganismos de interés en salud pública”, con código Hermes: 42163.

El método Baillenger Modificado por Ayres & Mara (1996), recomendado por la OMS fue empleado en estos ensayos para la detección y cuantificación de huevos de *Ascaris suum*. Dicho método, tiene por fundamento separar huevos de parásitos de otros detritos que pudieran estar presentes en las muestras por densidades relativas altas, producto del uso de éter o acetato de etilo en la solución. Este es un método estandarizado para la obtención de resultados fiables al trabajar un rango de 1L a 10L de muestra de acuerdo con sus características. El aumento de volumen aumenta la probabilidad y eficacia para detectar huevos en efluentes que cuenten con un tratamiento previo. El procedimiento se describe a continuación (Ayres & Mara, 1996).

Se toma una muestra de agua de un volumen conocido; la cual se coloca en un recipiente limpio y se deja sedimentar 2 horas como mínimo. Posteriormente, se remueve el 90% del sobrenadante usando una bomba de succión o una bomba de vacío. Se transfiere cuidadosamente el sedimento a uno o más tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugan a 1.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se descarta y se resuspende en igual volumen de buffer acetoacético, pH 4.5. Si el sedimento es menor de 2 mL, se debe adicionar buffer llevándolo a 4 mL. Adicionar 2 volúmenes de acetato de etilo o éter (por ejemplo, por 1 volumen de buffer agregar 2 de solvente: 2 mL = 4 mL) y mezclar en un vórtex (o manualmente). Centrifugar a 1000 g por 15 minutos. Registrar el volumen del sedimento que contiene los huevos, y descartar el sobrenadante con un movimiento suave. Resuspender en 5 volúmenes de solución de Sulfato de Zinc. Registrar el volumen del producto final (X mL). Mezclar con vortex. Por último, tomar una alícuota y transferir a una cámara de McMaster. Dejar reposar mínimo 5 minutos antes de examinarla; los huevos que estén presentes flotarán en la superficie. Examinar la cámara de McMaster bajo los objetivos de 10x y 40x, y contar todos los huevos que estén en los dos compartimientos de la cámara. Calcular el número de huevos por litro mediante la ecuación:

$$N = AX/PV$$

N = número de huevos por litro de la muestra de agua (3 o 5 litros, dependiendo del sistema de tratamiento).

A = número de huevos contados en el portaobjetos de McMaster o promedio del recuento en dos o tres portaobjetos

X = volumen del producto final (mL)

P = volumen del portaobjetos de McMaster (0,3 mL)

V = volumen de la muestra original (para este caso, 3 o 5 litros, dependiendo del sistema de tratamiento).

Nota: si se usa un portaobjetos de McMaster de una sola cámara, P = 0,15 mL.

4.4.1 Diagnóstico de huevos de helmintos en los efluentes producidos por un SBR y un sistema FAFD

Se realizó inicialmente un diagnóstico que determinó la presencia/ausencia de huevos de *Ascaris* spp. para cada sistema. La detección de huevos de este género se realizó por el método de Bailenger modificado. Este diagnóstico fue necesario, ya que fueron empleadas aguas residuales y lodos activados (provenientes de la PTAR del municipio de Funza (Cundinamarca), en la estandarización y estabilización de cada uno de los dos sistemas de tratamientos.

- Diagnóstico de huevos de *Ascaris* spp. en Reactor Discontinuo Secuencial (SBR).

Para el diagnóstico del SBR, inicialmente se tuvo en cuenta el volumen de agua residual sintética (Tabla 4.4) tratada por el sistema. El SBR trata un volumen de 3L de agua en un ciclo de 6 horas. El análisis para la detección se enfocó puntualmente en los 3L del agua resultante al tratamiento (efluente).

Tabla 4.4. Composición del agua residual sintética

Compuesto	Formula química	Cantidad (mg/L)
Acetato de sodio	CH ₃ COONa *3H ₂ O	862
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	142,5
Fosfato Monobásico de Potasio	KH ₂ PO ₄	97,5
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	45
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	200
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	30
Cloruro férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1

Cloruro de zinc	ZnCl ₂	0,01
Cloruro de aluminio	AlCl ₃	0,004
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,004

Una vez colectada la muestra, se midieron los valores de pH, turbidez y oxígeno disuelto del efluente, con un equipo Multiparámetro HQ40d y un Turbidímetro HACH 2100Q. Los 3 litros, fueron colectados en un balde plástico, el cual fue previamente desinfectado y enjuagado con Solución Tween 80. Se procedió a evaluar la presencia de huevos con el método Bailenger.

Figura 4.4. Diseño y esquema del SBR. Adaptado de Duarte (2022)



- Diagnóstico de huevos de *Ascaris* spp. en un Sistema de Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (FAFD).

Para el diagnóstico de remoción de huevos, inicialmente se tuvo en cuenta el volumen de agua residual sintética tratada por el sistema de Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (Tabla 4.5). En este sistema, se trata un volumen de 15.68 L de agua residual sintética en un periodo de 24 horas, el cual fue calculado utilizando como trazador la rodamina. Partiendo de este valor, se estableció que el sistema realiza un tratamiento de 5L de agua residual sintética, en un periodo de tiempo de 7 horas: 40 minutos. A razón de esto, se implementó el diagnóstico inicial en un volumen de 5L, para determinar la presencia/ausencia de huevos de *Ascaris* spp. en el filtro anaerobio de flujo descendente. En la figura 4.5, se aprecia el diseño del FAFD.

Tabla 4.5. Composición del agua residual sintética.

Compuesto	Cantidad (mg/L)
Glucosa	3900
Glicerol	200
Cloruro de amonio	720
Cloruro de sodio	100
Dihidrogeno de fosfato de potasio	60
Cloruro de calcio	48
Sulfato de magnesio hidratado	15

Figura 4.5. Diseño del Sistema del Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (FAFD).



Al igual que en el SBR, en el FAFD, el efluente fue colectado en un balde plástico, previamente desinfectado y enjuagado con Solución Tween 80, en el que se desarrolló el método de Bailenger Modificado.

4.4.2 Enriquecimiento de Agua Residual Sintética con Huevos de *A. suum*.

- Suspensión Purificada de huevos de *Ascaris suum*:

La suspensión purificada de huevos de *Ascaris suum*, se obtuvo previamente de hembras adultas capturadas en el intestino delgado de porcinos, siguiendo el protocolo descrito por Jensen y colaboradores (2009)

- Recuento de la Suspensión Purificada de huevos de *Ascaris suum*:

Se realizó el conteo del número de huevos presentes en 10 alícuotas de la suspensión purificada (cada una de 10 μ L) en una cámara Neubauer.

Se efectuó la sumatoria de los huevos contados por cada alícuota, y se dividió por el número de cuadrantes revisados. Lo anterior contribuyó a preparar 6 viales con un valor estimado de 500 huevos, para posteriormente emplearlos en la inoculación de las réplicas de aguas residuales sintéticas a implementar en cada ensayo de remoción de huevos de helmintos para los sistemas de tratamientos.

El valor promedio en cada alícuota se obtuvo como el resultado del número total de huevos por 0.1 mm^3 (volumen obtenido de multiplicar el área de 1 mm^2 x 0.1 mm de profundidad de la cámara) (IDRC-IMTA, 2004). El número de huevos por mL se obtuvo entonces, al multiplicar el valor promedio obtenido de cada alícuota por 10.000. Antes de cada conteo, la suspensión fue agitada durante dos minutos en vortex para su homogenización (IDRC-IMTA, 2004; Ortiz, 2017). Una vez obtenidos los datos del número de huevos por mL en cada alícuota, se procedió a calcular el promedio general de huevos para las 10 alícuotas evaluadas (22500 huevos/mL; 22,5 huevos/ μ L) Con este resultado, se obtuvo el volumen de la suspensión purificada a utilizar en la inoculación de las aguas residuales sintéticas; el cual fue de 22.2 μ L, con un valor estimado de 500 huevos.

- Contaminación artificial de las aguas residuales sintéticas

Los 6 viales preparados con la suspensión purificada de huevos de *A. suum*, se utilizaron para inocular cada una de las réplicas a analizar en cada biorreactor.

Para el caso del SBR, cada una de las tres réplicas fue de 3L. Dicho volumen ingresó al tanque de almacenamiento, y fue inoculado con los 500 huevos de *Ascaris suum*. En el momento en que el biorreactor finalizó cada etapa de llenado, se procedió a recolectar el efluente y realizar el análisis de remoción pertinente. Se enjuagó el tanque de almacenamiento con abundante agua de grifo, entre cada una de las réplicas.

Para el FAFD, se utilizó un volumen de 5L para cada una de las tres réplicas; cada volumen se dispuso en el tanque de almacenamiento, donde posteriormente se realizó la inoculación de este con la suspensión purificada de huevos. Una vez los 5L inoculados ingresaron al interior del sistema, se procedió a recolectar el efluente y realizar el análisis

de remoción pertinente. Se enjuagó el tanque de almacenamiento con abundante agua de grifo, entre cada una de las réplicas.

4.4.3 Remoción de Huevos de *A. suum* en un SBR, y un sistema FAFD.

- Reactor Discontinuo Secuencial (SBR):

Cada réplica de 3L de agua residual sintética enriquecida con los huevos, fue tratada por el Reactor Discontinuo Secuencial (SBR) en un ciclo de 6 horas. Una vez finalizado el ciclo de tratamiento, cada réplica fue colectada en un balde plástico, previamente desinfectado con Hipoclorito de Sodio, lavado con jabón líquido y enjuagado con Solución Tween 80, con el fin de evaluar la presencia de los huevos.

- Sistema de filtro anaerobio de flujo descendente (FAFD):

Cada réplica de 5L de agua residual sintética enriquecida con los Huevos de *A. suum*, fue tratada por el sistema FAFD en un periodo de tiempo de 7 horas: 40 minutos. Una vez finalizado el tratamiento, se evaluó la presencia de los huevos para cada una de las réplicas por medio del método de Bailenger modificado. Cada replica se colecto en balde plástico, previamente desinfectados.

- ✓ Recuento del número de huevos de *A. suum* por volumen de cada muestra (L) (Método de Bailenger Modificado).

Una vez colectada cada réplica, se le empleó el método de sedimentación de Bailenger (descrito anteriormente), con el fin de calcular el número de huevos, en los efluentes tratados tanto por el SBR, como por el Sistema FAFD.

- ✓ Porcentaje de recuperación de huevos de *A. suum*:

Para cada réplica de cada sistema de tratamiento, se realizó el análisis microscópico de todo el volumen del sedimento suspendido con solución de sulfato de zinc resultante del método de Bailenger, dicha observación se llevó a cabo en el portaobjetos McMaster.

Una vez realizado el conteo de huevos, se calculó el porcentaje de recuperación para cada réplica; lo cual se logró comparando el número de huevos recuperados en el sedimento, y el número de formas parasitarias utilizadas en la contaminación artificial (estimado de 500 huevos), siguiendo la ecuación:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{N^{\circ} \text{ promedio de huevos recuperados en cada réplica}}{N^{\circ} \text{ de parásitos utilizados en la contaminación en cada réplica}} \times 100$$

4.4.4 Análisis posterior a los ensayos piloto de remoción de huevos de *A. suum* en los dos sistemas de tratamientos.

Una vez realizado el ensayo piloto de remoción de huevos de *Ascaris suum* para ambos sistemas de tratamientos, se extendió la detección de huevos en 7 réplicas de agua tratada en cada biorreactor con el fin de evaluar si continuaban saliendo los huevos o habían sido removidos en el sistema. Para el caso del SBR, cada réplica siguiente, contó con un volumen de 9 L, colectados cada 18 horas (3 ciclos de tratamiento). El volumen de agua residual sintética evaluada se aumentó el triple, con la finalidad de facilitar la colecta de los efluentes a analizar. Este procedimiento permitió establecer la presencia/ausencia de huevos de *A. suum* en los efluentes posteriores al ensayo piloto. Para el caso del FAFD, las siguientes 7 réplicas, se trabajaron con un volumen de 10 L, colectados cada 15 horas y 20 minutos, al igual que en el SBR, esto facilitó la recolección de los efluentes. Antes de cada análisis, se tuvieron presentes los valores de pH y turbidez del agua.

4.5 Análisis de resultados

Se construyeron dos bases de datos en el programa Microsoft Excel®. Se utilizó estadística descriptiva y la prueba de chi-cuadrado. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en los programas Microsoft Excel® y R-studio.

5.Resultados

5.1 Determinación de protozoarios e identificación de *Giardia spp*, *Toxoplasma gondii*, y *Cryptosporidium spp.* presentes en aguas de riego.

Tabla 5.1. Resultados obtenidos en la detección molecular de *Giardia spp.* en muestras de gua provenientes del antiguo distrito La Ramada.

Sitio de Muestreo	Prevalencia de <i>Giardia spp.</i> en el Antiguo distrito La Ramada (n=96)		
	N° de muestra colectada por sitio	Muestras positivas	Prevalencia
1*	16	2	2,08%
2*	16	0	-
3*	16	1	1,04%
4**	16	0	-
5**	16	1	1,04%
6**	16	6	6,25%
TOTAL	96	10	10,41%

*Zona agrícola, Antiguo Distrito La Ramada

**Zona Urbana-Industrial, Antiguo Distrito La Ramada

Como se observa en la tabla 5.1, de las 96 muestras de agua para riego provenientes del antiguo distrito de La Ramada analizadas en este estudio, el 10,41% (10/96), fueron positivas para la presencia de *Giardia spp* por qPCR. Con respecto al total de las muestras evaluadas (n=96), el punto 6 presentó una prevalencia del 6,25% (6/96), seguido por el punto 1 con un 2,08% (2/96), y los puntos 5 y 3 con un 1,04% (1/96). De acuerdo con la ubicación geográfica, se evidencia que la zona Urbana-Industrial (puntos 5 y 6), presentó una mayor contaminación por este parásito (7,29% (7/96)), mientras que la zona agrícola (puntos 1 y 3) mostró un 3,12% (3/96) de prevalencia. En el anexo 9, se evidencian los resultados analizados por qPCR, para cada una de las 96 muestras de aguas analizadas.

Tabla 5.2. Resultados obtenidos en la detección molecular de *Giardia* spp. por sitio de muestreo y temporada de colecta (Lluvia y Seca).

Sitio de Muestreo	Temporada Lluvia (junio, octubre, noviembre) n=36			Temporada Seca (julio, agosto, septiembre) n=60		
	Mues. col. por sitio	Muestras positivas	Prevalencia	Mues. col. por sitio	Muestras positivas	Prevalencia
1*	6	2	5,55%	10	0	-
2*	6	0	-	10	0	-
3*	6	1	2,77%	10	0	-
4**	6	0	-	10	0	-
5**	6	0	-	10	1	1,66%
6**	6	4	11,11%	10	2	3,33%
TOTAL	36	7	19,44%	60	3	5%

Mues. col. por sitio (Muestras colectadas por sitio)

*Zona agrícola, Antiguo Distrito La Ramada

**Zona Urbana-Industrial, Antiguo Distrito La Ramada

Como se indica en la tabla 5.2, de acuerdo con la temporada de colecta, el 19,44% (7/36) de muestras fueron positivas para *Giardia* spp., durante la temporada de lluvias, mientras que el 5% (3/60) lo fue durante la temporada seca (Tabla 5.2).

Para el caso de la detección de *Cryptosporidium* spp., y *Toxoplasma gondii* en las muestras de agua, desafortunadamente por temas de tiempo e inconvenientes presentados durante la pandemia actual ocasionada por el SARS-CoV-2, no se logró poner a punto los protocolos establecidos. A pesar de usar la metodología referenciada por Burnet *et al*,(2013) y anteriormente haber sido puesta en marcha en la tesis de maestría titulada: “Detección y caracterización molecular de los parásitos de interés en salud pública: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del Departamento de Nariño (Colombia)” llevada a cabo en el laboratorio de parasitología de la Universidad nacional de Colombia por la profesional Claudia Sánchez, no se lograron obtener resultados satisfactorios en diferentes experimentos realizados, bajo las mismas condiciones anteriormente expuestas en la metodología. En dichos ensayos, a pesar de usar controles positivos de *Cryptosporidium*, las pruebas evidenciaron la ausencia de

material genético del protozooario, al no apreciarse valores de Ct en las reacciones realizadas: ADN puro, diluciones: 1/5 (1:4) y 1/10 (1:9). No se detectó señal fluorescente que cruzara el umbral de ciclos (Anexos 11 y 12). Al igual que en lo anteriormente reportado, los resultados obtenidos en varios ensayos de qPCR para muestras de materia fecal positivas a *Cryptosporidium* spp. (concentración de ADN: 7.3ng/uL), demostraron datos negativos para la amplificación del material genético. En los anexos 11 y 12, se muestran los resultados de la qPCR, y la ausencia de señal fluorescente en las reacciones realizadas. Los resultados obtenidos en el análisis por electroforesis para *Cryptosporidium* spp. en ambos ensayos, demostraron la ausencia de bandas en el gel de agarosa. Esto corroboró la no amplificación de material genético para este parásito en la muestra de materia fecal (Anexo 13).

Para el caso de *Toxoplasma gondii*, tampoco se logró la detección de señal fluorescente para ninguna de las reacciones realizadas utilizando el control positivo (ADN extraído de una muestra de materia fecal positiva con ooquistes del parásito). No se apreciaron valores de Ct en las reacciones realizadas: ADN puro, diluciones: 1/4 (1:3) y 1/8 (1:7). A pesar de seguir las condiciones experimentales referenciadas en el protocolo de Temesgen *et al.*, (2019) y Ortiz *et al.*, (2020) previamente usados en la detección de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras ambientales.

5.1.1 Correlación de los resultados de la detección de *Giardia* spp., mediante qPCR con algunas variables fisico-químicas y microbiológicas consideradas en el estudio

A partir del análisis de chi cuadrado realizado con la información obtenida sobre variables fisico-químicas y microbiológicas analizadas y evaluadas en las 96 muestras de aguas en las tesis de Carlos Sánchez, titulada: “Evaluación de la toxicidad en sedimentos de los canales del Distrito de Riego de La Ramada mediante la utilización de dos bioensayos” y Alejandra Oviedo, titulada: “Identificación de bacterias resistentes a betalactámicos en aguas para riego agrícola en La Ramada, Cundinamarca”, las cuales hacen parte del macroproyecto titulado: “Identificación de contaminantes emergentes y microbiológicos, análisis metagenómico bacteriano y perfil de resistencia a antibióticos en aguas de riego y hortalizas de la Sabana occidental de Cundinamarca” del 2018; se logró considerar estas variables vs. los resultados positivos para la presencia de *Giardia* spp. obtenidos en este

trabajo, se determinó que existen asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de *Giardia* spp. en las muestras de agua evaluadas y los datos de Coliformes totales (NMP/100mL) (0.001); *E. coli* (NMP/100mL) (0.000) y EC (μ S/cm) (0.022). Para las variables pH, Temperatura, DQO, OD, DBO5 se determinó que no existen interacciones estadísticamente significativas que muestren una asociación con la presencia de *Giardia* spp. (anexo 10)

5.2 Evaluación de la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas.

La detección de parásitos en hortalizas cultivadas en la zona de La Ramada evidenció que el 49,16% (59/120) de las muestras (lechuga y apio), fueron positivas con al menos un huevo de helminto u (oo)quiste de protozoario. En la tabla 5.3, se discriminan las prevalencias de helmintos y protozoarios detectados en las 120 muestras de hortalizas evaluadas en este estudio.

Tabla 5.3. Número y prevalencia de muestras positivas por cada parásito detectado en las hortalizas evaluadas

Parásitos	Antiguo Distrito La Ramada (n=120)				
	M. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	
Huevos de Helmintos/30g	<i>Ascaris</i> spp.	33	(27,50%)	0,433	0-8
	Ancylostomideos	11	(9,16%)	0,142	0-4
	<i>Hymenolepis</i> spp.	2	(1,66%)	0,017	0-1
	<i>Trichuris</i> spp.	2	(1,66%)	0,017	0-1
	<i>Capillaria</i> spp.	1	(0,83%)	0,008	0-1
(oo)quistes Protozoarios/30g	<i>Entamoeba</i> spp.	18	(15%)	0,458	0-17
	<i>Giardia</i> spp.	9	(7,50%)	0,125	0-3
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	4	(3,33%)	0,058	0-3
	<i>Endolimax</i> spp.	1	(0,83%)	0,008	0-1

M. Pos. (Muestras positivas); Prev. (prevalencia); \bar{X} (valor promedio de huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos en 30g de material vegetal analizado); Min-Max (Valores mínimos y máximos de los parásitos detectados en hortalizas)

De los parásitos detectados en este estudio, *Ascaris* spp. fue el más prevalente con un 27,50%, seguido por *Entamoeba* spp con un 15%, Ancylostomideos con un 9,16 y *Giardia* spp con un 7,50%. Los datos demostraron que el 33,33% (40/120) de las hortalizas, fueron positivas con algún huevo de helminto, siendo *Ascaris* spp. con un promedio de 0.43 huevos/30g de muestra analizada, seguido por Ancylostomideos, *Hymenolepis* spp., *Trichuris* spp. y *Capillaria* spp.

El 23,33% (28/120) de las hortalizas, fueron positivas con algún (oo)quiste de protozoario, siendo *Entamoeba* spp. el protozoario más representativo, con un promedio de 0.45 quistes/30 g, seguido por *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., y *Endolimax* spp.

Con respecto al lugar de muestreo, *Entamoeba* spp se detectó en los tres puntos: Tabaco (punto 1), Marengo (punto 2) y Villa Cetty (punto 3), llamando la atención una muestra de lechuga en la que se encontraron 17 quistes, proveniente del punto 3 (zona urbana). De acuerdo al número de muestras evaluadas, el punto 1 (n=93) demostró las mayores prevalencias para los dos grupos de parásitos; los helmintos estuvieron presentes en el 38,70% (36/93) de las muestras y los protozoarios en el 22,58% (22/93). Este punto, tuvo la mayor diversidad de parásitos; predominando *Ascaris* spp., seguido de *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., y Ancylostomideos.

El sitio 2 reportó una prevalencia de helmintos del 19,04% (4/21), punto en el cual, solo se detectó la presencia de huevos de Ancylostomideos. Para los protozoarios, se registró una prevalencia del 38,09% (8/21), siendo *Entamoeba* spp. el de mayor positividad 19,04% (4/21), seguido de *Giardia* spp. En el punto 3, no se evidenciaron huevos de helmintos, sin embargo, fue observado un 33,33% (2/6) de prevalencia para *Entamoeba* spp. en las hortalizas colectadas en este sitio.

Los datos reportaron además que el 7.5% (9/120) de los vegetales evaluados, estaban contaminadas simultáneamente con algún huevo de helmintos y (oo)quistes de protozoarios. El 5,83% (7/120) de estas muestras se colectaron en el punto 1; la muestra con mayor diversidad de parásitos presentó 4 huevos de Ancylostomideos, 1 huevo de *Capillaria* spp. y 3 ooquistes de *Cryptosporidium* spp. El 1,66% (2/120) restante, fueron muestras colectadas en el punto 2. Las dos muestras evidenciaron la presencia de huevos de Ancylostomideos y quistes de *Entamoeba* spp. El punto 3 (Villa Cetty), no reportó muestras con presencia de huevos de helmintos. En el Anexo 16 se evidencia parte del registro fotográfico de los parásitos detectados.

Tabla 5.4. Prevalencia de parásitos detectados en tres sitios de muestreo del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.

parásitos	Tabaco (n=93)				Marengo (n=21)				Villa Cetty (n=6)				
	M. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	M. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	M. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	
Huevos de Helmintos/30g	<i>Ascaris</i> spp.	33	(35,4%)	0,55	0-8	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-
	<i>Ancylostomideos</i>	7	(7,57%)	0,11	0-4	4	(19,0%)	0,28	0-3	0	(0%)	-	-
	<i>Hymenolepis</i> spp.	2	(2,15%)	0,02	0-1	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-
	<i>Trichuris</i> spp.	2	(2,15%)	0,02	0-1	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-
	<i>Capillaria</i> spp.	1	(1,07%)	0,01	0-1	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-
(oo)quistes Protozoarios/30g	<i>Entamoeba</i> spp.	12	(12,9%)	0,27	0-6	4	(19,0%)	0,28	0-3	2	(33,3%)	3,83	0-17
	<i>Giardia</i> spp.	7	(7,52%)	0,13	0-3	2	(9,52%)	0,09	0-1	0	(0%)	-	-
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	4	(4,30%)	0,07	0-3	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-
	<i>Endolimax</i> spp.	1	(1,07%)	0,01	0-1	0	(0%)	-	-	0	(0%)	-	-

M. Pos. (Muestras positivas); Prev. (prevalencia); \bar{X} (valor promedio de huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos en 30g de material vegetal analizado); Min-Max (Valores mínimos y máximos de los parásitos detectados en hortalizas)

Tabla 5.5. Prevalencia de parásitos detectados en lechuga y apio, provenientes del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.

Parásitos	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>). n=108				Apio (<i>Apium graveolens</i>). n=12				
	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	
Huevos de Helmintos/30g	<i>Ascaris</i> spp.	33	(30,55%)	0,481	0-8	0	(0%)	-	-
	<i>Ancylostomidaeos</i>	11	(10,18%)	0,157	0-4	0	(0%)	-	-
	<i>Hymenolepis</i> spp.	2	(1,85%)	0,018	0-1	0	(0%)	-	-
	<i>Trichuris</i> spp.	2	(1,85%)	0,018	0-1	0	(0%)	-	-
	<i>Capillaria</i> spp.	1	(0,92%)	0,009	0-1	0	(0%)	-	-
(oo)quistes Protozoarios /30g	<i>Entamoeba</i> spp.	12	(11,11%)	0,425	0-17	6	(50%)	0,75	0-3
	<i>Giardia</i> spp.	8	(7,4%)	0,12	0-3	1	(8,33%)	0,166	0-2
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	4	(3,7%)	0,064	0-3	0	(0%)	-	-
	<i>Endolimax</i> spp.	1	(0,92%)	0,009	0-1	0	(0%)	-	-

Prev. (Prevalencia); \bar{X} (valor promedio de huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos en 30g de material vegetal analizado); Min-Max (Valores mínimos y máximos de los parásitos detectados en hortalizas)

De acuerdo con el tipo de hortaliza examinado, se constató que el 37,03% (40/108) de las lechugas, fueron positivas con algún huevo de helminto; siendo *Ascaris* spp. el más prevalente con un 30,55% (33/108). El 19,44% (21/108) fue positivo con algún (oo)quiste de protozoario; siendo *Entamoeba* spp., el más común con un 11,11% (12/108). Para el apio, se observó únicamente presencia de protozoarios, siendo *Entamoeba* spp (50%) la más prevalente, seguida de *Giardia* spp (8,33%) (tabla 5.5).

Concerniente a la temporada, en la época de lluvias se observaron tanto helmintos (16,90% (12/71)), como protozoarios (23,94% (17/71)). Para la época seca, se registró una

prevalencia del 57,14% (28/49) de helmintos, y del 22,44% (11/49) de protozoarios (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Prevalencia de parásitos detectados en hortalizas colectadas en temporada lluvia y seca, en el antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada.

Parásitos	Lluvia n=71				Seca n=49				
	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	
Huevos de Helmintos/30g	<i>Ascaris</i> spp.	10	(14,08%)	0,253	0-8	23	(46,93%)	0,693	0-3
	<i>Ancylostomidaeos</i>	2	(2,81%)	0,028	0-1	9	(18,36%)	0,306	0-4
	<i>Hymenolepis</i> spp.	1	(1,40%)	0,014	0-1	1	(2,04%)	0,020	0-1
	<i>Trichuris</i> spp.	1	(1,40%)	0,014	0-1	1	(2,04%)	0,020	0-1
	<i>Capillaria</i> spp.		(0%)	-	-	1	(2,04%)	0,020	0-1
(oo)quistes Protozoarios /30g	<i>Entamoeba</i> spp.	12	(16,90%)	0,521	0-17	6	(12,24%)	0,367	0-6
	<i>Giardia</i> spp.	5	(7,04%)	0,126	0-3	4	(8,16%)	0,122	0-2
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	(1,40%)	0,014	0-1	3	(6,12%)	0,122	0-3
	<i>Endolimax</i> spp.	0	(0%)	-	-	1	(2,04%)	0,020	0-1

Prev. (Prevalencia); \bar{X} (valor promedio de huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos en 30g de material vegetal analizado); Min-Max (Valores mínimos y máximos de los parásitos detectados en hortalizas)

Analizando los comportamientos específicos de las temporadas (seca y lluviosa) para cada una de las colectas, se logró determinar que, aunque se tomó un menor número de muestras en época seca, se observó una mayor prevalencia de helmintos en estos alimentos, siendo *Ascaris* spp. (46,93% (23/49)) el más común, con un promedio de 0,69huevos/30g. Respecto a los protozoarios los valores fueron muy similares, siendo el género *Entamoeba* spp. el más representativo.

También fueron observadas larvas de nematodos, en el 39,16% (47/120) de las muestras, con un promedio de 1,68 larvas/30g de muestra analizada (Tabla 5.7, anexo 18), siendo el punto 1, el que presentó los valores máximos de estos microorganismos.

Tabla 5.7. Prevalencia de larvas de nematodos detectadas en muestras de hortalizas.

Larvas de nematodos/30g	Tabaco (Sitio 1; n=93)				Marengo (Sitio 3; n=21)				Villa Cetty (Sitio 4; n=6)			
	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx	Muest. Pos.	Prev.	\bar{X}	Mín-Máx
		37	39,78	1,91	0-33	7	33,33	0,57	0-3	3	50	4

Prev. (Prevalencia); \bar{X} (valor promedio de huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos en 30g de material vegetal analizado); Min-Max (Valores mínimos y máximos de los parásitos detectados en hortalizas)

Por microscopía de inmunofluorescencia se reportaron 7 (5,83%) muestras positivas para *Giardia* spp. y 4 (3,33) muestras positivas para *Cryptosporidium* spp. con esta técnica; No se evidenció la presencia simultánea de estos (Anexo 17).

5.3 Ensayos piloto para la remoción de huevos de *Ascaris suum*, como indicador de calidad parasitológica en agua de riego

5.3.1 Diagnóstico de huevos de helmintos en los efluentes producidos por un SBR y un sistema FAFD

Al momento de realizar el diagnóstico de huevos de helmintos presentes en los efluentes producidos en los sistemas de tratamiento del Reactor Discontinuo Secuencial (SBR) y del Sistema de Filtro Anaerobio de Flujo Descendente, mediante el uso del método de Bailenger modificado, no se evidenció la presencia de estas estructuras en ninguno de los dos sistemas.

5.3.2 Enriquecimiento de Agua Residual Sintética con Huevos de *A. suum*.

La suspensión de *Ascaris suum* purificada, presentó un valor promedio de 22500 huevos/mL, con desviación estándar de 0,45 en las 10 alícuotas evaluadas. De acuerdo con esto se tomaron 22.2uL de dicha suspensión que contenían aproximadamente 500 huevos, para inocular las réplicas de agua residual sintética que fueron analizadas.

5.3.3 Remoción de Huevos de *A. suum* en un SBR, y un sistema FAFD.

- **SBR, Ensayo de remoción:** Recuento de huevos de *A. suum* por cada réplica de 3 Litros.

En la tabla 5.8 se evidencia el recuento de huevos de *A. suum* en cámara de McMaster para el sedimento obtenido en cada una de las tres réplicas. En este caso, no se observó la presencia de huevos de *A. suum* en el ensayo piloto del SBR.

Tabla 5.8. Detección de huevos de *Ascaris* spp. en un SBR. (Ensayo remoción)

Reactor Discontinuo Secuencial (SBR)					
Réplica	A	X (mL)	P (mL) 2 cámaras	V (L)	N=AX/PV
1	0	9	0,3	3	0
2	0	4.5	0,3	3	0
3	0	3	0.3	3	0

N = número de huevos por litro de la muestra de agua (3L); A = número de huevos contados en el portaobjetos de McMaster o promedio del recuento en dos o tres portaobjetos; X = volumen del producto final (mL); P = volumen del portaobjetos de McMaster (0,3 mL); V = volumen de la muestra original (3L).

Al no detectarse ningún huevo de *A. suum*, se logró determinar que el porcentaje de huevos recuperados para cada una de las tres réplicas fue de 0%, lo que demuestra una remoción del 100% de los huevos de *A. suum*, por parte del SBR en las réplicas evaluadas

- **Sistema FAFD, Ensayo de remoción:** Recuento del número de huevos de *A. suum* por 5 Litros, para cada una de las 3 réplicas desarrolladas.

Se observó la presencia de un huevo de *A. suum* para la tercera réplica evaluada. En la tabla 5.9 se reportó un valor de 1.66huevos/L del efluente evaluado para la réplica 3.

Tabla 5.9. Detección de huevos de *Ascaris* spp. en un Sistema de Filtro Anaerobio de Flujo Descendente (FAFD). (Ensayo remoción)

Sistema de filtro anaerobio de flujo descendente (FAFD)					
Réplica	A	X (mL)	P (mL) 2 cámaras	V (L)	N=AX/PV
1	0	2.5	0,3	5	0
2	0	2.5	0,3	5	0
3	1	2.5	0.3	5	1.66

N = número de huevos por litro de la muestra de agua (3L); A = número de huevos contados en el portaobjetos de McMaster o promedio del recuento en dos o tres portaobjetos; X = volumen del producto final (mL); P = volumen del portaobjetos de McMaster (0,3 mL); V = volumen de la muestra original (3L).

El porcentaje de recuperación evidenció valores del 0% para las réplicas 1 y 2; mientras que para la réplica 3 obtuvo un valor del 0.2%. En promedio, para las tres replicas se calculó

un porcentaje de recuperación de 0.06%. Lo que representa, un porcentaje de remoción del 99.94% en las tres réplicas de aguas residuales sintéticas tratadas por el sistema FAFD.

5.3.4 Análisis posterior a los ensayos piloto de remoción de huevos de *A. suum* en los dos sistemas de tratamientos.

- **SBR:** Recuento del número de huevos de *A. suum* por 9 Litros, para cada réplica desarrollada.

No se registró la presencia de huevos de *A. suum* para ninguna de las siete réplicas evaluadas. El SBR mostró una remoción en aguas residuales sintéticas del 100%.

- **Sistema FAFD:** Recuento del número de huevos de *A. suum* por 10 Litros, para cada réplica desarrollada.

No se registró la presencia de huevos de *A. suum* para ninguna de las siete réplicas evaluadas. El FAFD mostró una remoción en aguas residuales sintéticas del 100%.

6. Discusión

6.1 Determinación de protozoarios e identificación de *Giardia* spp *Toxoplasma gondii*, y *Cryptosporidium* spp. presentes en aguas de riego.

6.1.1 *Giardia* spp.

Para detección de los géneros *Giardia* y *Cryptosporidium* por PCR en tiempo real, se empleó el sistema Taq Man en strips de 8 pozos (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 10 uL para *Giardia* spp.; 8 uL constituidos por los primers, la sonda y la Master mix. Se utilizaron 2 uL del ADN template para *Giardia* spp. Las muestras se procesaron en un equipo Bio-RAD cfx96. En la tabla 6.1 se aprecian los volúmenes para una única reacción.

Tabla 6.1. Volumen por reacción para la detección de *Giardia* spp.

Reactivo	Concentración Stock (inicial)	unidades	Concentración final	unidades	1 reacción Volumen (µL)
Master mix	2	X	1	X	5
Primer Fw <i>Giardia</i> spp.	10	uM	1,4	uM	1,4
Primer Rv <i>Giardia</i> spp.	10	uM	1,4	uM	1,4
Sonda <i>Giardia</i> spp.	5	uM	0,14	uM	0,28
Template					2

En la siguiente tabla 6.2, se aprecia el perfil térmico utilizado para la detección de *Giardia* spp.

Tabla 6.2. Perfil térmico para la detección de *Giardia* spp. en muestras ambientales

Parámetro	UNG Incubación	Activación de la Polimerasa	PCR (40 Ciclos)	
			Desnaturalización del ADN	Anillamiento y extensión del ADN
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo (mm:ss)	02:00	10:00	00:15	01:00

De acuerdo a los resultados obtenidos en la qPCR, para la detección de *Giardia* spp, estos concuerdan con los reportes encontrados en la literatura, ya que este parásito es considerado uno de los principales microorganismos transmitidos a través de aguas y alimentos (Spanakos *et al.*, 2015). Los valores de prevalencia más elevados fueron determinados en las muestras procedentes de los puntos de colecta clasificados dentro de la zona con actividad urbana-industrial. Esto puede corresponder a que, *Giardia* spp se encuentra distribuida de manera considerable en el ambiente, llegando a afectar al hombre y a un gran número de animales, ya que su transmisión es muy exitosa a través de fuentes de agua que han sido contaminadas con heces, por vertimientos de desechos domésticos e industriales, por descargas de lixiviados, por la cercanía con granjas, zonas agrícolas, zonas de producción animal, por escorrentía, entre otras situaciones (Moreno *et al.*, 2018; Spanakos *et al.*, 2015; Bodley-Tickell *et al.*, 2002). De acuerdo con esto, se podría inferir que el hallazgo de quistes de *Giardia* spp., en las muestras de agua provenientes de La Ramada, no es una sorpresa, ya que este podría deberse a la reunión de varios factores mencionados anteriormente. En esta zona se pueden apreciar varias situaciones que ponen en riesgo la calidad de estas fuentes. Sumado a esto, es importante agregar que los quistes de estos parásitos poseen características que les permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas y que esta comprobada su resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados en los tratamientos de agua (Dumètre *et al.*, 2012).

La identificación de parásitos protozoarios transmitidos por el agua (WPP, por sus siglas en inglés: *waterborne protozoan parasites*), tiene implicaciones en salud pública. Investigaciones enfocadas a matrices ambientales, estipulan que estos microorganismos pueden encontrarse en el agua en concentraciones lo suficientemente altas para generar una infección (dosis infectiva mínima (DIM) = 10 a 25 quistes), pero no lo suficientes como para ser detectadas por métodos tradicionales (Moreno *et al.*, 2018). Por esta razón, se hace necesario el uso de técnicas más sensibles, como son las técnicas moleculares, para el diagnóstico de estos parásitos en diferentes muestras ambientales, incluidas las aguas para riego de cultivos.

En los últimos años, varios estudios han informado la detección de *Giardia* en aguas empleadas para la agricultura (Palacios 2017). Spanakos *et al.* (2015) pesquisaron plantas

de tratamiento biológico en tres regiones de Grecia, evidenciando la presencia de este microorganismo, a la vez que sugieren que la causa más probable de contaminación es por acción de la escorrentía, de heces de animales salvajes y/o domésticos (Spanakos *et al.*, 2015). Bodley-Tickell *et al.*, (2002) afirman que la presencia de rebaños de terneros, bovinos y otros mamíferos de granja aledaños a los canales de riego, pueden aumentar la probabilidad de contaminación en diferentes épocas del año.

A nivel Latinoamérica *Giardia*, *Cryptosporidium*, *T. gondii* y *C. cayetanensis* son los parásitos más frecuentemente reportados contaminando aguas y alimentos (Rosado-García *et al.*, 2017). Brasil abandera las investigaciones sobre este tópico, ya que en los últimos años se han presentado un gran número de brotes atribuidos a estos protozoos. Razzolini *et al.*, (2010), evaluaron aguas superficiales encontrado que el 41.7% de las muestras fueron positivas para *Giardia* en un rango de 0 a 3.4 quistes/L, resultados superiores a los encontrados en nuestro estudio (10,41%).

En Colombia, investigaciones realizadas por Alarcón *et al.*, (2005); Zárate Ospina, (2019) y Ortiz, (2017) han reportado la presencia de parásitos protozoarios en muestras de agua para riego. Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo (*Giardia* spp 10,41%) con los descritos en estos estudios, se observa que la presencia de *Giardia* spp. coinciden con los datos reportados por los autores en cuanto a la detección del protozoario en aguas para riego.

Los datos reportados (tabla 5.2) también evidenciaron la presencia de *Giardia* spp. en temporada de sequía, temporada en la que el antiguo distrito, mediante estaciones de bombeo abastece de agua para riego las áreas de la zona. Cubides, (2018); reportó que, en el antiguo distrito La Ramada, se ha evidenciado el vertimiento de aguas domésticas en los canales de riego, lo que estaría contribuyendo a la presencia de contaminación microbiológica en las aguas empleadas en la agricultura. El autor reportó que uno de los indicadores de la descarga de aguas residuales en los canales de riego, fue la variación de parámetros en temporada seca, específicamente en la salida de los barrios de Villa Cetty y El Lucero, donde se determinó la influencia negativa de estos barrios, al evidenciar un aumento de aproximadamente dos unidades logarítmicas de coliformes totales y *E. Coli* en el efluente colectado después de transcurrir por dicha zona urbana-industrial. Este hallazgo contribuye a dilucidar otro aspecto que estaría influenciando la presencia de *Giardia* spp. en las muestras de aguas analizadas en este estudio, que es el vertimiento de aguas residuales domésticas en los canales de riego. La carga contaminante de residuos de

origen doméstico está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal, como bacterias, virus y parásitos protozoarios (Ortiz *et al.*, 2012).

La presencia de *Giardia* spp. en las muestras de aguas, se asimila a lo reportado por el estudio llevado a cabo en Valencia España, y realizado por Moreno *et al.* (2018), donde se detectaron parásitos protozoarios, en aguas de riego. Los autores evaluaron la presencia de parásitos como *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma* spp. entre otros. En el caso de *Giardia duodenalis*, los autores indican que su detección podría deberse, al alto número de copias del locus 18S rRNA como objetivo dentro del genoma, lo que mejora la sensibilidad para su detección (Moreno *et al.* 2018; Nguyen *et al.*, 2016).

Un reciente estudio, desarrollado por Vejano *et al.*,(2021), cuyo objetivo fue evaluar la presencia de *Giardia duodenalis* del Lago Lake (Filipinas), debido al uso del recurso para la acuicultura, la recreación y como fuente de riego; logró detectar *Giardia duodenalis*, en tres estaciones del lago y siete ríos tributarios, por PCR del gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. El patógeno estuvo presente en el 37,7 % de las muestras de afluentes (n=69) y en el 16,7 % de las muestras de lagos (n=36). Estos resultados apoyan la necesidad apremiante de incluir el monitoreo de patógenos protozoarios en el Lago Lake y sus afluentes para prevenir la infección por *Giardia* spp. en humanos y animales. Los autores infieren que la presencia de este patógeno en el recurso, muy probablemente se deba a la proximidad de áreas con alta actividad antrópica, dadas las descargas de aguas residuales en estos cuerpos de agua superficiales.

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidenciaron una asociación de la presencia de *Giardia* spp. y otras variables analizadas en el recurso, como: Coliformes totales (NMP/100mL), *E. coli* ((NMP/100mL), y EC (μ S/cm). Al revisar la literatura propuesta por Cubides, (2018) y Sanchez, (2020) (estudios realizados en la zona de influencia), se logra indicar que la asociación de la presencia de *Giardia* spp. con variables microbiológicas y fisicoquímicas, estaría relacionada a la zona urbana del antiguo distrito; la cual se encuentra aledaña a los canales de riego. Lo antes mencionado, cobra relevancia al observar que el mayor reporte de muestras positivas para *Giardia* spp. en muestras de aguas se obtuvo en la zona Urbana-Industrial, misma zona donde Cubides (2018),

evidenció un vertimiento de aguas domesticas e industriales al interior de los canales del antiguo distrito la Ramada, causa probable de la contaminación del recurso con este parásito.

Diferentes autores señalan que la presencia de material genético de *Giardia* spp. en diferentes matrices ambientales como aguas superficiales, empleadas para el riego de cultivos y/o destinadas para consumo humano, podría deberse a la unión de diferentes factores, comenzando con la amplia distribución del parásito en el ambiente, al ser un protozooario cosmopolita, que no solo parasita al ser humano sino a otras especies de animales; la presencia del sector pecuario aledaño a los canales de riego de cultivos; esorrentía; y por último pero no menos importante, al vertimiento de desechos domésticos e industriales en los cuerpos de aguas superficiales.

De acuerdo con Carrascal Camacho *et al.*, (2015), la carga orgánica proveniente de descargas domestica ayuda a aumentar los valores de Coliformes totales y *E. coli* en el recurso. Las descargas domesticas e industriales sin tratamiento previo, pueden contener quistes de *Giardia* spp., al ser un protozooario intestinal excretado por las heces de su hospedero.

6.1.2 *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma gondii*

Para la puesta en marcha del protocolo de qPCR para la detección de *Giardia* spp. Se utilizó material de referencia de trofozoítos de *Giardia duodenalis* cepa WB (ATCC) a partir de cultivo. Con este material, se realizó la curva estándar a partir de las diluciones: 1/4, 1/10, 1/100 y 1/100, cada una por triplicado. Este análisis permitió determinar la eficiencia de la qPCR.

Para *Cryptosporidium* spp. las reacciones se realizaron en un volumen total de 10 uL; 7 uL constituidos por los primers, la sonda y la Master mix. Se emplearon 3 uL del ADN para este parásito. Las muestras se procesaron en un equipo Applied biosystems 7500. En la tabla 6.3 se aprecian los volúmenes para una única reacción.

Tabla 6.3. Volumen por reacción para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Reactivo	Concentración Stock (inicial)	unidades	Concentración final	unidades	1 reacción Volumen (µL)
Master mix	2	X	1	X	5

Primer Fw <i>Cryptosporidium</i> spp.	10	uM	1	uM	1,1
Primer Rv <i>Cryptosporidium</i> spp.	10	uM	1	uM	1,1
Sonda <i>Cryptosporidium</i> spp.	5	uM	0,1	uM	0,2
Templete					3

En la tabla 6.4, se aprecia el perfil térmico utilizado en el análisis para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Tabla 6.4. Perfil térmico para la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras ambientales

Parámetro	UNG Incubación	Activación de la Polimerasa	PCR (50 Ciclos)	
			Desnaturalización del ADN	Anillamiento y extensión del ADN
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo (mm:ss)	2:00	10:00	0:15	1:00

Para este parásito se realizaron dos ensayos de qPCR para la estandarización del control positivo. El primer ensayo se llevó a cabo a partir del material genético extraído de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de una muestra de materia fecal, proveniente del banco de muestras del laboratorio de parasitología de la Universidad Nacional de Colombia. La muestra contó con una concentración de DNA de 12.6ng/uL (puro), de la cual se realizaron diluciones 1/5 y 1/10 (montaje realizado por duplicado). El segundo ensayo partió del ADN extraído de un concentrado de ooquistes de este parásito, con una concentración de ADN de 7.3ng/uL, con dilución 1/4, 1/8 y 1/12 (Montajes realizados por triplicado).

Para la detección de *Toxoplasma gondii* por PCR en tiempo real, se empleó el sistema KiCqStart® en strips de 8 pozos, las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 uL; 18 uL constituidos por los primers, la sonda, la Master mix y el agua, (45 ciclos). Se utilizaron 2 uL del ADN templete para dicho parásito. En la tabla 6.5 se muestran los volúmenes de trabajo para este parásito evaluado en el estudio.

Tabla 6.5. Volumen por reacción para la detección de *Toxoplasma gondii*.

Reactivo	Concentración stock (inicial)	unidades	Concentración final	unidades	1 reacción Volumen (µL)
KiCqStart®	2	X	1	X	10
Primer Fw <i>Toxoplasma gondii</i>	10	uM	0,5	uM	1
Primer Rv <i>Toxoplasma gondii</i>	10	uM	0,5	uM	1
Sonda <i>Toxoplasma gondii</i>	5	uM	0,25	uM	0,5
Agua					5,5
Templete					2

Tabla 6.6. Perfil térmico para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras ambientales

Parámetro	Desnaturalización Inicial	PCR (45 Ciclos)	
		Desnaturalización del ADN	Anillamiento y extensión del ADN
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo (mm:ss)	03:00	00:15	00:30

Tanto las 96 muestras de aguas, como la estandarización de los controles positivos para este parásito, se procesarían en un equipo Applied Biosystems 7500. Lamentablemente, por inconvenientes en el funcionamiento del equipo termociclador, no fue posible realizar la detección molecular de *Toxoplasma gondii* en las muestras ambientales.

No obstante, se tomó la decisión de realizar un ensayo inicial de qPCR para controles positivos de *Toxoplasma gondii*, a partir del material genético extraído de una muestra coprológica en un termociclador BIO-RAD cfx 96; debido a que este equipo cfx 96 Touch, cuenta en su software, con calibración de fábrica para el fluoróforo reportero Cy5 (fluoróforo presente en la sonda para este parásito) (BIO-RAD, 2017).

Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó fluorescencia detectable, y cuando la curva de fluorescencia cruzo el umbral dando lugar a un Ct menor o igual a 38 (*Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium* spp.). Se consideró señal negativa, cuando no se

observó fluorescencia detectable, y por ende la ausencia de Ct; asimismo, se consideraron valores negativos a un Ct mayor a 38.

En cuanto a los resultados obtenidos para *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma gondii*, (Anexos 11, 12 y 14), no se logró obtener detección de señal fluorescente en la estandarización de los controles positivos para estos dos parásitos a partir de muestras de materia fecal y un concentrado de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Por lo anterior, no fue posible realizar la detección de estos por las técnicas moleculares aplicadas, en las 96 muestras de aguas colectadas en el antiguo distrito de riego La Ramada. En el desarrollo de las técnicas para la estandarización, se siguieron las instrucciones y recomendaciones de cada uno de los reactivos para el desarrollo de los ensayos, como fue el caso de la TaqMan® Universal PCR Master Mix (Technologies Corporation, 2014) y de la KiCqStart® Probe qPCR ReadyMix™, Low ROX™. Asimismo se siguieron las concentraciones de reactivos propuestas en otras investigaciones (Burnet *et al.*, 2013; (Temesgen *et al.*, 2019; Opsteegh *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2020).

La investigación desarrollada por Moreno *et al* (2018) (referenciada anteriormente), cuyo objetivo fue identificar y detectar protozoarios de interés en salud pública en muestras de aguas; logra establecer que el desempeño de la amplificación por qPCR de plantillas ricas en GC, a menudo se ve obstaculizada por la formación de estructuras secundarias como horquillas y temperaturas de fusión altas. En el presente estudio, *Cryptosporidium* spp. (%GC: 58.46) y *Toxoplasma gondii* (%GC: 55.35) no evidenciaron valores de Ct para la estandarización de sus respectivos controles positivos. Según lo reportado por Moreno *et al.* (2018), es recomendable evaluar diferentes reactivos y condiciones de qPCR para optimizar la reacción.

Como se evidenció en los análisis de electroforesis en esta investigación (Anexo 15), *Toxoplasma gondii*, aunque no reportó detección de señal fluorescente en el equipo termociclador Bio-RAD cfx96 por la técnica de qPCR; si evidenció amplificación del material genético en todas las reacciones realizadas para el ADN extraído de una muestra de materia fecal, lo que estaría indicando no solo un óptimo desempeño por parte de la extracción del material genético, realizada con el Kit MP Bio Soil, sino que además, la

posible ausencia de señal podría deberse a la compatibilidad de los reactivos con el equipo (Moreno *et al.*, 2018; Fletcher *et al.*, 2012; Bradley *et al.*, 2016).

Uno de los factores que puede afectar la precisión de los resultados de la PCR en tiempo real, podría deberse a una incompatibilidad entre reactivos y termociclador; para el caso de la KiCqStart® Probe qPCR ReadyMix™, Low ROX™, se recomienda emplear el software de Applied Biosystems, ya que normaliza las señales del colorante. Esta normalización puede compensar variaciones menores en la intensidad de la señal, lo que resulta en una mejor precisión. Todos los reactivos de PCR en tiempo real de Applied Biosystems contienen colorante ROX™ (Applied Biosystems, 2008).

A pesar de lo mencionado anteriormente, no se reportó ninguna secuencia amplificada para *Cryptosporidium* spp., por lo que la detección por qPCR fue negativa para este patógeno en las muestras evaluadas para su estandarización: materia fecal positiva con ooquistes y concentrado de ooquistes. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la baja presencia de ooquistes en la muestra de materia fecal (Payment *et al.*, 2000), o por otro lado, con el método de extracción para el material genético. Esto se podría considerar, ya que, en ninguna de las dos matrices evaluadas para su estándar, se obtuvo amplificación de la región 18S rRNA (Moreno *et al.* 2018).

De acuerdo a lo reportado por Toledo *et al.*, (2018), donde se evaluaron diferentes combinaciones de métodos de lisis de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., determinaron, que la combinación de lisis alcalina, junto con un kit comercial, resulta efectivo cuando se utiliza materia fecal como punto de partida. Los autores concluyen que un protocolo optimizado logra mejorar la sensibilidad del diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp. notablemente, lo cual posibilitaría la detección del parásito en muestras con bajo número de ooquistes. Dado esta información, se podrían evaluar aspectos a considerar, para la extracción de ADN de *Cryptosporidium* spp. utilizando el Kit MP Bio Soil, tanto en muestras para su estandarización como en las 96 muestras de aguas colectadas en La Ramada.

6.2 Evaluación de la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas.

La evaluación en la detección de parásitos en muestras de hortalizas irrigadas con aguas de La Ramada logró evidenciar que el 49,16% (59/120) de las muestras (lechuga y apio), fueron positivas con al menos un huevo de helminto u (oo)quiste de protozoario; lo que

representa información del riesgo pertinente al contacto directo o indirecto con estos patógenos. Los huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoos, son de particular interés, ya que su remoción en aguas residuales, representa uno de los principales retos en el tratamiento de este recurso (Almuktar *et al.*, 2018).

Al comparar los resultados obtenidos con los datos de otras investigaciones realizadas en diferentes regiones de Latinoamérica, se evidencian similitudes en lo reportado. Un estudio desarrollado por Cazorla *et al.*, (2009), en la ciudad de Coro (estado Falcón de Venezuela); logró evidenciar la presencia de parásitos intestinales de interés en salud pública, en 127 muestras vegetales, correspondientes a hortalizas colectadas en mercados y supermercados. Los análisis parasitológicos evidenciaron una detección global del 32,28% (41 muestras), siendo el apio, el repollo y la lechuga, las hortalizas que presentaron mayores porcentajes de contaminación parasitaria. Los parásitos intestinales con mayores prevalencias correspondieron a las especies *Ascaris* spp. (11,81%), *Cyclospora* spp. (8,66%) y *Cryptosporidium* spp. (5,51%). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, en cuanto a la presencia de *Ascaris* spp y *Cryptosporidium* spp. en las muestras evaluadas en el presente estudio. No obstante, en razón a *Ascaris* spp. se reportó una mayor prevalencia (27,50%), y una menor prevalencia para *Cryptosporidium* spp. (3,33%).

En ese mismo contexto, una investigación realizada por Morais *et al.*, (2005), desarrollada en Paraná (Brasil); evidencio en 66 muestras de hortalizas colectadas en 13 fincas, y 181 muestras en 17 mercados locales, la presencia de parásitos intestinales. De las 181 muestras analizadas en mercados locales, 114 (63,0%) se encontraron parasitadas por protozoos y helmintos intestinales. La lechuga común, la lechuga rizada y los berros fueron las hortalizas con mayor contaminación. Las formas parasitarias con mayor prevalencia fueron los huevos y larvas de Ancylostomatoideos, correspondiente al 77%. Se encontraron formas parasitarias de otras especies de helmintos como *Capillaria* spp. y *Trichostrongylus* spp (género de parásito de importancia veterinaria). En razón a los protozoarios, se detectaron (oo)quistes de *Iodamoeba* spp., *Entamoeba* spp., *Endolimax nana*, *Toxoplasma* spp., *Cystoisospora belli*, *Sarcocystis* spp., y *Eimeria* spp. (género de parásito de importancia veterinaria). Estos datos son similares a los reportados en la presente

investigación, en cuanto a algunos géneros evidenciados, como *Ancylostomideos*, *Capillaria* spp., *Entamoeba* spp. y *Endolimax* spp.

De acuerdo a estos datos, ambos autores sugieren que las hortalizas y vegetales expendidos en las ciudades podrían constituir muy posiblemente un vehículo para la diseminación de estos agentes patógenos (Cazorla *et al.*, 2009); por lo que exponen los desafíos en razón a la vigilancia epidemiológica, y en la búsqueda de buenas prácticas en la mejora de calidad de vegetales de consumo directo, como el uso de aguas que cuenten con los estándares de calidad óptimos implementadas para riego (Morais Falavigna *et al.*, 2005).

Varios autores, indican que la contaminación de hortalizas con parásitos podría deberse al uso indiscriminado de aguas residuales sin tratamiento previo en la agricultura; lo que, a su vez, se reflejaría en las altas prevalencias de dichos microorganismos en alimentos. Pérez-Cordón *et al.* (2008), discutieron con base a los resultados obtenidos en su estudio; que el uso de aguas residuales en alimentos de consumo directo aumenta la obtención de prevalencias elevadas de parásitos patógenos en hortalizas, como lechuga, chochos (legumbre), cilantro y cebolla china. Los autores evidenciaron la presencia de distintas especies de parásitos intestinales de interés médico-sanitario, tanto protozoos como helmintos; no solo en muestras de agua residuales provenientes de acequias y pozos para usos agrícolas (*Giardia lamblia*, *Blastocystis* spp., *Entamoeba coli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* spp. y *Balantidium* spp.), sino además en alimentos de consumo directo (*Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Blastocystis* spp., *Fasciola hepatica* y *Ascaris lumbricoides*) (Pérez-Cordón *et al.*, 2008). Estos reportes, podrían dilucidar que la reutilización de aguas residuales o aguas residuales diluidas con aguas superficiales en el riego de cultivos, constituyen una fuente de contaminación de estos alimentos.

Actualmente, Colombia cuenta con una serie de investigaciones que han evaluado la calidad de diferentes afluentes del territorio nacional. El Ministerio de Ambiente logró reportar en el 2012, a partir de un estudio realizado en la cuenca alta del río Bogotá, la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el afluente del río. La concentración de dicho microorganismo de origen fecal, constituye un riesgo sanitario al que está expuesta la población por el consumo directo e indirecto tanto del recurso, como de los alimentos producidos a partir del mismo (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2012). Este reporte es de gran interés, ya que de acuerdo con lo obtenido con base a la presencia de

Cryptosporidium spp. en hortalizas, podría justificar, que el uso de estas aguas estaría jugando un papel fundamental en la contaminación de estos alimentos. Cuando se comparan las matrices de hortalizas con las de aguas evaluadas en el presente estudio, la presencia de *Giardia* spp. en ambos tipos de muestras (Tabla 5.1 y 5.3) corroboran y demuestran que las aguas de riego, las cuales circulan por los canales del antiguo distrito La Ramada, son una fuente de contaminación con este protozoario, para los alimentos cultivados en la zona.

Es de resaltar que el hallazgo de (oo)quistes del *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en hortalizas, expone el peligro potencial que representan estos alimentos. Diferentes autores, han reportado que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp., provenientes de animales domésticos y silvestres, pueden llegar a causar patologías en humanos, generando diferentes cuadros clínicos, principalmente en individuos inmunosuprimidos. Similar condición exhibe *Entamoeba* spp, que se detectó con mayor frecuencia en las muestras vegetales analizadas; estos hallazgos demuestran la contaminación de estos alimentos por residuos fecales. Dichos protozoarios también se han diagnosticado en lechugas por otros autores (Cazorla *et al.*, 2009; Devera *et al.*, 2006).

Una investigación desarrollada, en el territorio colombiano por Polo y colaboradores (2016), logró determinar enteroparásitos en lechuga (*Lactuca sativa*) cultivada en la zona rural del municipio de Pasto. El estudio que colectó un total de 105 muestras determinó una contaminación del 95,25 % con quistes de *Entamoeba* spp.; 71,43% con ooquistes de *Cystoisospora* spp.; y 4,76 % con ooquistes de *Eimeria* spp. Asimismo, se reportó además la presencia de helmintos. Con base a los factores asociados según la prueba de ji al cuadrado, los autores evidenciaron relación entre los parásitos detectados y variables evaluadas a partir de encuestas realizadas a la población campesina, como fue el caso de la asociación de *Entamoeba* spp. con acequias (canal que conduce agua) ($p=0,008$), caninos ($p=0,008$) y pozos sépticos ($p=0,029$); y *Cystoisospora* spp. con el compost ($p=0,0001$) y caninos ($p=0,0001$). El estudio concluyó, que en zonas de cultivo del municipio de Pasto la contaminación de lechuga con enteroparásitos puede provenir principalmente de reservorios animales domésticos, humanos, y el medio ambiente.

Los datos obtenidos en la tabla 5.5, también muestran similitudes con lo reportado por Muñoz-Sánchez *et al.* (2019), quienes evaluaron la presencia de protozoos en 10 restaurantes escolares del municipio de Armenia (capital de Quindío, Colombia), por medio de la detección de ADN de géneros y especies de protozoarios como *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp., *Giardia duodenalis*, y *Cyclospora cayetanensis*. La detección se evaluó para 213 muestras distribuidas en alimentos (lechuga, repollo, pepino, zanahoria y tomate), agua (agua hervida y agua del grifo) y superficies (superficies en contacto con alimentos, mesones y taburetes). De las 213 muestras evaluadas, 6,6% fueron positivas para *Blastocystis* spp., 3,8% para *Cryptosporidium* spp y 0,9% para *G. duodenalis*. Sumado a lo anterior, los autores analizaron 187 muestras de heces analizadas por microscopía óptica de niños que frecuentaron los restaurantes, 40 (21,4%) fueron positivas para *Blastocystis* spp. y 21 (11,2%) fueron positivas para *Giardia* spp. Los autores relacionan la alta prevalencia de estos parásitos en alimentos y muestras de materia fecal, con la falta de cumplimiento de las condiciones de sanidad tanto en los restaurantes, como en la manipulación y producción de alimentos.

Al comparar los datos con los resultados de diferentes autores, y teniendo en cuenta lo reportado en los estudios realizados en La Ramada (Cubides, 2018; Sanchez, 2020), la prevalencia de helmintos y protozoarios en las hortalizas cultivadas en la zona, estaría relacionada muy probablemente con la descarga doméstica de aguas en los canales de riego del distrito. Esto cobra relevancia al referirnos a los datos de prevalencia de parásitos en hortalizas colectadas en dos temporadas diferentes, lluvia y seca. La tabla 5.6, evidenció una mayor prevalencia de helmintos en temporada seca y prevalencias similares entre ambas temporadas para los protozoarios. Es de tener en cuenta que en temporada de lluvia se colectó un mayor número de hortalizas, aun así, se demostró prevalencias mayores o similares de parásitos intestinales en temporada seca. Esto podría verse asociado a la descarga doméstica de aguas, evidenciada en la zona urbana-industrial del distrito.

El estudio reportado por Baculima Tenesaca *et al.*, (2019), obtuvo resultados similares en cuanto a la detección de géneros de protozoarios en hortalizas en cuatro diferentes mercados en Cuenca (Ecuador). De las 144 muestras de perejil y 144 muestras de lechuga, los autores lograron determinar un 44.40% de prevalencia de parásitos en el perejil con y un 38.90% en la lechuga, siendo *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli* los parásitos con mayores prevalencias: 13.79% y 21.83% (respectivamente). A estos le continuaron

Endolimax nana (41.37%), *Balantidium* spp. (6.4%), *Giardia lamblia* (9.19%) y *Trichomona* spp. (1.65%). Los investigadores atribuyen que la presencia de parásitos intestinales en los alimentos podría deberse muy probablemente a la cadena de producción de los alimentos, ya que discuten el uso de abonado orgánico en los cultivos, irrigación con aguas servidas y las deficiencias higiénicas en la comercialización de los alimentos.

Lo reportado en la bibliografía adquiere relevancia, cuando se observan los datos publicados para el año 2015, por el Ministerio de Salud, donde se reportaron en Colombia cerca de 1.006 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, con un estimado de 5.542 afectados. Para el año 2017, se notificaron en el sistema de vigilancia en salud pública cerca de 867 registros de brotes de ETA, que involucraron alrededor de 7799 personas. Aunque dichos informes notifican de manera general todos los agentes etiológicos que pueden ocasionar ETA, la investigación bibliográfica desarrollada por Montañez et al (2020), reporta en razón a protozoarios parásitos, que en Colombia, las especies *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Cyclospora cayetanensis* y *Toxoplasma gondii*, son las más comúnmente reportadas como agentes causantes de brotes y contaminación de alimentos (Montañez et al., 2020; INS, 2018). Varios de estos microorganismos, coinciden con los obtenidos en el presente estudio, donde los géneros *Entamoeba* spp., *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. fueron los más representativos.

La lechuga es una de las verduras más comúnmente consumida en todo el mundo, su alto contenido nutricional (fibra, hierro, ácido fólico y vitamina C), y propiedades antiinflamatorias, reductoras del colesterol y antidiabéticas, posicionan este alimento, en el tercer lugar de verduras más consumidas a nivel mundial (Kim et al., 2016). Esta hortaliza, perteneciente a la familia Asteraceae, se caracteriza por el abundante follaje constituido por sus prominentes hojas; mismo, que contribuye en el mantenimiento de especies parasitarias (Cazorla et al., 2009).

De acuerdo a lo reportado por Morais y colaboradores (2005), la lechuga fue la verdura analizada más contaminada por huevos y larvas de helmintos. Según los autores, estos resultados pueden explicarse, no solo al tamaño y morfología de las hojas, sino a la

estructura compacta de la planta, lo que permite una mayor fijación de las formas parásitas (Morais *et al.*, 2005).

La adhesión de parásitos patógenos a las hojas de las hortalizas, puede depender de múltiples aspectos; como las condiciones generadas tanto en el interior, como el exterior de la superficie del alimento, producto de su área foliar. Las disposición de las hojas y tallos en el apio y la lechuga, favorecen a que la humedad se concentre en los intersticios foliares de las plantas; generando a su vez, un entorno propicio que le confiere a los parásitos, protección a la desecación y otros factores climáticos (Cisneros *et al.*, 2018). Estos hallazgos podrían dar explicación de la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en el follaje de las hortalizas evaluadas (lechuga y apio) (tabla 5.5).

Además de las ventajas que les pueden conferir estas plantas a los parásitos intestinales, es de considerar que muchos de estos microorganismos han evolucionado para sobrevivir a condiciones medioambientales extremas, tal y como es el caso de los geohelmintos del género *Ascaris* (género con mayor prevalencia en hortalizas analizadas en este trabajo). Los huevos se caracterizan por presentar una cubierta externa mamelonada pegajosa, lo que les confiere una alta adhesión a las hojas y superficies de los vegetales. Estos huevos son altamente resistentes a condiciones ambientales desfavorables, lo cual se debe a la cubierta protectora de cuatro capas que recubren el huevo, constituida de adentro hacia afuera por: una capa lipídica resistente a la desecación y a la penetración de sustancias polares; capa quitinosa mecánicamente rígida; membrana vitelina; y capa externa impermeable (Quilès *et al.*, 2006).

Dadas las características morfológicas de diferentes alimentos en pro a la presencia de parásitos intestinas, actualmente, es implementada la detección molecular de estos microorganismos de interés en salud pública, en alimentos de consumo directo. Según un estudio desarrollado por Ortiz *et al.* (2020), lograron identificar protozoos en fresas compradas en supermercados y mercados locales en 20 localidades de la ciudad de Bogotá, Colombia. En el estudio, se utilizó un enfoque de PCR cuantitativa multiplex para la detección de *Toxoplasma gondii* y *Cyclospora cayetanensis*. De las 120 muestras de fresa analizadas, el eluido de lavado de 6 muestras (5%) fue positivo para ADN de *Toxoplasma gondii* y 1 muestra (0,83%) fue positiva para ADN de *Cyclospora cayetanensis*. Los resultados señalan que las fresas vendidas en la ciudad de Bogotá podrían actuar como vehículo de transmisión de parásitos de interés en salud pública. Con lo cual, los autores resaltan la necesidad de una investigación de puntos de control en la cadena de producción

de las fresas, y la implementación de medidas rigurosas para reducir el riesgo de contaminación de este alimento. Estos datos son de gran relevancia si se tiene presente que muchas de las hortalizas que generalmente se venden en los diferentes mercados y supermercados en la ciudad de Bogotá D.C. provienen de los cultivos presentes en la sabana occidental de Cundinamarca. Municipios como Bojacá, Cajicá, Cota, Facatativá, Funza, Madrid, Mosquera, Sibaté y Soacha, se caracterizan por las condiciones climáticas y calidad de suelos, que contribuyen en la producción hortícola. Muchas de las hortalizas producidas en esta zona, son distribuidas a diferentes centrales de abastos, entre las que se destaca Corabastos (central de abasto más reconocida del país) como principal receptor de la producción de hortalizas, seguido por los hipermercados (DANE, 2002; Alcaldía Mayor de Santa Fé de Bogotá y DAMA, 2012).

Investigaciones desarrolladas en la sabana occidental de Cundinamarca, contribuyen a dilucidar que la detección de huevos de helmintos en las hortalizas analizadas en este estudio estaría relacionada a la presencia de estos microorganismos en el recurso hídrico. Campos *et al.*, (2018), determinó la presencia y la concentración de huevos de helmintos en aguas utilizadas para riego agrícola, así como en biosólidos, suelos y pasto. Los autores indicaron y resaltaron que, la presencia de estos microorganismos en las matrices evaluadas confirma un riesgo sanitario para las comunidades antrópicas, por lo tanto, es imperativo su control e inclusión en las normas sobre el uso de aguas residuales en la agricultura.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el proyecto desarrollado por Chandillo & Sánchez (2020) (proyecto enmarcado en el macroproyecto del presente estudio), logró identificar la presencia de huevos de helmintos, en las 96 muestras de aguas para riego de cultivos en La Ramada. En las muestras analizadas se detectó la presencia de huevos de *Ascaris* spp 33/96 (34,37%) y *Ancilostomideos* spp 40/96(41,66%), con promedios de 0.81 y 1.53 huevos por litro (h/L) respectivamente, seguido por *Hymenolepis* spp 11/96 (11,45 %) con un promedio de 0.24 h/L, *Trichuris* spp 5/96(5,20 %) con un promedio de 0.028 h/L, y *Capillaria* spp 2/96(2.083 %) con un promedio de 0.0083 h/L. Los resultados obtenidos por los autores demuestran que el uso de estos afluentes para actividades agrícolas contribuye a la contaminación de los cultivos presentes en la zona. Esto se evidencia en la

tabla 5.4, donde la mayoría de los géneros de huevos de helmintos reportados tanto en lechugas, como en muestras de aguas, son los mismos. Sumado a los datos de Chandillo & Sánchez (2020), las investigaciones realizadas por Sánchez, (2020) y Cubides (2018), desarrolladas en La Ramada, permiten establecer que el vertimiento de aguas domésticas en los canales de riego y la escorrentía de suelos pecuarios, donde existe presencia de porcinos, bovinos y aves; estarían influenciando la en la contaminación del agua empleada para riego agrícola, la cual a tu vez genera la contaminación de hortalizas cultivadas en el antiguo distrito la Ramada con Huevos de helmintos y (oo)quistes de protozoarios.

6.3 Ensayos piloto para la remoción de huevos de *Ascaris suum*, como indicador de calidad parasitológica en agua de riego

6.3.1 SBR

En la tabla 5.10, se aprecian los valores obtenidos en razón a la detección de huevos de *Ascaris suum*, en los efluentes sintéticos inoculados con el parásito, transcurrido cada ciclo de tratamiento del SBR. Como se evidencia, no se detectó la presencia de *A. suum* en ninguno de los efluentes tratados por el biorreactor, lo que logró representar un porcentaje de remoción del 100% de los huevos. De las 7 réplicas posteriores al ensayo piloto, analizadas para este sistema (tabla 5.12), no se evidenció la presencia de huevos.

Los reactores discontinuos secuenciales (SBR) se han caracterizado por ser implementados en el tratamiento de varios tipos de vertimientos, entre los que se encierran aguas residuales domésticas, industriales, sintéticas y demás recursos hídricos. El tratamiento de aguas residuales a partir de los sistemas SBR, ha logrado una alta remoción tanto de materia orgánica, como de nutrientes (Barrios-Hernández *et al.*, 2021). Estos sistemas han demostrado óptimos resultados en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria química, porcina, aguas residuales salinas, entre otros afluentes (Muñoz & Ramos, 2014).

El porcentaje de remoción de los huevos de *A. suum*, muy probablemente, podría deberse a la biomasa presente en el biorreactor discontinuo secuencial, la cual consiste en conglomerados microbianos que mantienen y eliminan simultáneamente materia orgánica

y nutrientes. Este consorcio bacteriano se desarrolla debido a sustancias poliméricas extracelulares que unen células individuales en gránulos (Shi & Liu, 2021). La comunidad bacteriana se encuentra conformada por microorganismos acumuladores de fosfato, bacterias oxidantes de amoníaco y bacterias oxidantes de nitrito. Otros microorganismos presentes como las bacterias filamentosas, se relacionan con la formación de los gránulos y el buen desempeño del sistema (Szabó *et al.*, 2017; Winkler *et al.*, 2013; Barrios-Hernández *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2019).

Los gránulos que componen el lodo granular deben ser entendidos como agregados y/o consorcios de origen microbiano (Gao *et al.*, 2011), los cuales utilizan la materia orgánica coloidal y disuelta, como alimento para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas, como crecimiento y reproducción, generando así productos finales como varios tipos de gases, materia inorgánica, y aumento en su biomasa (Moeller & Tomasini, 2013; Sughosh *et al.*, 2019). Estos atributos son los que le confieren su capacidad de sedimentación, estructura compacta, retención de biomasa, soporte de carga orgánica, y tolerancia a la toxicidad; (Hickey *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 2011; Bathe *et al.*, 2007). El producto de degradación de un microorganismo puede servir como sustrato para otro microorganismo, facilitando la degradación completa de los contaminantes (Rosa-Masegosa *et al.*, 2021).

Con base a lo anterior, la operación de este tipo de reactores se enfoca en el principio de llenado y vaciado; el cual cuenta con un paso de recarga, de reacción, sedimentación, decantación y espera. Estos pasos pueden programarse en razón al tipo de afluente a tratar, con el fin de lograr los estándares requeridos en el efluente (Duarte, 2022). Al finalizar cada ciclo, la sedimentación de la biomasa tiene lugar antes de ser retirado el efluente. La sedimentación juega un papel fundamental en el rendimiento del sistema. Es en este paso del ciclo de tratamiento, donde los sólidos se separan del líquido en condiciones de reposo, resultan en un sobrenadante clarificado que puede ser descargado como efluente (Muñoz & Ramos, 2014).

El ciclo de sedimentación podría jugar un papel fundamental en la remoción de los huevos de *A. suum* en las aguas residuales sintéticas. Un estudio realizado por Tapia (2008), logró evidenciar que la eliminación de parásitos patógenos ((oo)quistes de protozoarios y huevos

de helmintos) en plantas de tratamientos de aguas residuales, se debe principalmente a procesos de sedimentación, favorecidos por tiempos de retención largos y por la adhesión de los patógenos a los sólidos decantables. Con el fin de dilucidar la importancia de este proceso, el autor llevó a cabo un experimento de sedimentación en los diferentes sistemas de lagunaje; los resultados indicaron que las lagunas anaeróbicas obtuvieron una mayor efectividad en la remoción de parásitos, seguidas por la laguna facultativa y por la laguna de maduración, confirmando la efectividad de la sedimentación en la remoción de parásitos en aguas residuales (Tapia, 2008).

Hasta la fecha, la capacidad de los sistemas de tratamientos SBR para eliminar patógenos microbianos como bacterias y parásitos, ha comenzado a reportarse en los últimos años. El estudio desarrollado por Thwaites y colaboradores (2018), titulado "*Comparing the performance of aerobic granular sludge versus conventional activated sludge for microbial log removal and effluent quality: Implications for water reuse*"; comparó el rendimiento de eliminación de patógenos como *Escherichia coli*, coliformes totales, esporas de clostridios reductores de sulfito y bacteriófagos de f-RNA, en un sistema que emplea lodo granular aerobio y un sistema de lodos activados. Los resultados demostraron que el lodo granular se desempeñó tan bien como el sistema de lodos activados para la eliminación de todos los sustitutos microbianos, excepto las esporas, ya que el lodo granular eliminó de manera más efectiva dichas estructuras, probablemente debido a una mayor adherencia de las esporas a la biomasa de los gránulos (señalan los autores). Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que los sistemas que implementan lodo granular aerobio, podrían ser capaz de cumplir o superar los objetivos basados en la salud, equivalentes a los lodos activados para la eliminación de patógenos en el contexto del reciclaje de agua.

Los hallazgos reportados, junto con los resultados obtenidos en el ensayo piloto de remoción de huevos de *A. suum* en un reactor discontinuo secuencial (el cual fue del 100% de remoción), podrían explicar el porqué del 100% de remoción de huevos de helmintos en aguas residuales sintéticas en dicho sistema. Sumado a lo anterior, es de tener presente la alta adhesión de la membrana mamelonada que posee este parásito (mencionada anteriormente).

Con base al sistema de filtro anaerobio de flujo descendente, es de tener presente que son sistemas que cuentan con la presencia de una biopelícula formada y adherida en el lecho filtrante, la cual es la responsable de realizar la remoción de la materia orgánica en condiciones anaerobias. Hoy en día, esta tecnología se implementa tanto para el

tratamiento de aguas residuales domésticas como industriales. Para esto, múltiples autores recomiendan utilizar velocidades bajas en el flujo ascendente para evitar y prevenir la remoción (lavado) de la biomasa. El consorcio microbiano se encarga de que los compuestos orgánicos contenidos en el recurso a tratar, se convierten en metano y dióxido de carbono (Comisión Nacional del Agua, 2015).

6.3.2 Sistema FAFD

En la tabla 5.11, se aprecian los valores obtenidos en la detección de huevos de *Ascaris suum*, en los efluentes tratados por el sistema FAFD, transcurrido cada periodo de tratamiento. Como se evidencia en la tabla, se detectó la presencia de un huevo de *A. suum* en una de las tres réplicas de los efluentes tratadas por el biorreactor, lo que logró representar un porcentaje de remoción del 99.94% de los huevos. De las 7 réplicas posteriores al ensayo piloto, analizadas para este sistema (tabla 5.13), no se continuó evidenciando la presencia de huevos.

Los resultados obtenidos con base a la implementación del sistema FAFD, para la remoción de huevos de helmintos, se podrían deber a los atributos del filtro anaeróbico de flujo descendente, los cuales consisten en un mecanismo de contacto, en el que las aguas residuales pasan por una masa de sólidos biológicos contenidos en el interior del sistema. La biomasa puede encontrarse en formas diferentes: Biopelícula delgada, adherida a las superficies de un material comúnmente conocido como medio de soporte, o lecho filtrante; y/o como Capa de biomasa dispersa retenida en los intersticios del medio de empaque (Lemos, 2007). El sistema de biopelícula (sistema en el que se basó el filtro, evaluado en el presente estudio), se caracteriza por contener y descomponer compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales; algunos compuestos solubles contenidos en estas aguas, entran en contacto con la biomasa, difundándose a través de las superficies de la biopelícula, para posteriormente convertirse en productos intermedios y finales; específicamente metano y dióxido de carbono, por acción del consorcio microbiano (Comisión Nacional del Agua, 2015).

Los microorganismos desarrollados en el filtro se adhieren a un material de soporte fijo e inerte. La biopelícula, estará formada entre los vacíos de dicho material, el cual debe cumplir con requisitos que garanticen un buen desarrollo del consorcio microbiano, como ser estructuralmente resistente, ligero y contar con una amplia área superficial. Estas características contribuyen no solo a promover el flujo uniforme en el reactor, y mejorar el contacto entre los componentes del agua residual y la biomasa, sino que además permitirá la acumulación y adherencia de altas cantidades de estos sólidos biológicos, previniendo el lavado de los mismos (Gomez & Alvarez, 2008).

La comunidad biológica en un filtro anaerobio, se encuentra constituido principalmente por un consorcio bacteriano; del cual son distinguidas bacterias hidrolíticas (cuya finalidad es romper los enlaces complejos de lípidos, proteínas y polisacáridos como la celulosa); Bacterias fermentativas acidogénicas (caracterizadas por descomponer aminoácidos, disacáridos, monosacáridos, ácidos grasos y orgánicos, alcoholes y cetonas); Bacterias acetogénicas (las cuales degradan ácidos grasos y alcoholes para la formación de acetato, hidrogeno, y dióxido de carbono); y las bacterias metanogénicas (Cuya función es convertir el acetato en metano y CO₂) (Comisión Nacional del Agua, 2015). En Colombia, los filtros anaerobios son uno de los sistemas de tratamientos de aguas residuales, que se han venido implementado con mayor frecuencia en muchas zonas del territorio nacional. Al combinarse estos sistemas con tanques sépticos como pretratamientos, han permitido obtener eficiencias mayores en el tratamiento de estas aguas (Gomez & Alvarez, 2008).

Teniendo en cuenta los atributos de la biopelícula formada por el consorcio microbiano en las superficies del lecho filtrante, y las características de los huevos de *Ascaris suum* como lo es su cubierta externa mamelonada, que les confiere una alta adhesión a superficies, plásticas incluidas (Quilès *et al.*, 2006), es muy probable inferir que el alto porcentaje promedio de remoción (99.93% para las tres réplicas del ensayo) se debió a la retención de los huevos en el interior del sistema FAFD. Si bien los filtros anaeróbicos se pueden usar solidos biológicos presentes en aguas residuales, son más apropiados para el tratamiento posterior; lo que agrega seguridad operativa y estabilidad al sistema de tratamiento en su conjunto. El efluente de los filtros anaerobios suele estar clarificado y poseer una concentración baja de materia orgánica, lo que a su vez se reflejaría en la disminución y remoción de la concentración de microorganismos patógenos que pudieran ser

transportados con dicha materia orgánica, como los huevos de helmintos (Lemos, 2007; Gonçalves *et al.*, 2001).

En razón a lo anterior, y teniendo en cuenta el enfoque One Health, un óptimo saneamiento de aguas residuales no solamente estaría permitiendo la eliminación de compuestos químicos tóxicos, como el cromo, plomo o el zinc, y la de agentes etiológicos responsables de brotes de enfermedades, como los parásitos patógenos; sino que además estaría promoviendo el uso seguro de recursos hídricos, lo que estaría contribuyendo en la conservación de la salud de poblaciones humanas, animales y del medio ambiente. En definitiva, llevar a cabo ensayos de remoción de diferentes contaminantes (orgánicos como inorgánicos) en aguas residuales, con tecnología nueva y/o perfeccionada, ayuda a identificar métodos y procesos más eficientes, económicos y asequibles que permitan una mejora en la eliminación de cualquier potencial riesgo para la salud pública (Rosa-Masegosa *et al.*, 2021).

7 Conclusiones y recomendaciones

- ✓ La técnica de qPCR permitió llevar a cabo la detección del género de parásito protozooario *Giardia* spp. a partir de muestras de agua colectadas en el antiguo distrito La Ramada.
- ✓ Se logró evidenciar una asociación entre variables fisicoquímicas (EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)) y microbiológicas (*E. coli* (NMP/100mL) y Coliformes totales (NMP/100mL)) analizadas en las 96 muestras de aguas colectas, con las muestras positivas para la presencia de *Giardia* spp. lo que, según la literatura referenciada, podría estar influenciado por el vertimiento domestico de aguas a los canales de riego del antiguo distrito.
- ✓ Con base a los resultados obtenidos en los análisis parasitológicos (microscopía de inmunofluorescencia) y moleculares (qPCR), se logró evidenciar la presencia de *Giardia* spp. tanto en muestras de aguas, como en hortalizas cultivadas en la zona. Estos datos señalan al recurso hídrico como fuente de contaminación, para los alimentos de consumo directo, cultivados en La Ramada.
- ✓ Se evaluó la presencia de parásitos (protozoarios y helmintos) en hortalizas cultivadas en el distrito de riego La Ramada, siendo *Ascaris* spp. el parásito predominante, con un 70% de las muestras y un promedio de 0.43 huevos/30g de muestra, seguido por Ancylostomideos, *Hymenolepis* spp., *Trichuris* spp. y *Capilaria* spp. *Entamoeba* spp. fue el protozoo predominante, con un 71 % de las muestras y un promedio de 0.45 quistes/30 g de muestra, seguido por *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., y *Endolimax* spp.
- ✓ Se logró reportar la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (4 muestras) y quistes de *Giardia* spp. (7 muestras) mediante la técnica de microscopía de inmunofluorescencia.

- ✓ Los resultados reportados por las técnicas parasitológicas y moleculares permiten exponer que existe un riesgo de transmisión de parásitos para los posibles consumidores de estas hortalizas.
- ✓ A la luz de los resultados obtenidos, se evidenció que el 49% (59 muestras de 120) de las muestras de hortalizas analizadas, presentaban contaminación con al menos un huevo de helminto u (oo)quiste de protozooario. Con base a la literatura referenciada, las fuentes de contaminación de estos alimentos están relacionados al vertimiento de residuos domésticos a los canales de riego del distrito y a la escorrentía de suelos agrícolas con presencia de ganadería, avicultura y porcicultura presente en la zona.
- ✓ Los ensayos piloto de remoción de huevos de *A. suum*, para el sistema de filtro anaerobio de flujo descendente evidenciaron un porcentaje de remoción del 99.94% en las tres réplicas de aguas residuales sintéticas tratadas por el sistema FAFD.
- ✓ Con base al Reactor Discontinuo Secuencial, el ensayo de remoción de huevos de helmintos reportó para este sistema un porcentaje de remoción del 100%, en las réplicas evaluadas.

7.2 Recomendaciones

- ✓ Las investigaciones enfocadas en patógenos parasitarios que pueden ser potencialmente transmitidos por alimentos, constituyen un avance fundamental, para caracterizar no solo la diversidad de estos microorganismos de interés en salud pública, sino que permiten dirigir estrategias y políticas de control y prevención. Los datos presentados en el estudio cuentan como una herramienta que permite evaluar el impacto de los programas de inocuidad de los alimentos, e identificar aquellas áreas que requieren de una mayor atención. Por lo tanto, se recomienda evaluar las leyes vigentes con respecto a estos tópicos.
- ✓ Estandarización de la técnica qPCR para la identificación de *Cryptosporidium* spp. y *Toxoplasma gondii* en muestras de aguas para el riego de hortalizas cultivadas en el antiguo distrito la Ramada.
- ✓ Identificación de otros parásitos protozoarios y helmintos de interés en salud pública (*Entamoeba* spp., *Cyclospora* spp., Etc) en muestras de aguas utilizadas en la agricultura mediante técnicas moleculares.

- ✓ Identificar la viabilidad de huevos de helmintos detectados en hortalizas
- ✓ Los resultados obtenidos en los efluentes evaluados en ambos sistemas de tratamientos de aguas residuales evidencian efluentes que cumplen con la normatividad establecida por la Organización Mundial de la Salud, que sugiere que la cantidad de huevos de helmintos presentes en el agua que será usada para la irrigación de cultivos debe ser <1huevo/litro. Llevar a cabo ensayos de remoción de diferentes contaminantes (orgánicos como inorgánicos) en aguas residuales, con tecnología nueva y/o perfeccionada, ayuda a identificar métodos y procesos más eficientes, económicos y asequibles que permitan una mejora en la eliminación de cualquier potencial riesgo para la salud pública.
- ✓ Se recomienda desarrollar ensayos futuros, que validen dicha remoción de huevos, y ratifiquen el control y colecta de huevos de helmintos en el interior del sistema FAFD y el SBR.
- ✓ Evaluación y determinación de la presencia de huevos de *Ascaris suum* en el lodo granular aerobio de un reactor discontinuo secuencial (SBR).
- ✓ Evaluación y determinación de la presencia de huevos de *Ascaris suum* en la biopelícula formada en el interior de un sistema de filtro anaerobio de flujo descendente (FAFD).

8 Referencias bibliográficas

- Adam, E. A., Yoder, J. S., Gould, L. H., Hlavsa, M. C., Gargano, J. W., Diseases, E., Diseases, Z. I., & Ridge, O. (2016). Giardiasis outbreaks in the United States, 1971–2011. *HHS Public Access*, *144*(13), 2790–2801. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003040.Giardiasis>
- Alarcón, M. A., Beltrán, M., Cárdenas, M. L., & Campos, M. C. (2005). Presence and viability of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water and wastewater in the high basin of Bogotá river. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *25*(3), 353–365. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1360>
- Alcaldía Mayor de Santa Fé de Bogotá y el Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente–DAMA. (2012). *Plan ambiental local de santa fe*. file:///C:/Users/usuario/Downloads/PAL Santa Fe 2013-2016 (2).PDF
- Ali, M., Wang, Z., Salam, K. W., Hari, A. R., Pronk, M., Van Loosdrecht, M. C. M., & Saikaly, P. E. (2019). Importance of species sorting and immigration on the bacterial assembly of different-sized aggregates in a full-scale Aerobic granular sludge plant [Research-article]. *Environmental Science and Technology*, *53*(14), 8291–8301. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07303>
- Almuktar, S. A. A. A. N., Abed, S. N., & Scholz, M. (2018). Wetlands for wastewater treatment and subsequent recycling of treated effluent: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(24), 23595–23623. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2629-3>
- Applied Biosystems. (2008). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. *Gene Expression*, *2009*, 1–60. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guide+to+Performin+g+Relative+Quantitation+of+Gene+Expression+Using+Real-Time+Quantitative+PCR#0>
- Arias-agudelo, L. M., García-montoya, G. M., Alzate-restrepo, J. F., & Galván-díaz, A. L. (2019). Generación de un nuevo genoma de referencia del Apicomplexa *Cryptosporidium* spp. aislado de un paciente colombiano y estudio de genómica comparada frente a genomas disponibles de este género. *IATREIA*, 7–9. https://media.proquest.com/media/hms/PFT/1/2v77B?_s=jY%2BkdOP9ALsTdZaeVEwDuSML8Zc%3D
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites and Vectors*, *13*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Ayres, R., & Mara, D. (1996). Análisis de aguas residuales para su uso en agricultura. In *Manual de técnicas parasitológicas y bacteriológicas de laboratorio* (Organización mundial de la salud).
- Baculima Tenesaca, J. `Mauricio, Álvarez Serrano, M. E., & Zeas Guzmán, R. C. (2019). Parásitos en expendedores y hortalizas de los mercados públicos. Cuenca 2015. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Cuenca*, *37*(1), 21–30. <https://doi.org/10.18537/rfcm.37.01.03>

- Barrios-Hernández, M. L., Bettinelli, C., Mora-Cabrera, K., Vanegas-Camero, M. C., Garcia, H., van de Vossenberg, J., Prats, D., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M., & Hooijmans, C. M. (2021). Unravelling the removal mechanisms of bacterial and viral surrogates in aerobic granular sludge systems. *Water Research*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116992>
- Bathe, S., de Kreuk, M., McSwain, B., & Schwarzenbeck, N. (2007). Aerobic Granular Sludge. *Water Intelligence Online*, 6(0), 9781780402055–9781780402055. <https://doi.org/10.2166/9781780402055>
- BIO-RAD. (2017). *CFX Maestro software* (1.1). <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000068703.pdf>
- Bodley-Tickell, A. T., Kitchen, S. E., & Sturdee, A. P. (2002). Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. *Water Research*, 36, 1880–1886. [https://pdf.sciencedirectassets.com/271768/1-s2.0-S0043135400X01091/1-s2.0-S0043135401003980/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjELF%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJGMEQCIEzu2OkxS585m8IJ5ka6EJA%2FSFsv%2FI8PFgiRHvI8lr%2BmAiB%2FNtyJ](https://pdf.sciencedirectassets.com/271768/1-s2.0-S0043135400X01091/1-s2.0-S0043135401003980/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjELF%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJGMEQCIEzu2OkxS585m8IJ5ka6EJA%2FSFsv%2FI8PFgiRHvI8lr%2BmAiB%2FNtyJ)
- Bradley, I. M., Pinto, A. J., & Guest, J. S. (2016). Design and Evaluation of Illumina MiSeq-Compatible, 18S rRNA Gene-Specific Primers for Improved Characterization of Mixed Phototrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19), 5878–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16.Editor>
- Briñez A, K., Guarnizo G, J., & Arias V., S. (2012). Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. *Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(2), 175–182.
- Brownell, S. A., & Nelson, K. L. (2006). Inactivation of single-celled *Ascaris suum* eggs by low-pressure UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2178–2184. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2178-2184.2006>
- Burnet, J. B., Ogorzaly, L., Tissier, A., Penny, C., & Cauchie, H. M. (2013). Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1211–1222. <https://doi.org/10.1111/jam.12103>
- Burnet, Jean Baptiste, Penny, C., Ogorzaly, L., & Cauchie, H. M. (2014). Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 472, 1023–1035. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.083>
- Campos-M, M., & Campos-C, R. (2017). Applications of quartering method in soils and foods. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 7(1), 35–39. <https://doi.org/10.9790/9622-0701023539>
- Campos, M. C., Beltrán, M., Fuentes, N., & Moreno, G. (2018). Helminth eggs as parasitic indicators of fecal contamination in agricultural irrigation water, biosolids, soils and pastures. *Biomédica*, 38(1), 42. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3352>

- CAR. (2009a). Evaluación Ambiental y de Plan de Gestión Ambiental. *Adecuación Hidráulica y Recuperación Ambiental Río Bogotá, I*. http://web2.car.gov.co/recursos_user/Proyectos Especiales/RIO BOGOTA/Evaluacion Ambiental Volumen I.pdf
- CAR. (2009b). *Evaluación Ambiental Y Plan De Gestión Ambiental. Río Bogotá. III*, 1–111.
- CAR. (2011). *Producto Final – Anexo No . 24 La Ramada. 24*, 13. <https://www.car.gov.co/uploads/files/5aeb755bef54b.pdf>
- Carrascal Camacho, A. K., Salcedo Reyes, J., Rojas Higuera, N., Pedroza Rodríguez, A. M., Sánchez Garibello, A., & Matiz Villamil, A. (2015). Evaluación de tres métodos para la inactivación de coliformes y *Escherichia coli* presentes en agua residual doméstica, empleada para riego. *Universitas Scientiarum*, 15(2), 139.
- Cazorla, D., Morales, P., Chirinos, M., & Acosta, M. E. (2009). Evaluación parasitológica de hortalizas comercializadas en Coro, estado Falcón, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(1), 117–125. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482009000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- CDC. (2021, February 26). | Patógenos y medio ambiente *Giardia* | Parásitos | CDC. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>
- CDC. (2020). *CDC - Toxoplasmosis - Biology*.
- Centers for Disease Control and Prevention, C. (2021, September 24). |Patógenos y medio ambiente | *Cryptosporidium* Parásitos | CDC. Patógeno y Medio Ambiente. <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>
- Chalmers, R. M., Davies, A. P., & Tyler, K. (2019). *Cryptosporidium*. *Microbiology (United Kingdom)*, 165(5), 500–502. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000764>
- Cirelli, A. (2012). El agua: un recurso esencial Alicia. *Química Viva*, 3(81). <https://doi.org/10.48213/travessia.vi81.866>
- Cisneros, C., Mayorga, E., & Vargas, K. (2018). Parásitos intestinales en diferentes hortalizas para consumo crudo expandidas en cuatro tramos del mercado Mayoreo de la ciudad de Managua, en el periodo Septiembre-Noviembre del 2018. [Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN)]. In *Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN)* (Vol. 1, Issue 69). <https://repositorio.unan.edu.ni/12124/1/100488.pdf>
- Collender, P. A., Kirby, A. E., Addiss, D. G., Freeman, M. C., & Remais, J. V. (2015). Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media: Current Techniques and Recent Advances. In *Trends in Parasitology* (Vol. 31, Issue 12, pp. 625–639). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.007>
- Comisión Nacional del Agua. (2015). Manual de Agua Potable , Alcantarillado y Saneamiento “Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Filtros Anaerobios de Flujo Ascendente.” In *Libro 29*. https://sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/CONAGUA_2015_Manual_Filtros_anaerobios_de_flujo_ascendente.pdf
- Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. (2010). Carta ambiental. *Edición No 25*

- ISSN-0213 *Diciembre de 2010*, 7. file:///C:/Users/MASTER/Downloads/Carta Ambiental 25.pdf
- Craig, P., & Ito, A. (2007). Intestinal cestodes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(5), 524–532. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282ef579e>
- Cubides, P. (2018). Evaluación de un tratamiento para mejorar la calidad del agua utilizada para riego en la Sabana occidental de Cundinamarca. <http://bdigital.unal.edu.co/70070/2/1018404125.2018.pdf>
- DANE. (2002). Censo hortícola de la Sabana de Bogotá. 1–28.
- Departamento de Planeación Nacional - DNP. (2020). Documento CONPES 4004: Economía circular en la gestión de los servicios de agua potable y manejo de aguas residuales. *Consejo Nacional de Política Económica y Social*, 64. <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Conpes/Economicos/4004.pdf>
- Devera, R., Blanco, Y., González, H., & García, L. (2006). Parásitos intestinales en lechugas comercializadas en mercados populares y supermercados de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Soc. Venez. Microbiol*, 26(2), 100–107.
- Diarrea* - Datos de UNICEF. (2021, June). <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>
- Duarte, V. (2022). Desarrollo de un lodo granular aerobio para el tratamiento de aguas en un reactor discontinuo secuencial (SBR). Universidad Nacional de Colombia.
- Dumètre, A., Aubert, D., Puech, P. H., Hohweyer, J., Azas, N., & Villena, I. (2012). Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 905–912. <https://doi.org/10.1128/AEM.06488-11>
- Elizondo, M. J. (2019). Guía para la toma de muestras de suelo y tejidos foliares para el diagnóstico de la fertilidad. *Instituto Nacional de Innovación y Transferencia En Tecnología Agropecuaria*.
- Elmi, O. E., & Dioso, R. (II) P. (2017). Prevalence of Diarrhoeal Diseases Among Children under Five Years in East African Countries from 2012–2017. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, 34(1), 51. <https://doi.org/10.29037/ajstd.74>
- Epa, U., & of Science, O. (2014). Office of Water Method 1693: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Disinfected Wastewater by Concentration/IMS/IFA. www.epa.gov
- FAO. (2017). Reutilización del agua en la agricultura: ¿ Beneficios para todos ? Reutilización del agua en la agricultura : ¿ Beneficios para todos ?
- Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J., & Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420–449. <https://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization.

- (2014). *Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series (MRA)* 23. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/>
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M. R., & Karanis, P. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Tropica*, 125(2), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.007>
- Gao, D., Liu, L., Liang, H., & Wu, W. M. (2011). Aerobic granular sludge: Characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 137–152. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.497961>
- Gharpure, R., Perez, A., Miller, A. D., Wikswo, M. E., Silver, R., & Hlavsa, M. C. (2019). Morbidity and Mortality Weekly Report Cryptosporidiosis Outbreaks-United States, 2009-2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(25), 568–572. <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/index.html>.
- Gomez, A., & Alvarez, G. (2008). Evaluación de la eficiencia de un filtro anaerobio de grava a escala piloto, análisis comparativo con un filtro anaerobio de guadua – planta de tratamiento de aguas residuales - Universidad Pontificia Bolivariana – Bucaramanga [Universidad Pontificia Bolivariana]. In *Phys. Rev. E*. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7130/1/LUZARDO-BUIATRIA-2017.pdf>
- Guadagnini, R. A., Dos Santos, L. U., Franco, R. M. B., & Guimarães, J. R. (2013). Inactivation of bacteria and helminth in wastewater treatment plant effluent using oxidation processes. *Water Science and Technology*, 68(8), 1825–1829. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.431>
- Guillen, A., González, M., Gallego, L., Suárez, B., Heredia, H., Hernández, T., Naranjo, M., & Salazar, J. (2013). Presencia de protozoarios intestinales en agua de consumo en la comunidad 18 de Mayo. Estado Aragua-Venezuela, 2011. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(1), 29–36. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482013000100004
- Hernandez, I., Acosta-Viana, K., Guzman-Marin, E., Ortega, A., Segura, J., & Jimenez, M. (2017). Presence of *Toxoplasma gondii* in drinking water an endemic region in Southern Mexico. *Foodborne Pathogens*, 14(5). <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2224>
- Hettiarachchi, H., & Ardakanian, R. (2017). *Uso Seguro De Aguas Residuales En La Agricultura: Ejemplos De Buenas Prácticas*. https://collections.unu.edu/eserv/UNU:5957/SafeUseOfWastewaterInAgriculture_ESP.pdf
- Hickey, R., Wu, W., Veiga, M., & Jones, R. (1991). Start-Up Operation, Monitoring and Control of High-rate Anaerobic Treatment Systems (pp. 207–255). *Water Science & Technology*. <https://doi.org/10.2166/wst.1991.0226>
- Hofstra, N., Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., & Medema, G. J. (2013). Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Science of the Total Environment*, 442, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.013>
- Iannacone, J. O. (2002). Remoción de formas parasitarias intestinales en una laguna facultativa de estabilización en Lima, Perú. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19(4), 1033–

1041. <https://doi.org/10.1590/s0101-81752002000400007>
- INS. (2018). Enfermedades Transmitidas por Alimentos Colombia 2017. *Instituto Nacional de Salud*, 14. [https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/ETA SEMESTRE I 2018.pdf#search=ETA](https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/ETA_SEMESTRE_I_2018.pdf#search=ETA)
- Instituto Nacional de Salud. (2017). Vigilancia Y Análisis Del Riesgo En Salud Pública Protocolo De Vigilancia En Salud Pública Investigación De Brote Enfermedades Transmitidas Por Alimentos Y Vehiculizadas Por Agua. *Instituto Nacional de Salud*, undefined-16.
- Jenkins, M. B., Eaglesham, B. S., Anthony, L. C., Kachlany, S. C., Bowman, D. D., & Ghiorse, W. C. (2010). Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1926–1934. <https://doi.org/10.1128/AEM.02295-09>
- Jensen, P. K., Phuc, P. D., Konradsen, F., Klank, L. T., & Dalsgaard, A. (2009). Survival of *Ascaris* eggs and hygienic quality of human excreta in Vietnamese composting latrines. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-57>
- Keegan, A., Daminato, D., Saint, C. P., & Monis, P. T. (2008). Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. *Water Research*, 42(6–7), 1805–1811. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.008>
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Leal Diego, A. G., Dores Ramos, A. P., Marques Souza, D. S., Durigan, M., Greinert-Goulart, J. A., Moresco, V., Amstutz, R. C., Micoli, A. H., Romeu Cantusio Neto, Célia Regina Monte Barardi, & Franco, R. M. B. (2013). Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. *Ocean and Coastal Management*, 72(March), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.07.010>
- Martins, F. D. C., Ladeia, W. A., Toledo, R. dos S., Garcia, J. L., Navarro, I. T., & Freire, R. L. (2019). Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 28(2), 291–297. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019037>
- Matosinhos, F. C., Valenzuela, V. C., Silveira, J. A., & Rabelo, E. M. (2016). Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. *Parasitology Research*, 115(5), 1827–1834. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4922-8>
- Maya, C., Torner-Morales, F. J., Lucario, E. S., Hernández, E., & Jiménez, B. (2012). Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. *Water Research*, 46(15), 4770–4782. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.014>

- Medina Claros, A., Mellado Peña, M., García Lopez, M., Piñeiro Pérez, R., & Martín Fontelos, P. (2011). Parasitosis intestinales. *Protocolos de Infectología. Parasitosis Intestinal*, 3, 77–88. https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/parasitosis_0.pdf
- Mejia, R., Vicuña, Y., Broncano, N., Sandoval, C., Vaca, M., Chico, M., Cooper, P. J., & Nutman, T. B. (2013). A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1041–1047. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0726>
- Menocal, L., & Caraballo, Y. (2014). Importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua, según su uso. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(2), 197–209.
- Metcalf Eddy. (2003). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. In *Chemical engineering* (Issue 7, pp. 10–11).
- Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. (2012). Diagnóstico nacional de salud ambiental. <https://www.minsalud.gov.co/Sites/Rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IGUB/Diagnostico%20de%20salud%20Ambiental%20compilado.Pdf>, 368.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2021). Resolución 1256 de 2021. *Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible MADS*, 1–6. <https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/12/Resolucion-1256-de-2021.pdf>
- Ministerio de Vivienda. (2018). Plan director agua y saneamiento básico visión estratégica 2018 - 2030. *Gobierno de Colombia, Minviviend*, 1–108. <https://www.minvivienda.gov.co/sites/default/files/2020-07/plan-director.pdf>
- MINSALUD. (2015). Encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar Colombia, 2012 – 2014.
- Moeller, G., & Tomasini, A. C. (2013). Microbiología de lodos activados. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 148–208. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/5Microbiologiadelodosactivados.pdf>
- Monis, P. T., Caccio, S. M., & Thompson, R. C. A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>
- Montañez, T., Novoa, M., Sánchez, L., & Ortiz, C. (2020). Parásitos protozoarios transmitidos por alimentos ¿ Cómo estamos en colombia? Foodborne protozoan parasites : ¿ How are we in colombia? Resumen. *BIOCIENCIAS*.
- Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Seminar*, 363, 1965–1976. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622007000200009>
- Mora, L, Segura, M., Martinez, I., Figuera, L., Salazar, S., Fermín, I., & Gonzalez, B. (2009). Para si to sis in tes ti na les y fac to res hi gié ni cos sa ni ta rios aso cia dos en in di vi duos de lo ca li da des ru ra les del es ta do Su cre In tes ti nal Pa ra si tism and Asso cia ted Sa ni tary-Hygie nic Fac tors In In di vi duals of Ru ral L. 37(2), 148–156. <http://ve.scielo.org/pdf/km/v37n2/art06.pdf>

- Mora, Leonor, Martínez, I., Figuera, L., Segura, M., & Del Valle, G. (2010). Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes, estado Sucre, Venezuela. *Invest Clin.* http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332010000400003
- Morais Falavigna, L., Rodrigues De Freitas, C. B., De Melo, G. C., Nishi, L., Marques De Araújo, S., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2005). Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitologia Latinoamericana*, 60(3–4), 144–148. <https://doi.org/10.4067/s0717-77122005000200007>
- Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Pérez, R., Morillo, J. A., & Alonso, J. L. (2018). Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008>
- Moscoso, J. (2016). Manual de buenas prácticas para el uso seguro y productivo de las aguas residuales domésticas. *Ministerio de Agricultura y Riego*, 230. http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/manual_de_buenas_practicas_para_el_uso_seguro_y_productivo_de_las_aguas_residuales_domesticas.pdf
- Muñoz-Sánchez, G. D., Hernández-Arango, N., Buitrago-Lopez, E., Luna, J. C., Zamora, A., Lora-Suarez, F., & Gómez-Marín, J. E. (2019). Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia. *Journal of Food Safety*, 39(6), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfs.12714>
- Muñoz, J., & Ramos, M. (2014). Reactores discontinuos secuenciales: una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales. *Universidad Militar Nueva Granada - Ciencia E Ingeniería Neogranadina*, 5 Mayo 2014, 49–66.
- Navarro-I-Martinez, L., Del Águila, C., & Bornay-Llinares, F. J. (2011). *Cryptosporidium*: A genus in revision. the Situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.002>
- Navone, G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., & Zonta, M. L. (2011). Capítulo Phylum Nematoda. *Macroparásitos, Diversidad y Biología*, 118–146.
- Nguyen, T. T., Traub, R., Pham, P. D., Nguyen, H. V., Nguyen, K. C., Phung, C. D., & Dalsgaard, A. (2016). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam. *Food and Waterborne Parasitology*, 3, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.03.003>
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Foodborne disease outbreaks surveillance in Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29(5), 504–510. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000600004>
- OMS. (2012). Eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children. *World Health Organization, Soil-Transmitted Helminthiasis*, 186–215. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70841-1_5

- OMS. (2015). Food-Borne Disease Burden Epidemiology Reference Group. *Encyclopedia of Parasitology*, 1–1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884-1
- OMS. (2022). Convocatoria de expertos - Cuadro de Expertos de Alto Nivel para el Enfoque «Una Salud» (OHHLEP). [https://www.who.int/es/news-room/articles-detail/call-for-experts-one-health-high-level-expert-panel-\(ohhlelep\)](https://www.who.int/es/news-room/articles-detail/call-for-experts-one-health-high-level-expert-panel-(ohhlelep))
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Reutilización de aguas para agricultura en América Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/3/a-i7748s.pdf>
- Organization, W. H. (2007). The international decade for action water for life-2005-2015 *Coping with Water Scarcity World Water Day 2007*. <http://www.un.org/waterforlifedecade>
- Ortega, C. (2017). Detección y caracterización molecular de los parásitos de interés en salud pública: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayentanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del [Universidad Nacional de Colombia]. In *Universidad Nacional de Colombia*. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/64105/Tesis_de_Maestría_-_Claudia_Sánchez.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ortega, Y. (2013). Foodborn Parasites. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ortiz, C., López, M. C., & Rivas, F. A. (2012). Prevalencia de helmintos en la planta de aguas residuales del municipio El Rosal, Cundinamarca. *Revista de Salud Pública*, 14(2), 296–304. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642012000200010>
- Ortiz, C., Tefera, T., & Robertson, L. J. (2020). Multiplex quantitative PCR analysis of strawberries from Bogotá, Colombia, for contamination with three parasites. *Journal of Food Protection*, 83(10), 1679–1684. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-121>
- Ortiz, M. (2017). Detección de quistes de *Giardia lamblia* a partir de aguas residuales usando separación fluoro-inmunomagnética. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents* (Vol. 7, Issue 2). <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/45578/u827713.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ortiz, V. M., & Laura, N. (2008). Alta contaminación por enteroparásitos de hortalizas comercializadas en los mercados de la Ciudad de La Paz , Bolivia High contamination whit enteroparasites of vegetables expedited in the markets of the city La Paz , Bolivia. *Biofarbo*, 16, 1–8.
- Osorio, J. H. (2014). Identificación de helmintos en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) en el suroccidente colombiano. 13(1), 37–44.
- Palacios, T.-E. (2017). Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en terneros, y su presencia en agua y en niños con problemas digestivos en el cantón San Fernando, Ecuador. *Maskana*, 8(1), 111–119. <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.10>
- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

- Payment, P., Berte, A., Prévost, M., Ménard, B., & Barbeau, B. (2000). Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(6), 565–576. <https://doi.org/10.1139/cjm-46-6-565>
- Pérez-Cordón, G., Rosales, M., Valdez, R., Vargas-Vásquez, F., & Cordova, O. (2008). Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 144–148. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.251.1239>
- Pino, L. E., Salinas, J. E., & López, M. C. (2009). Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectio*, 13(2), 83–91. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(09\)70729-5](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(09)70729-5)
- Polo, G. A., Benavides, C. J., Astaiza, J. M., Vallejo, D. A., & Betancourt, P. (2016). Enteroparasite determination in *Lactuca sativa* from farms dedicated to its production in Pasto, Colombia. *Biomedica*, 36(4), 525. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.2914>
- Prieto-pérez, L., Pérez-tanoira, R., Cabello-úbeda, A., Petkova-saiz, E., & Górgolas-hernández-mora, M. (2016). Geohelminths. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(6), 384–389. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X16000690>
- Pública, D. A. de la F. (2015). Decreto 1076 de 2015 Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible. *Diario Oficial No. 49.523 de 26 de Mayo de 2015, EVA-Fu*, 1–920. <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=78153>
- Quilès, F., Balandier, J. Y., & Capizzi-Banas, S. (2006). In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: The shell of *Ascaris* eggs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(2), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0638-4>
- Quintero-Betancourt, W., Peele, E. R., & Rose, J. B. (2002). *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: A review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 49(3), 209–224. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00007-6)
- Ramírez, J. D., Heredia, R. D., Hernández, C., León, C. M., Moncada, L. I., Reyes, P., Pinilla, A. E., & Lopez, M. C. (2015). Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 32(March), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.015>
- Razzolini, M. T. P., Santos, T. F. D. S., & Bastos, V. K. (2010). Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. *Journal of Water and Health*, 8(2), 399–404. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.172>

- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Robertson, L. J., Utaaker, K. S., Goyal, K., & Sehgal, R. (2014). Keeping parasitology under the one health umbrella. *Trends in Parasitology*, 30(8), 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.06.002>
- Romero-Aguilar, M., Colín-Cruz, A., Sánchez-Salinas, E., & Laura Ortiz-Hernández, M. (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: evaluación de la remoción de la carga orgánica.
- Rosa-Masegosa, A., Muñoz-Palazon, B., Gonzalez-Martinez, A., Fenice, M., Gorrasi, S., & Gonzalez-Lopez, J. (2021). New advances in aerobic granular sludge technology using continuous flow reactors: Engineering and microbiological aspects. *Water (Switzerland)*, 13(13), 1–20. <https://doi.org/10.3390/w13131792>
- Rosado-García, F. M., Guerrero-Flórez, M., Karanis, G., Hinojosa, M. D. C., & Karanis, P. (2017). Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(5), 783–798. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.03.008>
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, A. (2016). *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535–547. <https://doi.org/10.1111/pim.12350>
- Ryan, Una, & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>
- Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(11), 805–814. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>
- Sanchez, C. (2020). Evaluación de la toxicidad en sedimentos de los canales del Distrito de Riego de La Ramada mediante la utilización de dos bioensayos. Universidad Nacional de Colombia.
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>
- Secretaria de ambiente. (2008). Guía conceptual sobre la PTAR Salitre. <http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/riobogota/crono.pdf>
- Shapiro, K., Mazet, J. A. K., Schriewer, A., Wuertz, S., Fritz, H., Miller, W. A., Largier, J., & Conrad, P. A. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. *Water Research*, 44(3), 893–903. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.061>
- Shi, Y., & Liu, Y. (2021). Evolution of extracellular polymeric substances (EPS) in aerobic sludge granulation: Composition, adherence and viscoelastic properties. *Chemosphere*, 262, 128033. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128033>
- Silva, J., & Torres, P. (2008). Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 347–359.

- Silva, J., Torres, P., & Madera, C. (2008). Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 347–359. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13521>
- Spanakos, G., Biba, A., Mavridou, A., & Karanis, P. (2015). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recycled waters used for irrigation and first description of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Greece. *Parasitology Research*, 114(5), 1803–1810. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4366-6>
- Stevens, D. P., Surapaneni, A., Thodupunuri, R., O'Connor, N. A., & Smith, D. (2017). Helminth log reduction values for recycling water from sewage for the protection of human and stock health. *Water Research*, 125, 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.069>
- Sughosh, P., Lakshmikanthan, P., & Sivakumar Babu, G. L. (2019). Comparative studies of small-scale aerobic and anaerobic bioreactor landfills treating mbt waste of bangalore city. In *Lecture Notes in Civil Engineering: Vol. 21 LNCE*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02707-0_2
- Szabó, E., Liébana, R., Hermansson, M., Modin, O., Persson, F., & Wilén, B. M. (2017). Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00770>
- Tapia, R. (2008). Mecanismos de eliminación de patógenos en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Universidad de León área.
- Technologies Corporation, L. (2014). TaqMan® Universal PCR Master Mix User Guide (Pub. no. 4304449 Rev. E). *Manual, 4304449*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4304449_TaqManPCRMM_UG.pdf
- Temesgen, T. T., Robertson, L. J., & Tysnes, K. R. (2019). A novel multiplex real-time PCR for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, and *Cyclospora cayentanensis* on berries. *Food Research International*, 125(August), 108636. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108636>
- Thompson, R. C. A., & Polley, L. (2014). Parasitology and One Health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), A1–A2. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.09.002>
- Thwaites, B. J., Short, M. D., Stuetz, R. M., Reeve, P. J., Alvarez Gaitan, J. P., Dinesh, N., & van den Akker, B. (2018). Comparing the performance of aerobic granular sludge versus conventional activated sludge for microbial log removal and effluent quality: Implications for water reuse. *Water Research*, 145, 442–452. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.038>
- Toledo, J., Lombardelli, J., Galarza, R., Tiranti, K., Garro, C. J., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., & Tomazic, M. L. (2018). Comparación de métodos de extracción de ADN para mejorar el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. en materia fecal de terneros. *Revista de Investigaciones Científicas de La Universidad de Morón*, 2(4), 17–

28.

- Toledo, R., Esteban, J. G., & Fried, B. (2006). Immunology and Pathology of Intestinal Trematodes in Their Definitive Hosts. *Advances in Parasitology*, 63(06), 285–365. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)63004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)63004-2)
- Torregosa, M. L., Dominguez mora, R., Jiménez Cisneros, B., & Hauffer Michel, E. (2012). *Diagnóstico del agua en las américas*.
- Triviño-Valencia, J., Lora, F., Zuluaga, J. D., & Gomez-Marin, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, 115(5), 1789–1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
- UNESCO. (2006). El agua, una responsabilidad compartida 2° Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Educación, La Ciencia y La Cultura*, 1–48. www.unesco.org/water/wwap/index_es.shtml
- Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacteria causing of foodborne diseases: An overview at Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122. <https://doi.org/10.14482/SUN.32.1.8598>
- Vargas. (2008). Tratamiento De Aguas Residuales Domésticas Con Un Biorreactor De Membrana Inmersa. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Vejano, M. R. A., dela Peña, L., & Rivera, W. L. (2021). Occurrence of *Giardia duodenalis* in selected stations and tributary rivers of Laguna Lake, Philippines. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09240-6>
- Venturini, L., Bacigalupe, D., Basso, W., Unzaga, J. M., Venturini, M. C., & Moré, G. (2006). *Cryptosporidium parvum* in domestic animals and in monkeys from a zoo. *Parasitología Latinoamericana*, 61(1–2), 90–93.
- Vidal-Anzardo, M., Yagui Moscoso, M., & Beltrán Fabian, M. (2020). Parasitosis intestinal: Helmintos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 81(1), 26–32. <https://doi.org/10.15381/anales.v81i1.17784>
- Webb, C., & Cabada, M. M. (2017). Intestinal cestodes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(5), 504–510. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000400>
- WHO. (2007). Consultation to Develop a Strategy to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. *Sustainable Development, September*, 25–27.
- WHO. (2019). Drinking-water. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- WHO, & UNEP. (2006). Safe use wastewater, excreta and greywater. VOL1 policy and regulatory aspects. *Policy And Regulatory Aspects, I*, 114.
- Winkler, M. K. H., Kleerebezem, R., De Bruin, L. M. M., Verheijen, P. J. T., Abbas, B., Habermacher, J., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2013). Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7447–7458. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4472-7>

- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
- Yaoyu, F., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
- Zárate, C. (2019). Concentración y Detección de (Oo)Quistes De *Giardia* sp. y *Cryptosporidium* spp. Provenientes de Agua Superficial [Universidad De Los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/45578/u827713.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zymo Research. (2016). ZR 50 bp DNA Marker. <https://www.zymoresearch.com/products/zr-50-bp-dna-marker>

9 Anexos



Anexo 1. Punto 1, muestreo de aguas residuales. Tabaco



Anexo 2. Punto 2, muestreo de aguas residuales. Canal Venecia.



Anexo 3. Punto 3, muestreo de aguas residuales. Marengo.



Anexo 4. Punto 4, muestreo de aguas residuales. Villa Cetty.



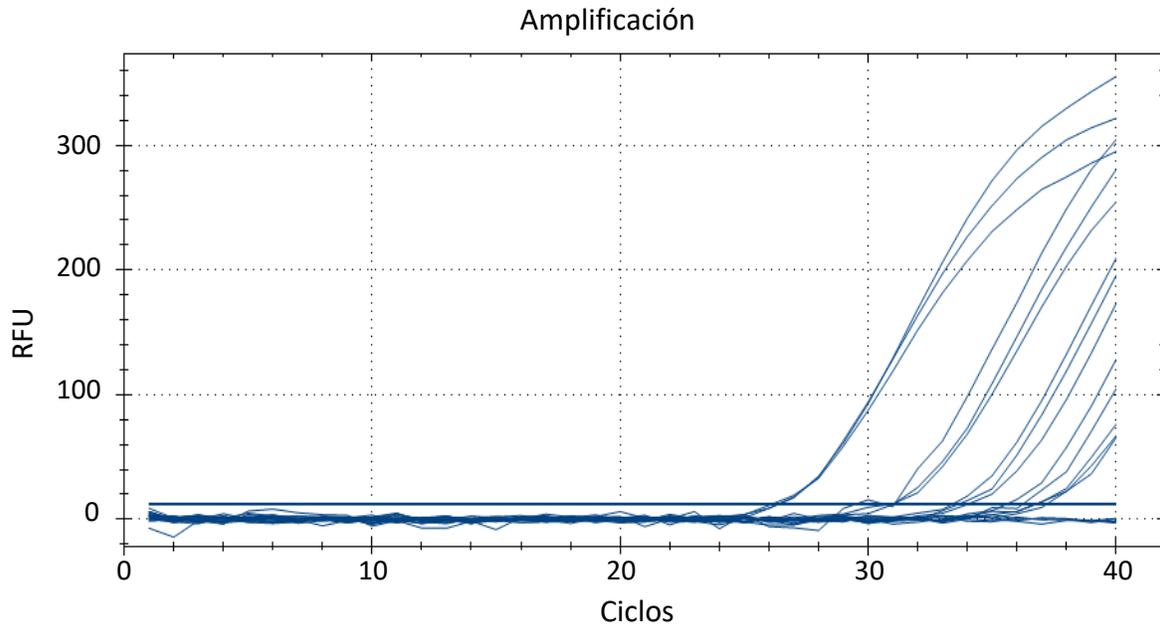
Anexo 5. Punto 5, muestreo de aguas residuales. Entrada.



Anexo 6. Punto 6, muestreo de aguas residuales. Lucero.



Anexo 7. Sitios de Muestreo de Hortalizas (Tabajo, Marengo, Villa Cetty).



Anexo 8. Curva estándar: ADN de trofozoíto de *Giardia duodenalis*

Anexo 9. Resultados obtenidos en la identificación de *Giardia spp.* en muestras de Aguas por qPCR.

Well	Fluor	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.	Interpretacion Cualitativa
A01	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A02	FAM	Unkn-01	M1		0,00	0,000	NEGATIVA
A03	FAM	Unkn-01	M1		0,00	0,000	
A04	FAM	Unkn-01	M1		0,00	0,000	
A05	FAM	Unkn-02	M2		0,00	0,000	NEGATIVA
A06	FAM	Unkn-02	M2		0,00	0,000	
A07	FAM	Unkn-02	M2		0,00	0,000	
A08	FAM	Unkn-03	M3		0,00	0,000	POSITIVA
A09	FAM	Unkn-03	M3	35,85	36,59	1,043	
A10	FAM	Unkn-03	M3	37,33	36,59	1,043	
A11	FAM	Unkn-04	M4	37,02	37,02	0,000	NEGATIVA
A12	FAM	Unkn-04	M4		0,00	0,000	
B01	FAM	Unkn-04	M4		0,00	0,000	
B02	FAM	Unkn-05	M5		0,00	0,000	NEGATIVA
B03	FAM	Unkn-05	M5		0,00	0,000	
B04	FAM	Unkn-05	M5		0,00	0,000	
B08	FAM	Unkn-07	m6		0,00	0,00	NEGATIVA
B09	FAM	Unkn-07	m6		0,00	0,00	
B10	FAM	Unkn-07	m6		0,00	0,00	
B11	FAM	Unkn-08	m7		0,00	0,00	NEGATIVA
B12	FAM	Unkn-08	m7		0,00	0,00	
C01	FAM	Unkn-08	m7		0,00	0,00	

C02	FAM	Unkn-09	m8		0,00	0,00	NEGATIVA
C03	FAM	Unkn-09	m8		0,00	0,00	
C04	FAM	Unkn-09	m8		0,00	0,00	
C05	FAM	Unkn-10	m9		0,00	0,00	NEGATIVA
C06	FAM	Unkn-10	m9	35,88	35,88	35,88	
C07	FAM	Unkn-10	m9		0,00	0,00	
C08	FAM	Unkn-11	m10		0,00	0,00	NEGATIVA
C09	FAM	Unkn-11	m10		0,00	0,00	
C10	FAM	Unkn-11	m10		0,00	0,00	
C09	FAM	Unkn-11	M11		0,00	0,000	NEGATIVA
C10	FAM	Unkn-11	M11		0,00	0,000	
C11	FAM	Unkn-11	M11		0,00	0,000	
C12	FAM	Unkn-12	M12		0,00	0,000	NEGATIVA
D01	FAM	Unkn-12	M12		0,00	0,000	
D02	FAM	Unkn-12	M12		0,00	0,000	
D03	FAM	Unkn-13	M13		0,00	0,000	POSITIVA
D04	FAM	Unkn-13	M13	23,33	30,09	9,562	
D05	FAM	Unkn-13	M13	36,85	30,09	9,562	
D06	FAM	Unkn-14	M14		0,00	0,000	NEGATIVA
D07	FAM	Unkn-14	M14		0,00	0,000	
D08	FAM	Unkn-14	M14	29,07	29,07	0,000	
D09	FAM	Unkn-15	M15		0,00	0,000	NEGATIVA
D10	FAM	Unkn-15	M15	36,94	36,94	0,000	
D11	FAM	Unkn-15	M15		0,00	0,000	
D12	FAM	Unkn-16	M16	33,47	33,66	0,263	POSITIVA
E01	FAM	Unkn-16	M16		0,000	0,000	
E02	FAM	Unkn-16	M16	33,84	33,66	0,263	
E03	FAM	Unkn-17	M17		0,00	0,000	NEGATIVA
E04	FAM	Unkn-17	M17		0,00	0,000	
E05	FAM	Unkn-17	M17		0,00	0,000	
E06	FAM	Unkn-18	M18		0,00	0,000	NEGATIVA
E07	FAM	Unkn-18	M18	34,29	34,29	0,000	
E08	FAM	Unkn-18	M18		0,00	0,000	
E09	FAM	Unkn-19	M19		0,00	0,000	NEGATIVA
E10	FAM	Unkn-19	M19		0,00	0,000	
E11	FAM	Unkn-19	M19		0,00	0,000	
E12	FAM	Unkn-20	M20	37,44	37,44	0,000	NEGATIVA
F01	FAM	Unkn-20	M20		0,00	0,000	
F02	FAM	Unkn-20	M20		0,00	0,000	
F03	FAM	Unkn-21	M21		0,00	0,000	NEGATIVA
F04	FAM	Unkn-21	M21	39,30	39,30	0,000	
F05	FAM	Unkn-21	M21		0,00	0,000	
F06	FAM	Unkn-22	M22		0,00	0,000	NEGATIVA
F07	FAM	Unkn-22	M22		0,00	0,000	
F08	FAM	Unkn-22	M22		0,00	0,000	
F09	FAM	Unkn-23	M23		0,00	0,000	NEGATIVA
F10	FAM	Unkn-23	M23		0,00	0,000	
F11	FAM	Unkn-23	M23		0,00	0,000	
C11	FAM	Unkn-12	m24		0,00	0,00	NEGATIVA
C12	FAM	Unkn-12	m24		0,00	0,00	
D01	FAM	Unkn-12	m24		0,00	0,00	
D02	FAM	Unkn-13	m25		0,00	0,00	NEGATIVA
D03	FAM	Unkn-13	m25		0,00	0,00	
D04	FAM	Unkn-13	m25		0,00	0,00	
D05	FAM	Unkn-14	m26		0,00	0,00	NEGATIVA
D06	FAM	Unkn-14	m26		0,00	0,00	
D07	FAM	Unkn-14	m26		0,00	0,00	

122 *Identificación y Prevalencia de Parásitos de Interés en Salud Pública, en Aguas de Riego y Hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca*

G10	FAM	Unkn-27	M27	30,44	30,56	0,213	POSITIVA
G11	FAM	Unkn-27	M27	30,44	30,56	0,213	
G12	FAM	Unkn-27	M27	30,81	30,56	0,213	
H01	FAM	Unkn-28	M28	38,23	38,23	0,000	NEGATIVA
H02	FAM	Unkn-28	M28		0,00	0,000	
H03	FAM	Unkn-28	M28		0,00	0,000	
H04	FAM	Unkn-29	M29		0,00	0,000	NEGATIVA
H05	FAM	Unkn-29	M29		0,00	0,000	
H06	FAM	Unkn-29	M29		0,00	0,000	
H07	FAM	Unkn-30	M30		0,00	0,000	NEGATIVA
H08	FAM	Unkn-30	M30		0,00	0,000	
H09	FAM	Unkn-30	M30		0,00	0,000	
H10	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	25,63	25,68	0,077	OK
H11	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	25,73	25,68	0,077	OK
H12	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A01	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A02	FAM	Unkn-01	M31		0,00	0,000	NEGATIVA
A03	FAM	Unkn-01	M31		0,00	0,000	
A04	FAM	Unkn-01	M31		0,00	0,000	
A05	FAM	Unkn-02	M32		0,00	0,000	NEGATIVA
A06	FAM	Unkn-02	M32		0,00	0,000	
A07	FAM	Unkn-02	M32		0,00	0,000	
A08	FAM	Unkn-03	M33		0,00	0,000	NEGATIVA
A09	FAM	Unkn-03	M33		0,00	0,000	
A10	FAM	Unkn-03	M33		0,00	0,000	
A11	FAM	Unkn-04	M34		0,00	0,000	NEGATIVA
A12	FAM	Unkn	M34		0,00	0,000	
B01	FAM	Unkn-04	M34		0,00	0,000	
B02	FAM	Unkn-05	M35		0,00	0,000	NEGATIVA
B03	FAM	Unkn-05	M35		0,00	0,000	
B04	FAM	Unkn-05	M35		0,00	0,000	
B05	FAM	Unkn-06	M36		0,00	0,000	NEGATIVA
B06	FAM	Unkn-06	M36		0,00	0,000	
B07	FAM	Unkn-06	M36		0,00	0,000	
B08	FAM	Unkn-07	M37		0,00	0,000	NEGATIVA
B09	FAM	Unkn-07	M37		0,00	0,000	
B10	FAM	Unkn-07	M37		0,00	0,000	
B11	FAM	Unkn-08	M38		0,00	0,000	NEGATIVA
B12	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
C01	FAM	Unkn-08	M38		0,00	0,000	
C02	FAM	Unkn-08	M38		0,00	0,000	
C03	FAM	Unkn-09	M39		0,00	0,000	
C04	FAM	Unkn-09	M39		0,00	0,000	NEGATIVA
C05	FAM	Unkn-09	M39	39,56	39,56	0,000	
C06	FAM	Unkn-10	M40		0,00	0,000	
C07	FAM	Unkn-10	M40		0,00	0,000	NEGATIVA
C08	FAM	Unkn-10	M40		0,00	0,000	
C09	FAM	Unkn-11	M41		0,00	0,000	
C10	FAM	Unkn-11	M41		0,00	0,000	NEGATIVA
C11	FAM	Unkn-11	M41		0,00	0,000	

C12	FAM	Unkn-12	M42		0,00	0,000	NEGATIVA
D01	FAM	Unkn-12	M42		0,00	0,000	
D02	FAM	Unkn-12	M42		0,00	0,000	
D03	FAM	Unkn-13	M43		0,00	0,000	NEGATIVA
D04	FAM	Unkn-13	M43		0,00	0,000	
D05	FAM	Unkn-13	M43	35,29	35,29	0,000	
D06	FAM	Unkn-14	M44		0,00	0,000	POSITIVA
D07	FAM	Unkn-14	M44	36,89	36,86	0,048	
D08	FAM	Unkn-14	M44	36,83	36,86	0,048	
D09	FAM	Unkn-15	M45		0,00	0,000	NEGATIVA
D10	FAM	Unkn-15	M45	37,87	37,87	0,000	
D11	FAM	Unkn-15	M45		0,00	0,000	
D12	FAM	Unkn-16	M46	36,30	36,30	0,000	NEGATIVA
E01	FAM	Unkn-16	M46		0,00	0,000	
E02	FAM	Unkn-16	M46		0,00	0,000	
E03	FAM	Unkn-17	M47		0,00	0,000	NEGATIVA
E04	FAM	Unkn-17	M47		0,00	0,000	
E05	FAM	Unkn-17	M47		0,00	0,000	
E06	FAM	Unkn-18	M48		0,00	0,000	NEGATIVA
E07	FAM	Unkn-18	M48		0,00	0,000	
E08	FAM	Unkn-18	M48		0,00	0,000	
E09	FAM	Unkn-19	M49		0,00	0,000	NEGATIVA
E10	FAM	Unkn-19	M49	37,52	37,52	0,000	
E11	FAM	Unkn-19	M49		0,00	0,000	
E12	FAM	Unkn-20	M50	34,24	34,19	0,220	POSITIVA
F01	FAM	Unkn-20	M50	34,38	34,19	0,220	
F02	FAM	Unkn-20	M50	33,95	34,19	0,220	
F03	FAM	Unkn-21	M51	36,56	36,56	0,000	NEGATIVA
F04	FAM	Unkn-21	M51		0,00	0,000	
F05	FAM	Unkn-21	M51		0,00	0,000	
F06	FAM	Unkn-22	M52		0,00	0,000	NEGATIVA
F07	FAM	Unkn-22	M52		0,00	0,000	
F08	FAM	Unkn-22	M52		0,00	0,000	
F09	FAM	Unkn-23	M53	36,47	36,47	0,000	NEGATIVA
F10	FAM	Unkn-23	M53		0,00	0,000	
F11	FAM	Unkn-23	M53		0,00	0,000	
F12	FAM	Unkn-24	M54		0,00	0,000	NEGATIVA
G01	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
G02	FAM	Unkn-24	M54		0,00	0,000	
G03	FAM	Unkn-24	M54		0,00	0,000	
G04	FAM	Unkn-25	M55		0,00	0,000	
G05	FAM	Unkn-25	M55		0,00	0,000	NEGATIVA
G06	FAM	Unkn-25	M55		0,00	0,000	
G07	FAM	Unkn-26	M56		0,00	0,000	
G08	FAM	Unkn-26	M56	35,38	35,38	0,000	NEGATIVA
G09	FAM	Unkn-26	M56		0,00	0,000	
G10	FAM	Unkn-27	M57		0,00	0,000	
G11	FAM	Unkn-27	M57		0,00	0,000	NEGATIVA
G12	FAM	Unkn-27	M57		0,00	0,000	
H01	FAM	Unkn-28	M58		0,00	0,000	
H02	FAM	Unkn-28	M58		0,00	0,000	
H03	FAM	Unkn-28	M58		0,00	0,000	
H04	FAM	Unkn-29	M59		0,00	0,000	NEGATIVA
H05	FAM	Unkn-29	M59		0,00	0,000	
H06	FAM	Unkn-29	M59		0,00	0,000	
H07	FAM	Unkn-30	M60	36,41	36,30	0,154	POSITIVA
H08	FAM	Unkn-30	M60	36,20	36,30	0,154	

124 *Identificación y Prevalencia de Parásitos de Interés en Salud Pública, en Aguas de Riego y Hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca*

H09	FAM	Unkn-30	M60		0,00	0,000	
H10	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	26,42	26,71	0,412	OK
H11	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	27,00	26,71	0,412	OK
H12	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A01	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A02	FAM	Unkn-01	M61	36,23	36,02	0,462	POSITIVA
A03	FAM	Unkn-01	M61	36,34	36,02	0,462	
A04	FAM	Unkn-01	M61	35,49	36,02	0,462	
A05	FAM	Unkn-02	M62		0,00	0,000	NEGATIVA
A06	FAM	Unkn-02	M62		0,00	0,000	
A07	FAM	Unkn-02	M62		0,00	0,000	
A08	FAM	Unkn-03	M63	38,67	38,67	0,000	NEGATIVA
A09	FAM	Unkn-03	M63		0,00	0,000	
A10	FAM	Unkn-03	M63		0,00	0,000	
A11	FAM	Unkn-04	M64		0,00	0,000	NEGATIVA
A12	FAM	Unkn	M64		0,00	0,000	
B01	FAM	Unkn-04	M64		0,00	0,000	
B02	FAM	Unkn-05	M65		0,00	0,000	NEGATIVA
B03	FAM	Unkn-05	M65		0,00	0,000	
B04	FAM	Unkn-05	M65	38,31	38,31	0,000	
B05	FAM	Unkn-06	M66		0,00	0,000	NEGATIVA
B06	FAM	Unkn-06	M66		0,00	0,000	
B07	FAM	Unkn-06	M66		0,00	0,000	
B08	FAM	Unkn-07	M67		0,00	0,000	NEGATIVA
B09	FAM	Unkn-07	M67		0,00	0,000	
B10	FAM	Unkn-07	M67	37,92	37,92	0,000	
B11	FAM	Unkn-08	M68		0,00	0,000	NEGATIVA
B12	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
C01	FAM	Unkn-08	M68		0,00	0,000	
C02	FAM	Unkn-08	M68		0,00	0,000	
C03	FAM	Unkn-09	M69		0,00	0,000	
C04	FAM	Unkn-09	M69		0,00	0,000	NEGATIVA
C05	FAM	Unkn-09	M69		0,00	0,000	
C06	FAM	Unkn-10	M70		0,00	0,000	
C07	FAM	Unkn-10	M70		0,00	0,000	NEGATIVA
C08	FAM	Unkn-10	M70		0,00	0,000	
C09	FAM	Unkn-11	M71		0,00	0,000	
C10	FAM	Unkn-11	M71		0,00	0,000	NEGATIVA
C11	FAM	Unkn-11	M71		0,00	0,000	
C12	FAM	Unkn-12	M72	37,65	37,65	0,000	
D01	FAM	Unkn-12	M72		0,00	0,000	NEGATIVA
D02	FAM	Unkn-12	M72		0,00	0,000	
D03	FAM	Unkn-13	M73		0,00	0,000	
D04	FAM	Unkn-13	M73		0,00	0,000	NEGATIVA
D05	FAM	Unkn-13	M73		0,00	0,000	
D06	FAM	Unkn-14	M74		0,00	0,000	
D07	FAM	Unkn-14	M74		0,00	0,000	NEGATIVA
D08	FAM	Unkn-14	M74		0,00	0,000	
D09	FAM	Unkn-15	M75		0,00	0,000	
D10	FAM	Unkn-15	M75		0,00	0,000	NEGATIVA

D11	FAM	Unkn-15	M75		0,00	0,000	
D12	FAM	Unkn-16	M76	37,60	37,60	0,000	NEGATIVA
E01	FAM	Unkn-16	M76		0,00	0,000	
E02	FAM	Unkn-16	M76		0,00	0,000	
E03	FAM	Unkn-17	M77	35,19	35,42	0,328	POSITIVA
E04	FAM	Unkn-17	M77		0,00	0,000	
E05	FAM	Unkn-17	M77	35,65	35,42	0,328	
E06	FAM	Unkn-18	M78		0,00	0,000	NEGATIVA
E07	FAM	Unkn-18	M78		0,00	0,000	
E08	FAM	Unkn-18	M78		0,00	0,000	
E09	FAM	Unkn-19	M79		0,00	0,000	NEGATIVA
E10	FAM	Unkn-19	M79		0,00	0,000	
E11	FAM	Unkn-19	M79		0,00	0,000	
E12	FAM	Unkn-20	M80		0,00	0,000	NEGATIVA
F01	FAM	Unkn-20	M80		0,00	0,000	
F02	FAM	Unkn-20	M80		0,00	0,000	
F03	FAM	Unkn-21	M81		0,00	0,000	NEGATIVA
F04	FAM	Unkn-21	M81		0,00	0,000	
F05	FAM	Unkn-21	M81		0,00	0,000	
F06	FAM	Unkn-22	M82		0,00	0,000	NEGATIVA
F07	FAM	Unkn-22	M82		0,00	0,000	
F08	FAM	Unkn-22	M82		0,00	0,000	
F09	FAM	Unkn-23	M83		0,00	0,000	NEGATIVA
F10	FAM	Unkn-23	M83		0,00	0,000	
F11	FAM	Unkn-23	M83		0,00	0,000	
F12	FAM	Unkn-24	M84		0,00	0,000	NEGATIVA
G01	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
G02	FAM	Unkn-24	M84		0,00	0,000	
G03	FAM	Unkn-24	M84		0,00	0,000	
G04	FAM	Unkn-25	M85		0,00	0,000	NEGATIVA
G05	FAM	Unkn-25	M85		0,00	0,000	
G06	FAM	Unkn-25	M85		0,00	0,000	
G07	FAM	Unkn-26	M86		0,00	0,000	NEGATIVA
G08	FAM	Unkn-26	M86		0,00	0,000	
G09	FAM	Unkn-26	M86		0,00	0,000	
G10	FAM	Unkn-27	M87		0,00	0,000	NEGATIVA
G11	FAM	Unkn-27	M87		0,00	0,000	
G12	FAM	Unkn-27	M87	37,30	37,30	0,000	
H01	FAM	Unkn-28	M88		0,00	0,000	NEGATIVA
H02	FAM	Unkn-28	M88		0,00	0,000	
H03	FAM	Unkn-28	M88		0,00	0,000	
H04	FAM	Unkn-29	M89		0,00	0,000	NEGATIVA
H05	FAM	Unkn-29	M89		0,00	0,000	
H06	FAM	Unkn-29	M89		0,00	0,000	
H07	FAM	Unkn-30	M90		0,00	0,000	NEGATIVA
H08	FAM	Unkn-30	M90		0,00	0,000	
H09	FAM	Unkn-30	M90		0,00	0,000	
H10	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	26,38	26,72	0,478	OK
H11	FAM	Pos Ctrl-32	CONTROL +	27,05	26,72	0,478	OK
H12	FAM	NTC			0,00	0,000	OK
A01	FAM	Unkn-01	M91		0,00	0,00	NEGATIVA
A02	FAM	Unkn-01	M91		0,00	0,00	
A03	FAM	Unkn-01	M91		0,00	0,00	
A04	FAM	Unkn-02	m92		0,00	0,00	NEGATIVA
A05	FAM	Unkn-02	m92		0,00	0,00	

A06	FAM	Unkn-02	m92		0,00	0,00	
A07	FAM	Unkn-03	m93		0,00	0,00	NEGATIVA
A08	FAM	Unkn-03	m93		0,00	0,00	
A09	FAM	Unkn-03	m93		0,00	0,00	
A10	FAM	Unkn-04	m94		0,00	0,00	NEGATIVA
A11	FAM	Unkn-04	m94		0,00	0,00	
A12	FAM	Unkn-04	m94		0,00	0,00	
B01	FAM	NTC			0,00	0,00	OK
B02	FAM	Unkn-05	m95	35,34	35,74	0,63	POSITIVA
B03	FAM	Unkn-05	m95	35,43	35,74	0,63	
B04	FAM	Unkn-05	m95	36,46	35,74	0,63	
B05	FAM	Unkn-06	m96		0,00	0,00	NEGATIVA
B06	FAM	Unkn-06	m96		0,00	0,00	
B07	FAM	Unkn-06	m96		0,00	0,00	
D08	FAM	Pos Ctrl-01		26,28	26,25	0,12	OK
D09	FAM	Pos Ctrl-01		26,35	26,25	0,12	OK
D10	FAM	Pos Ctrl-01		26,12	26,25	0,12	OK
D11	FAM	NTC			0,00	0,00	OK
D12	FAM	NTC			0,00	0,00	OK

Anexo 10. Valores de ji-cuadrado en relación con la presencia de *Giardia* spp. y parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

Valor ji-cuadrado (X²) para <i>Giardia</i> spp. y datos fisicoquímicos y microbiológicos en 96 muestras de aguas colectadas en el Distrito la Ramada	
Parámetros	P-Value (porcentaje)
* Coliformes totales (NMP/100mL)	0,001 (0%)
* <i>E. coli</i> (NMP/100mL)	0,000 (0%)
OD (mg/LO ₂)	0,400 (40%)
*EC (μS/cm)	0,022 (2%)
pH	0,507 (51%)
Temperatura	0,162 (16%)
DQO	0,404 (40%)
DBO5	0,403 (40%)

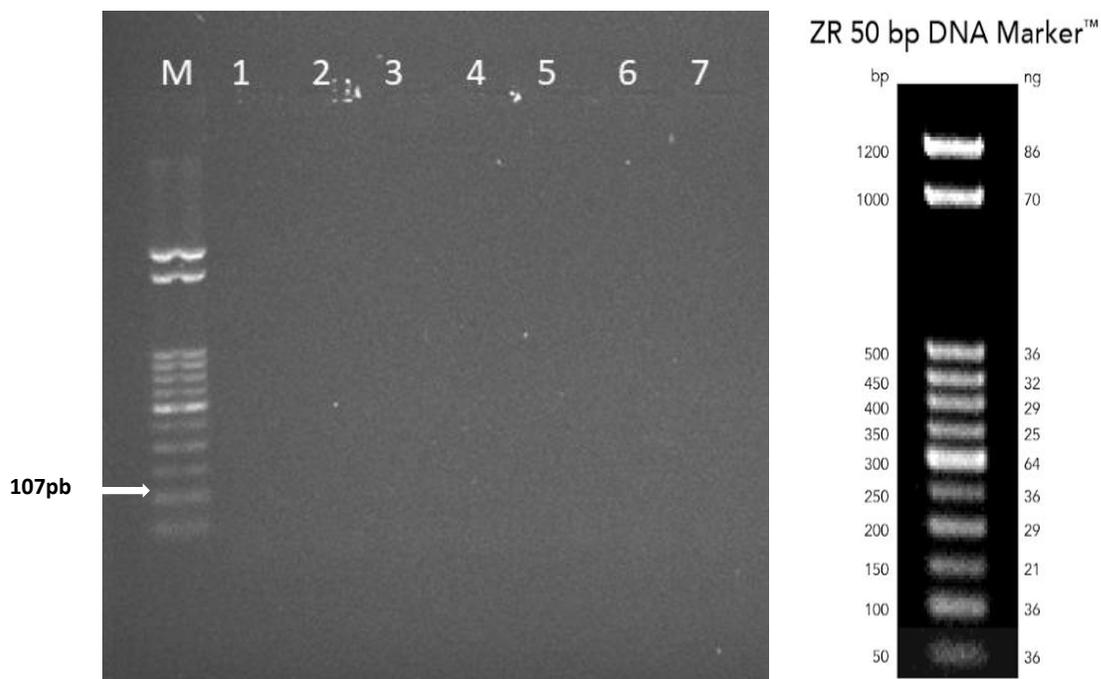
FC(Coliformes fecales); NMP (Número más probable), OD (Oxígeno disuelto), EC (conductividad); DQO (Demanda química de oxígeno); DBO5 (demanda bioquímica de oxígeno). *Valores de P-value <0.05.

Anexo 11. Resultados obtenidos en ensayo de qPCR con equipo BIO-RAD. (Muestra Fecal 1, positiva con ooquistes de *Cryptosporidium spp.*). Concentración de ADN: 12.6ng/ul

Muestras	ADN (ng/3ul)	Cq Mean	Cq Std. Dev
muestra (Pura)	38,80	0,00	-
muestra (Pura)	38,80	0,00	-
muestra (1/5)	7,56	0,00	-
muestra (1/5)	7,56	0,00	-
muestra (1/10)	3,78	0,00	-
muestra (1/10)	3,78	0,00	-
NTC	N/A	-	-
NTC	N/A	-	-

Anexo 12. Resultados obtenidos en ensayo de qPCR con equipo BIO-RAD. (Muestra concentración de Ooquistes de *Cryptosporidium spp.*). Concentración de ADN: 7.3ng/ul

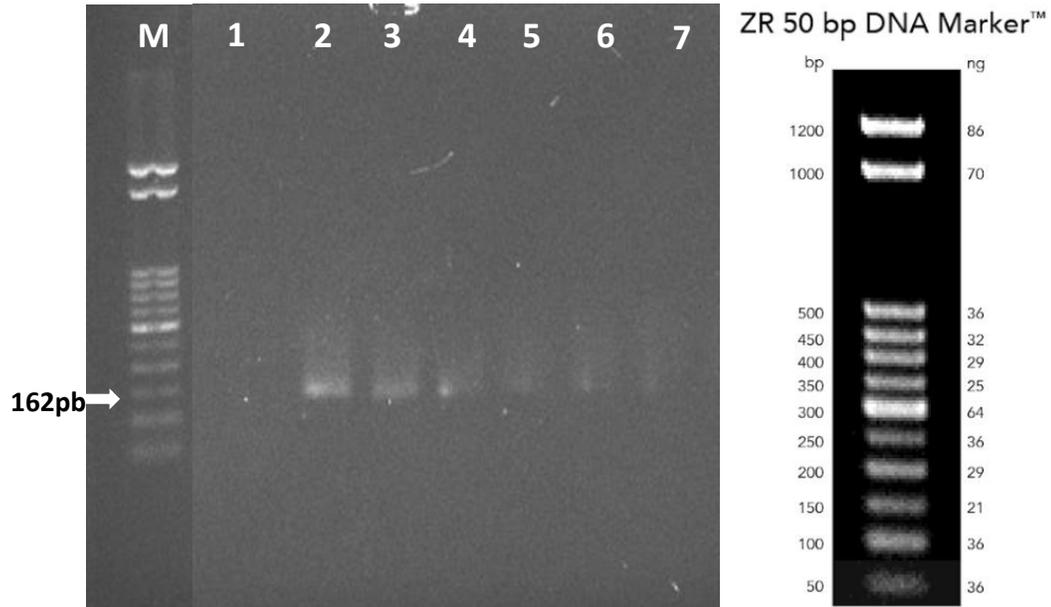
Muestras	ADN (ng/3ul)	Cq Mean	Cq Std. Dev
muestra (Pura)	21.9	0,00	0,000
muestra (Pura)	21.9	0,00	0,000
muestra (Pura)	21.9	0,00	0,000
muestra (1/4)	5.475	0,00	0,000
muestra (1/4)	5.475	0,00	0,000
muestra (1/4)	5.475	0,00	0,000
muestra (1/8)	2.737	0,00	0,000
muestra (1/8)	2.737	0,00	0,000
muestra (1/8)	2.737	0,00	0,000
muestra (1/12)	1.825	0,00	0,000
muestra (1/12)	1.825	0,00	0,000
muestra (1/12)	1.825	0,00	0,000
NTC	N/A	-	0
NTC	N/A	-	0



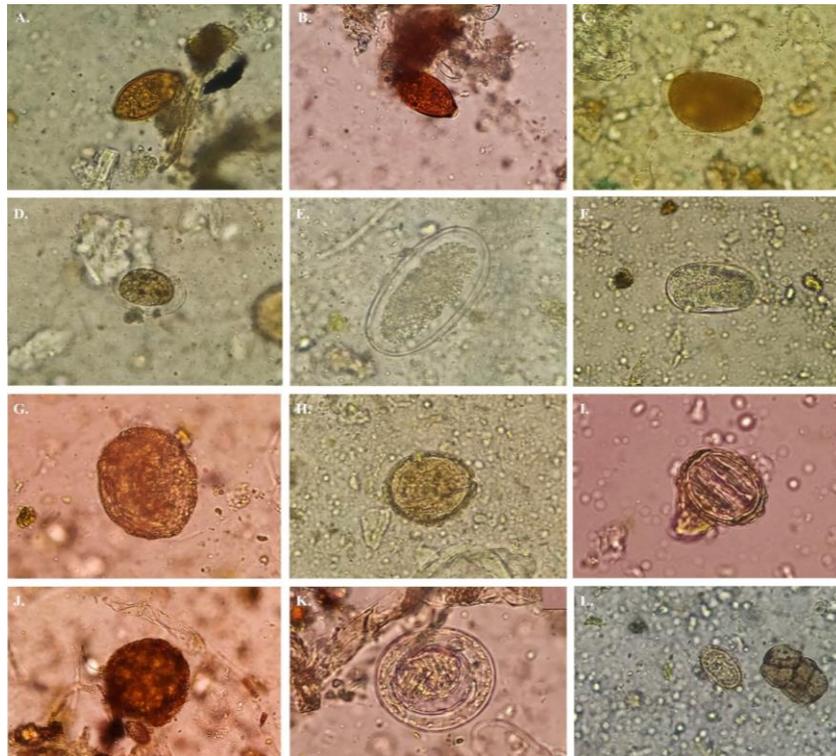
Anexo 13. Resultados del gel de Electroforesis para *Cryptosporidium* spp. Escalera molecular (carril M). Muestra de ADN extraído de Materia Fecal con kit FastDNA spin kit for Soil; ADN puro (carril 1-2); dilución 1/5 (carril 3-4); dilución 1/10 (carril 5-6), control negativo (carril 7) (Zymo Research, 2016).

Anexo 14. Resultados obtenidos en ensayo de qPCR con equipo BIO-RAD. (Muestra ADN extraído de ooquiste de *Toxoplasma gondii*). Concentración de ADN: 6.6ng/ul

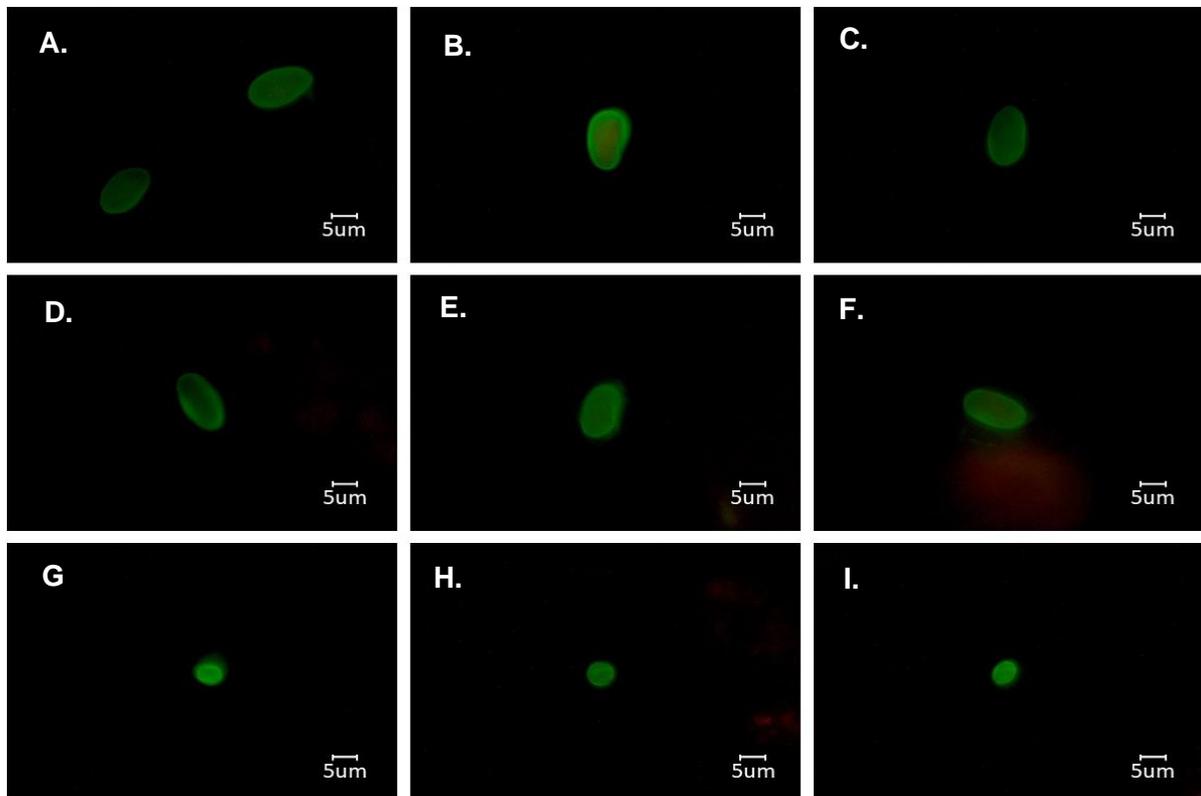
Muestras	ADN (ng/2ul)	Cq Mean	Cq Std. Dev
muestra (Pura)	13.2	0,00	-
muestra (Pura)	13.2	0,00	-
muestra (1/4)	3.3	0,00	-
muestra (1/4)	3.3	0,00	-
muestra (1/8)	1.65	0,00	-
muestra (1/8)	1.65	0,00	-
NTC	N/A	-	-
NTC	N/A	-	-



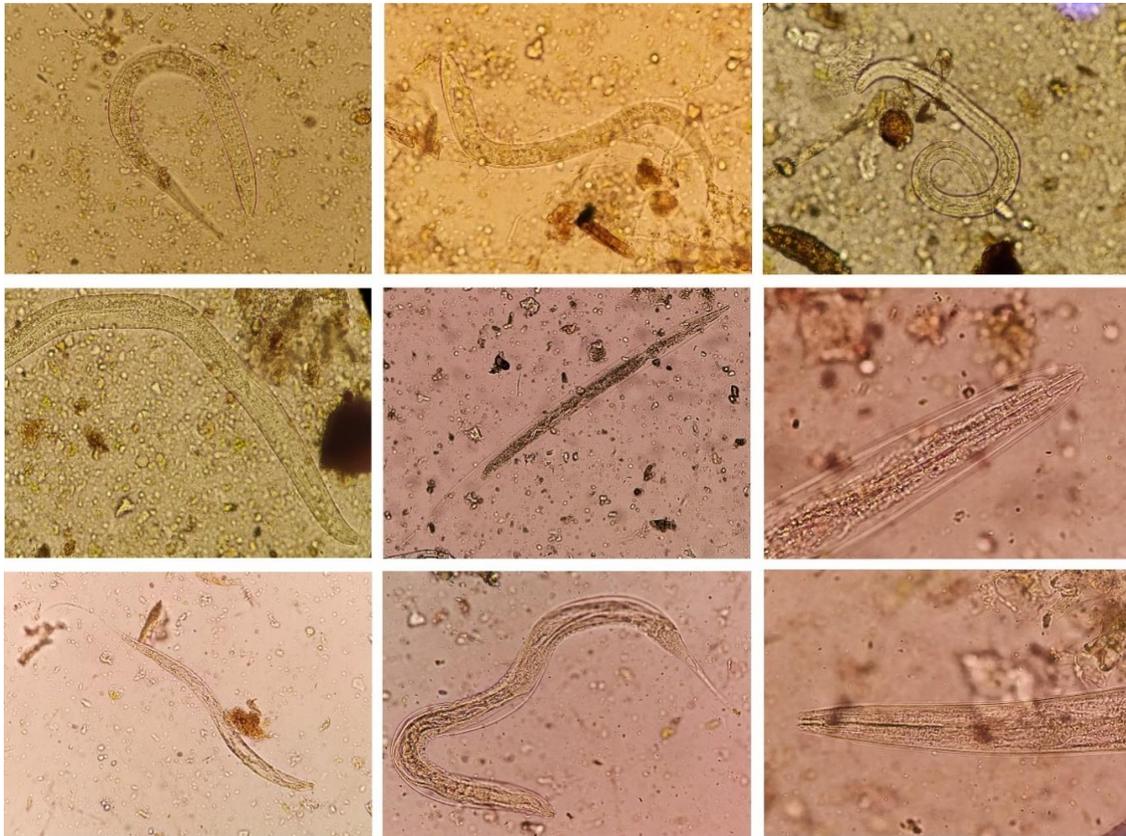
Anexo 15. Resultados del gel de Electroforesis para *Toxoplasma gondii*. Escalera molecular (carril M). Control negativo (carril 1). Muestra de ADN extraído de ooquistes de *T. gondii*, materia fecal, paciente felino; ADN puro (carril 2-3); dilución 1/4 (carril 4-5); dilución 1/8 (carril 6-7), (Zymo Research, 2016).



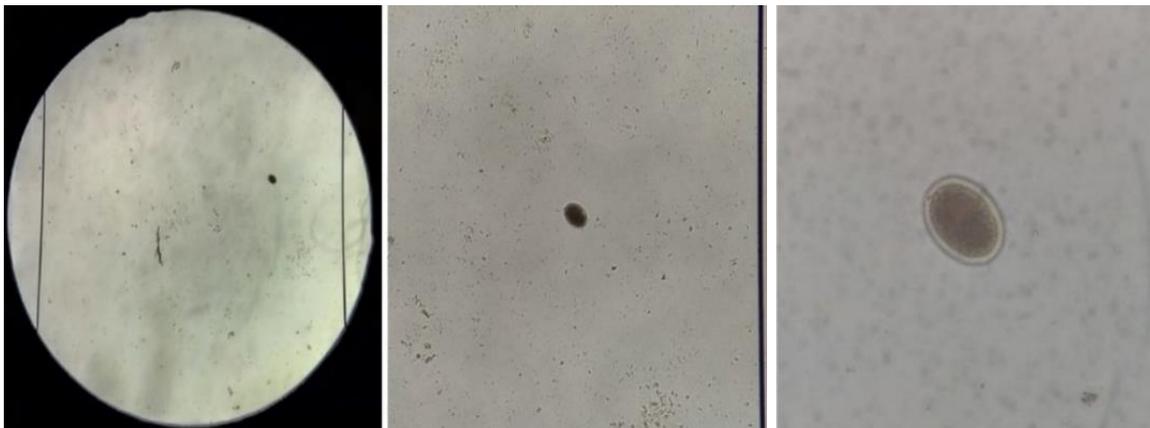
Anexo 16. Huevos de helmintos detectados en muestras de hortalizas irrigadas con aguas provenientes del antiguo distrito La Ramada. *Trichuris* spp. (A-B); *Ancylostomideos* (C-F); *Ascaris* spp. (G-J); *Hymenolepis* spp. (K); y *Capilaria* spp. (L). Objetivo 40X.



Anexo 17. Estructuras (oo)quísticas de protozoarios detectadas en muestras de Hortalizas. Quistes de *Giardia* spp. (A-F); Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (G-I). Observación: microscopía de inmunofluorescencia (FITC), Objetivo 40X.



Anexo 18. Larvas de nematodos. detectadas en muestras de Hortalizas irrigadas con aguas provenientes del antiguo distrito de riego y drenaje La Ramada, Observación microscópica campo claro.



Anexo 19. Evidencia fotográfica: detección de un Huevo de *Ascaris suum* en un sistema de filtro anaerobio de flujo descendente.