



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-113-SCFI-2008

**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE
HELMINTO - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-
113-SCFI-1999)**

**ANALYSIS OF WATER - DETERMINATION OF HELMINTH EGGS -
TEST METHOD**



P R E F A C I O

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

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASESORÍA TECNOLÓGICA EN CUERO Y CALZADO, A.C. (CIATEC)
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- GRUPO ECOTEC, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB, Q.F.B. MARTHA ELENA IZAGUIRRE VILLANUEVA
- INTEMA, S.A. DE C.V.
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.
Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental (CITSA)



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUIMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUIMICO INDUSTRIAL.
- LABORATORIOS ABC QUIMICA, INVESTIGACION Y ANALISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO PAJARITOS
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- CÉSAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA / SERVICIOS AMBIENTALES
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERIA Y CONSULTORIA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL



**SECRETARÍA DE
ECONOMÍA**

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología

INDICE DE CONTENIDO

Número de capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	PRINCIPIO	2
3	REFERENCIAS	2
4	DEFINICIONES	2
5	REACTIVOS Y MATERIALES	3
6	EQUIPO	5
7	RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	5
8	CONTROL DE CALIDAD	6
9	PROCEDIMIENTO	6
10	CÁLCULOS	9
11	INTERFERENCIAS	9
12	MANEJO DE RESIDUOS	11
13	VIGENCIA	11
14	BIBLIOGRAFÍA	11
15	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	12

PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-113-SCFI-2008

ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTO - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX- AA-113-SCFI-1999)

ANALYSIS OF WATER - DETERMINATION OF HELMINTH EGGS - TEST METHOD

0 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 estadíos 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 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.

3 REFERENCIAS

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

NOM-001-SEMARNAT-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-SEMARNAT-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.

4 DEFINICIONES

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

4.1 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.



4.2 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.

4.3 Filtración

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

4.4 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.

4.5 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.

4.6 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.

4.7 Sedimentación

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

5 REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 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 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

5.2 Materiales

- Aplicadores de madera;
- Barras magnéticas;
- Bulbo de goma;
- Espátula;
- Garrafrones de plástico inerte con paredes lisas de 5 a 8 L de capacidad;
- Gradillas para tubos de centrífuga 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.
- Tamiz de aproximadamente 160 μm (micras) de poro;
- Tubos de centrífuga de 200 mL, 450 mL o de mayor volumen según sea la capacidad máxima de la centrífuga;
- Tubos de centrífuga cónicos de 50 mL, y
- Vasos de precipitados de 1 000 mL.
- Celda de Sedgwich-Rafter o cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer;
- 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 a 4) °C

5.3 Preparación de soluciones

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

Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 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.

5.3.2 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.

6 EQUIPO

- Agitador de tubos, con control de velocidad y adaptable a diversos tubos
- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Bomba de vacío
- Centrífuga. Capaz de mantener los intervalos de operación de 1 000 r/min a 3 000 r/min o su equivalente en g
- Incubadora
- Microscopio óptico. Equipado para hacer iluminación campo claro (Köhler), con aumento de 10 a 100x y platina móvil (opcional)
- Parrilla con agitación magnética

7 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- 7.1 Preparar garrafones de plástico inerte de entre 5 a 8 L, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 10 % (NaClO).
- 7.2 Lavarlos con agua potable a chorro y enjuagarlos varias veces con agua destilada.
- 7.3 Se toman muestras de 5 L (volumen total), en estos garrafones de plástico inerte, los cuales deben ser cerrados y sellados.
- 7.4 Las muestras deben mantenerse en hielo a una temperatura no mayor de $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ hasta su llegada al laboratorio.
- 7.5 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.



8 CONTROL DE CALIDAD

- 8.1 Cada laboratorio que utilice este método está obligado a mantener un programa de control de calidad (CC) formal.
- 8.2 Es obligatorio para el laboratorio mantener los siguientes registros: Los nombres y títulos de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis.

- Las bitácoras del analista y del equipo en los que se contengan los

siguientes datos:

- a) Identificación de la muestra;
- b) Fecha del análisis;
- c) Procedimiento cronológico utilizado;
- d) Cantidad de muestra utilizada;
- e) Número de muestras de control de calidad analizadas;
- f) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados;

De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada medición mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

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.

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.

DGN

9.1 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. 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 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 centrífuga 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.

9.2 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 géneros identificadas con ayuda de la figura 1.



10 CÁLCULOS

- 10.1 Para determinar las revoluciones por minuto (rev/min) de la centrífuga, 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 centrífuga 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 (números enteros), 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.

11 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.

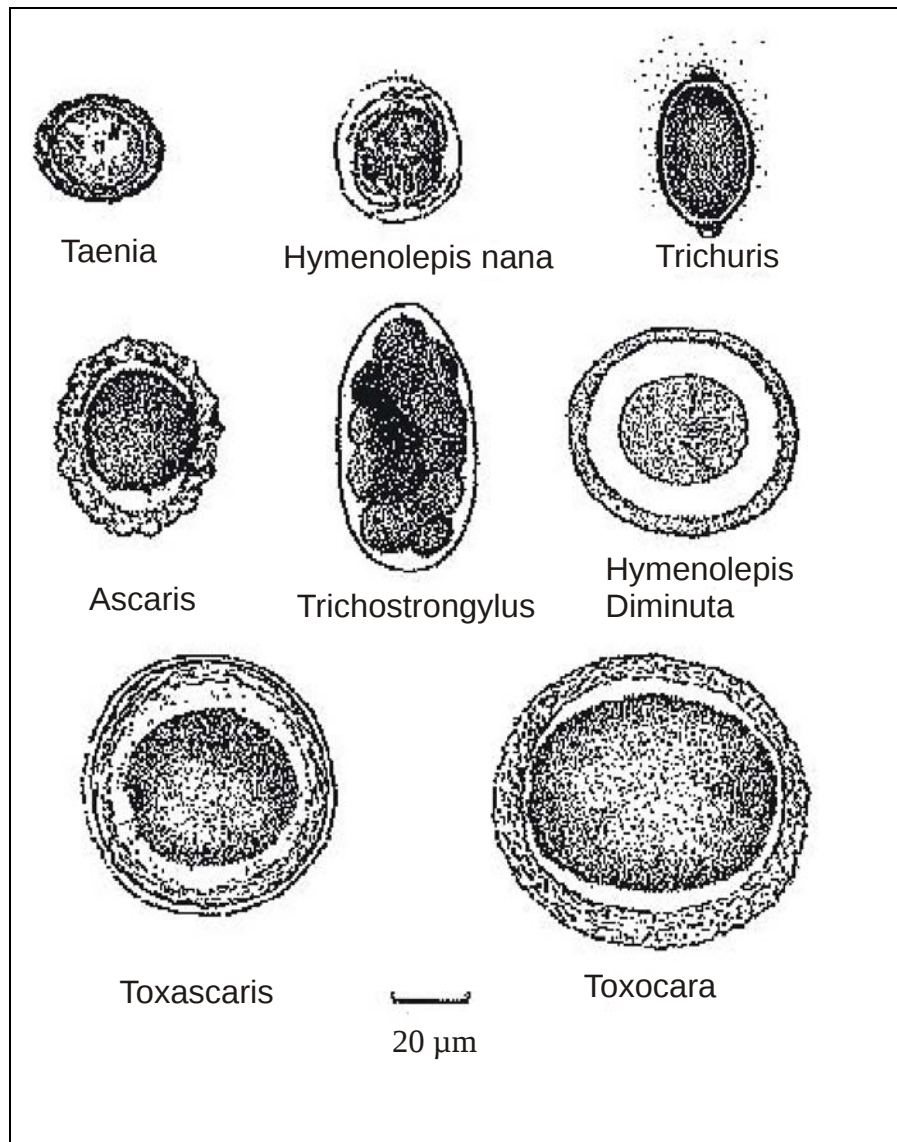


FIGURA 1.- Especies de huevos de helminto



12 MANEJO DE RESIDUOS

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

13 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

14 BIBLIOGRAFÍA

- 14.1 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.
- 14.2 CETESB, São Paulo, *Helminhos e Protozoários Patogênicos Contagem de Ovos e Cistos em Amostras Ambientais* (Helmintos y protozoarios patógenos presentes en huevos y quistes en muestras ambientales). 1989, 33 pp.
- 14.3 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 Healt Rev.* 1991/92 19:243-250.
- 14.4 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.
- 14.5 Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE), *Diagnóstico Parasitológico*. 1993, Capítulo IV-6, 1-43 p.
- 14.6 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.

- 14.7 Lamothe, R. y P. L. García, *Helminthos del Hombre en México-Tratamiento y Profilaxis*. Edit. AGT, 1988, 25-98 pp.
- 14.8 Martínez, B. M., *Manual de Parasitología Médica*. Edit. La Prensa Médica Mexicana, 1986, 183-316 p.
- 14.9 Organización Mundial de la Salud, *Guías para la calidad del agua potable*. 1995, Vol. 1, 2a. Edic., España.
- 14.10 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.
- 14.11 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.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no coincide con ninguna norma internacional por no existir norma internacional sobre el tema tratado.

México D.F., a

**DR. FRANCISCO RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**