SECRETARÍA DE ECONOMÍA

NORMA MEXICANA

NMX-AA-113-SCFI-2012

ANÁLISIS DE AGUA – MEDICIÓN DEL NÚMERO DE HUEVOS DE HELMINTO EN AGUAS RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS POR OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-113-SCFI-1999)

ANALYSIS OF WATER - DETERMINATION OF THE NUMBER OF HELMINTH EGGS IN WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS BY MICROSCOPIC EXAMINATION - TEST METHOD

PREFACIO

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.
- CENICA
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CIATEC, A.C.
- 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
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C. Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental (CITSA)

- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
  Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA
  División de Ciencias Biológicas y de la Salud
  Ciencia y Tecnología Ambiental
  Depto. Biotecnología

- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
  UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos

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

ÍNDICE DE CONTENIDO

Número de capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	2
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	5
9	PROCEDIMIENTO	6
10	CÁLCULOS	8
11	INTERFERENCIAS	9
12	MANEJO DE RESIDUOS	9
13	VIGENCIA	9
14	BIBLIOGRAFÍA	10
15	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	11

SECRETARÍA DE ECONOMÍA

NORMA MEXICANA

NMX-AA-113-SCFI-2012

ANÁLISIS DE AGUA – MEDICIÓN DEL NÚMERO DE HUEVOS DE HELMINTO EN AGUAS RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS POR OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-113-SCFI-1999)

ANALYSIS OF WATER - DETERMINATION OF THE NUMBER OF HELMINTH EGGS IN WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS BY MICROSCOPIC EXAMINATION - TEST METHOD

0 INTRODUCCIÓN

Ante la escasez de recursos hídricos, la explosión demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales tratadas 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 aquellos que se consumen crudos (sin procesos de cocción) 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 cuantificación e identificación de huevos de helminto en aguas residuales y residuales tratadas con el fin de evaluar la calidad del agua y la eficiencia de los sistemas de tratamiento de la misma. Es de aplicación nacional.

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 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:

NMX-AA-089/1-SCFI-2010	Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 2011.
NMX-AA-089/2-1992	Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 2. Declaratoria de vigencia publicada en el diario Oficial de la Federación el 24 de marzo de 1992.

4 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las normas mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI-2010 y NMX-AA-089/2-1992, vigentes y se establecen las siguientes:

4.1 Flotación de huevos de Helminto:

Es la técnica de concentración donde las partículas de interés permanecen en

la superficie de la Disolución cuya densidad es mayor. Por ejemplo, la densidad de huevos de helminto se encuentra entre 1,05 g/mL y 1,18 g/mL, y la de los líquidos de flotación se sitúa entre 1,1 g/mL y 1,4 g/mL.

4.2 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 estadíos que incluye hasta tres huéspedes diferentes.

4.3 Técnica bifásica:

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

4.4 Sedimentación de huevos de helminto:

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

5 REACTIVOS Y MATERIALES

Todos los reactivos deben ser grado analítico salvo indicación contraria

5.1 Reactivos (grado analítico)

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- Alcohol etílico (C_2H_5OH);
- Agua destilada;
  Acetato de etilo;
- Hipoclorito de sodio o calcio aproximadamente al 6 % (de concentración comercial), y
- Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$).

5.2 Materiales

- Aplicadores de madera;
- barras magnéticas;
- bulbo de goma;
- espátula;
- garrafones de plástico rígido de 5 L o de mayor capacidad;
- gradillas para tubos de centrífuga;
- 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 rígido con capacidad de 1 a 2 L;
- tamiz de 150-170 μm;
- tubos de centrífuga de acuerdo a las características de la centrífuga;
- vasos de precipitados de acuerdo a la capacidad requerida;
- celda de Sedgwich-Rafter o cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer o alguna cámara de conteo celular equivalente, y
- densímetro (hidrómetro), con intervalo de medición de 1,0 g/mL a 1,4 g/mL; o picnómetro.

5.3 Preparación de disoluciones

5.3.1 Disolución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) con gravedad específica de 1,3 g/mL

Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$) en 1 000 mL de agua destilada; mezclar hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro o picnómetro. Ajustar la densidad a 1,3 g/mL ± 0,1 g/mL agregando sulfato de zinc o agua destilada, según sea el caso.

5.3.2 Disolución de alcohol-ácido.

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

6 EQUIPO

- Agitador de tubos (opcional);
- Balanza granataria;
- Bomba de vacío;
- Centrífuga, capaz de mantener los intervalos de operación de 400 G a 1000 G o su equivalente en rpm;
- Microscopio óptico. Equipado para iluminación en campo claro (Köheler), con aumento de 10x a 100x y platina móvil, y
- Parrilla con agitación magnética (opcional).

NOTA 1: G es la fuerza relativa de la centrifugación (véase 10.1)

7 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

7.1 Preparar los garrafones desinfectados previamente con una disolución de hipoclorito de sodio o de calcio comercial aproximadamente al 6 % (NaClO ó $Ca(ClO)_2$).

7.2 Lavar los garrafones de plástico rígido con agua y enjuagarlos varias veces con agua destilada.

7.3 Se toman muestras de aproximadamente 5 L, en estos garrafones, los cuales deben tener tapa hermética.

7.4 Las muestras deben mantenerse a una temperatura de 4 ºC ± 2 ºC hasta su llegada al laboratorio.

7.5 Las muestras se deben procesar dentro de las 48 h después de su toma, o en caso contrario deben preservarse en refrigeración para realizar su análisis antes de 2 meses.

8 CONTROL DE CALIDAD

8.1 Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad en referencia a la norma NMX-AA-115-SCFI-2001. 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

Antes de iniciar el procedimiento, es necesario tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

Durante el procesado de la muestra se deben utilizar lentes de seguridad, guantes de látex y aplicar medidas para evitar cualquier riesgo de infección.

Lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista después del ensayo.

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:

Dejar reposar la muestra al menos 3 h, o centrifugar a 400 G de 3 min a 5 min.

Aspirar por vacío o por decantación lenta sin agitar cuidando siempre la integridad del sedimento, desechar el sobrenadante.

Filtrar el sedimento a través del tamiz (150 μm-170 μm).

Lavar el tamiz con 5 L de agua (potable o destilada), y recuperar el agua de lavado junto con el sedimento filtrado.

Colocar el filtrado y el agua de enjuague en el garrafón donde originalmente se encontraba la muestra o en los recipientes utilizados para la centrifugación.

Dejar reposar la muestra al menos 3 h o centrifugar a 400 G de 3 min a 5 min.

Aspirar o decantar con cuidado todo el sobrenadante y desecharlo.

Depositar el sedimento en los recipientes para la centrífuga.

Enjuagar 3 veces el garrafón perfectamente con suficiente agua potable o destilada, y colocar en los recipientes para centrifugación.

Centrifugar a 400 G de 3 min a 5 min.

Decantar o aspirar nuevamente el sobrenadante por vacío. Asegurarse que en el fondo del recipiente se encuentre el paquete sólido (sedimento); en caso contrario, centrifugar nuevamente.

Resuspender el paquete sólido en 150 mL de la disolución de sulfato de zinc.

Homogeneizar el paquete sólido con el agitador de tubos o con un aplicador de madera.

Centrifugar a 1000 G de 3 min a 5 min, y recuperar el sobrenadante vertiéndolo en un recipiente de plástico.

Diluir cuando menos en 1 000 mL de agua destilada, y dejar sedimentar al menos 3 h o centrifugar a 400 G de 3 min a 5 min.

Decantar o aspirar por vacío con cuidado todo el sobrenadante, y resuspender el paquete sólido por agitación utilizando suficiente agua potable o destilada.

Verter la suspensión resultante en un tubo de centrífuga, incluyendo el agua de enjuague del recipiente y centrifugar a 400 G durante 3 min.

Decantar o aspirar por vacío el sobrenadante y resuspender el paquete sólido con agua destilada en un tubo y centrifugar a 400 G durante 3 min.

Decantar o aspirar por vacío el sobrenadante, resuspender el paquete sólido en 15 mL de la disolución de alcohol-ácido por medio de un agitador de tubos, y agregar 10 mL de acetato de etilo.

Agitar suavemente y de vez en cuando destapar cuidadosamente los tubos para dejar escapar el gas que se desprenda. Por seguridad realizar esta operación en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción.

Centrifugar a 660 G durante 3 min.

Aspirar el sobrenadante, dejando menos de 1 mL del mismo y evitando la pérdida del paquete de sólidos.

Homogeneizar el paquete, y proceder a la cuantificación.

9.2 Cuantificación de los huevos de helminto

- Para evitar la superposición de las estructuras y de residuos no eliminados, repartir el paquete obtenido en 9.1, en alícuotas de 0,1 mL a 1,0 mL con el fin de facilitar el conteo. Distribuir cada alícuota en una celda de Sedgwich-Rafter, o bien, en una cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer. Se debe examinar la totalidad del paquete obtenido.

- Identificar visualmente una a una las estructuras, anotando los géneros encontrados con ayuda de bibliografía especializada.

- Utilizar la técnica de conteo adecuada al número de huevos de helminto presentes en la muestra.

10 CÁLCULOS

10.1 Para calcular las revoluciones por minuto (rpm) de la centrífuga, se utiliza la fórmula siguiente:

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{K \cdot G}{r}}$$

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:

$$\mathbf{G} = r(\text{rpm})^2/K$$

10.2 Expresar el resultado en número de huevos por litro (números

enteros), según la siguiente fórmula:

$$H_L = \frac{\mathbf{H}}{\mathbf{5}}$$

Donde:

H es el número de huevos contados en la muestra;

H_L es el número de huevos por litro, y

5 es el volumen de la muestra.

NOTA 2: En el caso de que el resultado de la fórmula anterior sea menor de 1, se debe reportar 1 H/L.

En caso de que existan fracciones mayores a 1 H/L se deberá redondear al entero inmediato superior.

11 INTERFERENCIAS

La superposición de estructuras y/o detritus no eliminados en el sedimento, puede dificultar el conteo. En tal caso, es importante dividir el volumen en las alícuotas que se consideren necesarias. La falta de experiencia en la identificación de géneros es también un elemento decisivo en el conteo adecuado.

12 MANEJO DE RESIDUOS

Se recomienda que todos los residuos generados durante las diferentes etapas de la prueba, sean previamente desinfectados con disolución de hipoclorito de sodio o de calcio al 6% comercial antes de su disposición final.

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

- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.

- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales – Muestreo - Declaratoria de vigencia publicada en el diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.

- Ash, L. R. y Orihel, T. C. Atlas of Human Parasitology, 3rd ed. ASCP, Chicago, IL, USA, 1990.

- 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, Department of Civil Engineering.1989, 19 pp.

- CETESB, Sâo Paulo, Helmintos e Protozoarios Patôgenicos Contagem de Ovos e Cistos en Amostras Ambientais (Helmintos y protozoarios patógenos presentes en huevos y quistes en muestras ambientales). 1989, 33 pp.

- 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.

- 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.

- Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE), Diagnóstico Parasitológico. 1993, Capítulo IV-6, 1-43 p.

- 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.

- Lamothe, R. y P. L. García, Helmintos del Hombre en México-Tratamiento y Profilaxis. Edit. AGT, 1988, 25-98 pp.

- Martínez, B. M., Manual de Parasitología Médica. Edit. La Prensa Médica Mexicana, 1986, 183-316 p.

- Organización Mundial de la Salud, Guías para la calidad del agua potable. 1995, Vol. 1, 2a. Edic., España.

- 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.

- 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

El Director General, **CHRISTIAN TURÉGANO ROLDÁN**.- Rúbrica.