

NMX-AA-113-SCFI-1999

ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTO - MÉTODO DE PRUEBA

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ASOCIACIÓN NACIONAL DE LA INDUSTRIA QUÍMICA, A.C.
Dirección General.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES DE REFRESCOS Y AGUAS
CARBONATADAS
Dirección Técnica.
- CÁMARA DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN DE NUEVO LEÓN
Instituto para la Protección Ambiental - Dirección General.
- CÁMARA MINERA DE MÉXICO
Comisión de Ecología y Recursos Naturales.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE ACEITES, GRASAS Y JABONES
Gerencia de Ecología, Normas y Salud.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DEL HIERRO Y DEL ACERO
Instituto Mexicano del Hierro y el Acero.
- CÁMARA NACIONAL DEL CEMENTO
- COLEGIO DE INGENIEROS MECÁNICOS Y ELECTRICISTAS
Coordinación del Comité Nacional Permanente de Peritos de Riesgo Ambiental.
- COMISIÓN FEDERAL DE ELECTRICIDAD
Gerencia de Protección Ambiental.
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN AL
AMBIENTE
- CONFEDERACIÓN DE CÁMARAS INDUSTRIALES
Comisión de Ecología.
- CONFEDERACIÓN PATRONAL DE LA REPÚBLICA MEXICANA
Comisión Nacional de Ecología.
- DEPARTAMENTO DEL DISTRITO FEDERAL
Subdirección de Verificación y Control de la Contaminación.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Academia de Ingeniería Sanitaria;
Centro de Investigación y Estudios Avanzados.

- INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
Dirección General.
- PETRÓLEOS MEXICANOS
Exploración y Producción-Subgerencia de Normatividad y Promoción;
Refinación-Gerencia de Protección Ambiental y Seguridad Industrial;
Dirección de Gas y Petroquímica Básica;
Dirección Corporativa de Administración.
- PROCURADURÍA FEDERAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
Dirección General de Verificación al Ordenamiento Ecológico.
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de Agricultura.
- SECRETARÍA DE COMUNICACIONES Y TRANSPORTES
Dirección General de Transporte Terrestre Federal.
- SECRETARÍA DE ECOLOGÍA DEL ESTADO DE MÉXICO
Dirección General de Normatividad y Apoyo Técnico.
- SECRETARÍA DE ENERGÍA
Dirección de Seguridad y Protección al Ambiente.
- SECRETARÍA DE GOBERNACIÓN
Dirección General de Protección Civil.
- SECRETARÍA DE MARINA
Dirección de Protección al Medio Ambiente.
- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA
Subsecretaría de Recursos Naturales.
- SECRETARÍA DE SALUD
Dirección General de Salud Ambiental.
- SECRETARÍA DEL TRABAJO Y PREVISIÓN SOCIAL
Subdirección de la Unidad de Estructuración de Normas.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Coordinación de Investigación.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Centro de Ciencias de la Atmósfera;
Coordinación de Investigación Científica;
Facultad de Ingeniería-Laboratorio de Control de Emisiones.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número de capítulo	Página
0 Introducción	1
1 Objetivo y campo de aplicación	1

2	Referencias	2
3	Definiciones	2
4	Principio	3
5	Muestreo	4
6	Reactivos y materiales	4
7	Aparatos	5
8	Preparación y acondicionamiento de la muestra	5
9	Procedimiento	5
10	Expresión de resultados	9
11	Informe de la prueba	11
12	Bibliografía	11
13	Concordancia con normas internacionales	12

O INTRODUCCIÓN

Ante la escasez de recursos hídricos, la explosión demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales es una importante alternativa como fuente adicional de suministro, particularmente para riego agrícola. Sin embargo, dicha actividad tiene implicaciones negativas desde el punto de vista sanitario, ya que representa un riesgo a la salud de los trabajadores agrícolas y de los consumidores de los productos, en especial cuando se trata de aquéllos que se consumen crudos como las hortalizas.

Los helmintos representan un elevado riesgo a la salud humana debido a que sus diversos estadios infecciosos (huevos embrionados o larvas) son altamente persistentes en el agua contaminada. Así, el agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales, sobre todo cuando ésta se emplea para el riego de cultivos.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la detección y enumeración de huevos de helminto en aguas residuales y lodos, con el fin de evaluar la calidad del agua y la eficiencia de los sistemas de tratamiento de la misma.

Esta norma mexicana es aplicable para la evaluación de la calidad del agua residual cruda y tratada.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

NOM-001-ECOL-1996	Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.
NOM-003-ECOL-1997	Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de septiembre de 1998.
NMX-AA-003-1980	Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.
NMX-BB-014-1973	Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorio. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de agosto de 1973.
NMX-CC-013-1992	Criterios generales para la operación de los laboratorios de pruebas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de junio de 1992.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Aguas residuales

Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas.

3.2 Coagulación

Es la adición de compuestos químicos para alterar el estado físico de los sólidos coloidales o suspendidos, a fin de facilitar su remoción por sedimentación o filtración.

3.3 Filtración

Es la remoción de las partículas suspendidas de un líquido que fluye a través de un medio de porosidad adecuada.

3.4 Flotación

Es la técnica de concentración donde las partículas de interés permanecen en la superficie de la solución cuya densidad es mayor. Por ejemplo, la densidad de huevos de helminto se encuentra entre 1,05 y 1,18, y la de los líquidos de flotación se sitúa

entre 1,1 y 1,4.

3.5 Helmintos

Término designado a un amplio grupo de organismos que incluye a todos los gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales) y de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, y sus ciclos de vida comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no y la alternancia compleja de generaciones que incluye hasta tres huéspedes diferentes.

3.6 Método bifásico

Es la técnica de concentración que utiliza la combinación de dos reactivos no miscibles entre sí, y donde las partículas (huevos y detritus) se orientan en función de su balance hidrofílico-lipofílico.

3.7 Sedimentación

Es el proceso físico de separación entre dos fases debido a la diferencia de sus densidades.

4 PRINCIPIO

Este método de análisis se basa en la diferencia de densidades entre los huevos de helminto, las demás sustancias presentes en las aguas residuales, y las que se agregan para permitir la separación. El método comprende los procesos de coagulación, sedimentación, flotación, decantación y la técnica bifásica para recuperar los huevos de helminto y efectuar el conteo.

5 MUESTREO

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de la calidad del agua, por lo cual, éste debe efectuarse como se menciona a continuación y de acuerdo a lo establecido en las normas mexicanas NMX-AA-003 y NMX-BB-014 (ver 2 Referencias):

- 5.1 Preparar garrafones de plástico inerte de 8 L, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 10 % (NaClO).
- 5.2 Lavarlos con agua potable a chorro y enjuagarlos varias veces con agua destilada.
- 5.3 Se toman muestras de 5 L (volumen total), en estos garrafones de plástico inerte, los cuales deben ser cerrados y sellados.

6 REACTIVOS Y MATERIALES

6.1 Reactivos (grado analítico)

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- Alcohol etílico (C_2H_5OH);
- Agua destilada;
- Cloruro de sodio (NaCl);
- Éter etílico;
- Formaldehído al 4 %;
- Hipoclorito de sodio (NaClO) (no aplica grado analítico), y
- Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

6.2 Materiales

- Aplicadores de madera;
- Barras magnéticas;
- Bulbo de goma;
- Espátula;
- Garrafrones de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 8 L de capacidad;
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50 ml;
- Guantes de látex;
- Mascarilla contra gases y vapores;
- Matraz Kitazato;
- Pipetas de 10 ml de plástico;
- Probetas graduadas de 50 ml y de 1 000 ml;
- Recipientes de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 2 000 ml y 4 000 ml de capacidad;
- Tamiz de 160 μ m (micras) de poro;
- Tubos de centrifuga de 200 ml, 450 ml o de mayor volumen según sea la capacidad máxima de la centrifuga;
- Tubos de centrifuga cónicos de 50 ml, y
- Vasos de precipitados de 1 000 ml.

NOTA- Los materiales utilizados deben cumplir con lo establecido en la norma mexicana NMX-BB-014 (ver 2 Referencias).

7 APARATOS

- Agitador de tubos, con control de velocidad y adaptable a diversos tubos;
- Balanza granataria;
- Balanza analítica;
- Bomba de vacío con control de velocidad de succión;
- Campana de extracción;
- Celda de Sedgwich-Rafter o cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer;
- Centrifuga. Capaz de mantener los intervalos de operación de 1 000 r/min a 3 000 r/min o su equivalente en **g**;
- Densímetro (Hidrómetro). Capaz de mantener el intervalo de medición de 1,0 g/ml a 1,4 g/ml, y temperatura de operación de 0°C a 4°C;
- Incubadora;
- Microscopio óptico. Equipado para hacer iluminación campo claro (Köheler), con aumento de 10 a 100x y platina móvil (opcional);
- Parrilla con agitación magnética, y
- Refrigerador.

8 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

- 8.1 Las muestras deben mantenerse a una temperatura de 4°C $\pm$ 2°C hasta su llegada al laboratorio.
- 8.2 La muestra debe procesarse dentro de las 48 h después de su toma, o en caso contrario, debe fijarse con 10 ml de formaldehído al 4 %, o bien, preservarse en refrigeración para realizar su análisis antes de 2 meses.

9 PROCEDIMIENTO

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos

obtenidos.

9.1 Preparación de soluciones

9.1.1 Solución de sulfato de zinc (ZnSO_4) con gravedad específica de 1,3

Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 1 000 ml de agua destilada; mezclar en la parrilla magnética hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro. Ajustar la densidad a 1,3 agregando sulfato de zinc o agua destilada, según sea el caso.

9.1.2 Solución de alcohol-ácido.

Homogeneizar 650 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N, con 350 ml de alcohol etílico. Almacenar la solución en un recipiente hermético.

9.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos utilizados deben ser calibrados con patrones certificados o ajustados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

9.3 Seguridad

Durante el procesado de la muestra se debe utilizar guantes de látex y cubreboca para evitar cualquier riesgo de infección.

Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

Cuando se efectúe la agitación de las soluciones con éter, ésta se debe realizar en sitios ventilados o dentro de la campana de extracción, y considerar su inflamabilidad. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa, ya que es un reactivo sumamente tóxico.

9.4 Manejo de residuos

Todo material desechado debe ser previamente esterilizado o desinfectado con hipoclorito de sodio al 10%.

9.5 Concentración y separación de los huevos de helminto

La recuperación de los huevos de helminto de la muestra se debe realizar efectuando los siguientes pasos:

- a) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- b) Aspirar y desechar el sobrenadante por vacío y sin agitar, si la sedimentación (separación) se realizó por centrifugación, decantar lentamente. Filtrar el sedimento en el tamiz de 160 μm de poro. Lavar el tamiz con 5 L de agua (potable o destilada), y recuperar el agua de lavado junto con el sedimento filtrado.
- c) Colocar el filtrado y el agua de enjuague en el garrafón de 8 L donde originalmente se encontraba la muestra o en los recipientes utilizados en la centrifugación.
- d) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.

- e) Aspirar con cuidado el sobrenadante al máximo y desecharlo. Depositar el sedimento en los recipientes para la centrifuga. Enjuagar 3 veces el garrafón perfectamente con poca agua destilada, y colocar en los recipientes para centrifugación.
- f) Centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- g) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío. Asegurarse que en el fondo del recipiente exista la pastilla; en caso contrario, centrifugar nuevamente. Resuspender la pastilla en 150 ml de la solución de sulfato de zinc (ZnSO_4). Homogeneizar la pastilla con el agitador de tubos o con un aplicador de madera.
- h) Una vez más, centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min, y recuperar el sobrenadante virtiéndolo en un recipiente de plástico de 2 000 ml. Diluir cuando menos en 1 000 ml de agua destilada, y dejar sedimentar al menos 3 h, o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- i) Aspirar con cuidado y al máximo el sobrenadante por vacío, y resuspender el sedimento por agitación, utilizando poca agua destilada. Vertir la suspensión resultante en un tubo de centrifuga de 200 ml, incluyendo el agua de enjuague del recipiente y centrifugar a 480 **g** durante 3 min.
- j) Decantar nuevamente el sobrenadante y resuspender la pastilla con agua destilada en un tubo de 50 ml y centrifugar a 480 **g** durante 3 min.
- k) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío y resuspender la pastilla en 15 ml de la solución de alcohol-ácido por medio de un agitador de tubos, y agregar 10 ml de éter. Agitar suavemente y de vez en cuando destapar cuidadosamente los tubos para dejar escapar el gas que se desprenda. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción
- l) Centrifugar una última vez a 660 **g** durante 3 min.
- m) Aspirar al máximo el sobrenadante, dejando menos de 1 ml del mismo y evitando la pérdida de la pastilla; homogeneizar la pastilla, y proceder a la cuantificación. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción.

9.6 Cuantificación de los huevos de helminto

- a) Para evitar la sobreposición de las estructuras y el detritus no eliminado, repartir la muestra en volúmenes de 0,5 ml a 1,0 ml, con el fin de facilitar la lectura.
- b) Distribuir cada uno en una celda de Sedgwich-Rafter, o bien, en una cámara de conteo de Doncaster o cámara Neubauer.
- c) Identificar visualmente una a una las estructuras, anotando los generos identificadas con ayuda de la figura 1.

10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

10.1 Cálculos

Para determinar las revoluciones por minuto (rev/min) de la centrifuga, se utiliza la

fórmula siguiente:

$$\text{rev/min} = \sqrt{Kg/r}$$

donde:

g es la fuerza relativa de la centrifugación;
K es la constante cuyo valor es 89,456, y
r es el radio de la centrifuga en centímetros (cm).

La fórmula para calcular **g** es la siguiente:

$$g = r(\text{rev/min})/K$$

10.2 Expresar el resultado en número de huevecillos por litro, tomando en consideración la expresión en cálculos, o bien expresar el número de huevos contados y el volumen analizado:

$$HL = \frac{H}{5}$$

donde:

H es el número de huevos leídos en la muestra;
HL es el número de huevos por litro, y
5 es el volumen de la muestra.

10.2 Interferencias

La sobreposición de estructuras y/o detritus no eliminado en el sedimento, puede dificultar su lectura. En tal caso, es importante dividir el volumen en las alícuotas que se consideren necesarias. La falta de experiencia en la identificación de especies es también un elemento decisivo en el conteo y sobreconteo.

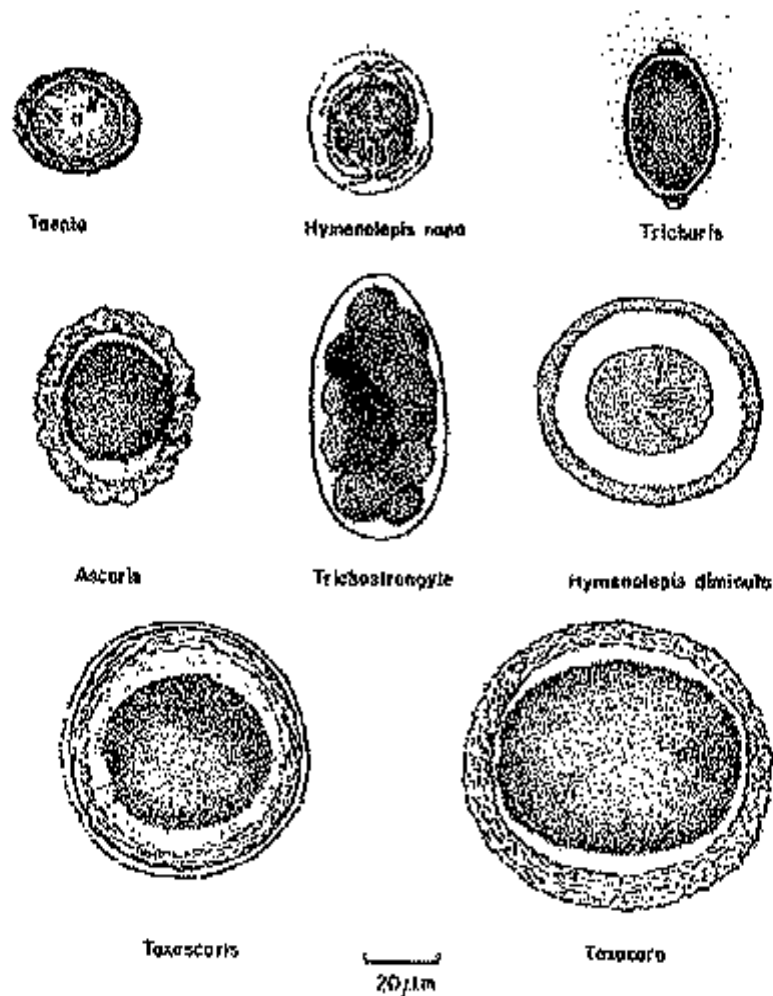


FIGURA 1.- Especies de huevos de helminto

11 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba debe incluir lo siguiente:

- Todos los detalles necesarios para la identificación completa de la muestra;
- Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el punto 10, y
- Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

12 BIBLIOGRAFÍA

- 12.1 NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.
- 12.2 Ayres, R. M., *A Practical Guide for the Enumeration of Intestinal Helminths in Raw Wastewater and Effluent from Waste Stabilization Ponds*. (Guía práctica para la enumeración de helmintos intestinales en aguas residuales y efluentes provenientes de estanques residuales de estabilización). Leeds University Departament of Civil Engineering. 1989, 19 pp.
- 12.3 CETESB, São Paulo, *Helminhos e Protozoários Patógenos Contagem de Ovos e Cistos em Amostras Ambientais* (Helmintos y protozoarios patógenos presentes en huevos y quistes en muestras ambientales). 1989, 33 pp.
- 12.4 Cifuentes, E., U. Blumenthal, P. G. Ruiz y S. Bennett. Health Impact Evaluation of Wastewater Use in Mexico. (Evaluación del impacto en la salud de las aguas residuales utilizadas en México) *Public Health Rev.* 1991/92 19:243-250.
- 12.5 De León, R., P. Ch. Gerba y B. J. Rose, *Manual de Vigilancia de Parásitos en el Agua*. Universidad de Arizona EEUU. 1988, 48 pp.
- 12.6 Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE), *Diagnóstico Parasitológico*. 1993, Capítulo IV-6, 1-43 p.
- 12.7 Jiménez, B. y C. Maya, *Evaluación de las diversas técnicas para la detección de los huevos de helminto, y selección de una para conformar la NMX correspondiente*. Instituto de Ingeniería, UNAM, México, 1996.
- 12.8 Lamothe, R. y P. L. García, *Helminths del Hombre en México-Tratamiento y Profilaxis*. Edit. AGT, 1988, 25-98 pp.
- 12.9 Martínez, B. M., *Manual de Parasitología Médica*. Edit. La Prensa Médica Mexicana, 1986, 183-316 p.
- 12.10 Organización Mundial de la Salud, *Guías para la calidad del agua potable*. 1995, Vol. 1, 2a. Edic., España.
- 12.11 Satchwell, G. M., An Adaptation of Concentration Technique for the Enumeration of Parasitic Helminth Eggs from Sewage Sludge (Adaptación de la técnica de Concentración para la enumeración de huevos de helminto parásitos provenientes de lodos residuales). *Water Res.* 1986, 20:813-816.
- 12.12 Schwartzbrod, J., L. Stien, K. Bouhoum y B. Baleux., Impacto del Tratamiento de Agua Residual sobre Huevos de Helminto. *Water Sc. Techn.* 1989, 21:295-297.

13 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no equivale a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

**MÉXICO, D.F. A
LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS.**

CARMEN QUINTANILLA MADERO