

Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Efecto de agregados minerales sobre la viabilidad de huevos de helminto (*Toxocara canis*)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
RODRÍGUEZ TOLEDANO DAISY NAYELI

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
ASESOR INTERNO: BIÓL. RAÚL ARCOS RAMOS



México, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Reconocimientos

El trabajo de investigación de la presente tesis, fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce el apoyo recibido por el PAPIME PE-205706 “Desarrollo de prácticas avanzadas para la enseñanza de la microbiología Ambiental”, PAPIIT IN 107209-3 “Desarrollo de un humedal artificial de alta eficiencia para la remoción de contaminantes orgánicos y microorganismos patógenos” y PAIP 6190-14 (VMLP 2008-2009) para la obtención de los materiales y reactivos empleados en la fase de experimentación.

Agradecimientos.

A Dios por brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta en compañía de personas maravillosas.

Al Dr. Víctor M. Luna Pabello, con gran admiración y agradecimiento por su paciencia y tiempo que dedico a dirigir este trabajo.

A Pati por asesorarme y ayudarme en cada etapa de este trabajo, también gracias por brindarme tu amistad.

A la profesora Lupita y al profesor Luciano por sus atinados comentarios que enriquecieron esta trabajo.

A cada uno de mis sinodales Biol. Maria del Carmen Salgado Merediz, M. en C. Marisela Valdés Ruiz, Biol. Raúl Arcos Ramos y Q. Martha Ortiz Rojas, por sus comentarios y sugerencias, que permitieron mejorar este trabajo.

De la FES a Diana, Carmina, Dulce, Edmundo, Soledad, Roberto, Eduardo, Juan, Viridiana, Belem y Luz Verónica, por todos los momentos que compartimos, y por brindarme su bella amistad.

Del LMBE a Gabriela, Ernesto, Lyenet, Pavel, Patricia, Verónica, Toño y Jacob, hicieron que este proceso fuese más agradable, y no olvido todas las veces que estuvieron conmigo en la buenas y las malas.

A todos mis compañeros de Universum y del Museo de la Luz en especial a Cristal, Fernanda, Dayenari, Gabi, Maga, Martha y Nanhoel por estar y formar parte de una etapa muy importante, la cual cambio mi vida, y me hizo crecer para mejorar, se los agradezco.

A todas las personas que de una u otra forma, hicieron posible este sueño. Así como a todas aquellas que colocaron piedras en mi camino, las cuales me enseñaron a salir adelante.

Dedicatorias

A mis padres, Juanita Toledano Amaro y Sergio Rodríguez Rosales, por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, su amor y su confianza, espero algún día devolver un poco de todo lo que me han dado, los amo.

A mis hermanos: Elizabeth, Tania, Sergio y Enrique, por tolerar cada uno de mis errores y por su cariño incondicional. Elizabeth, nunca dejes de luchar incansablemente por tus sueños, eres una de las personas más capaces que conozco. Tania, por desvelarte conmigo, escucharme, y ayudarme en todo, eres excepcional sólo debes creértela. Sergio y Enrique, son los mejores hermanos, gracias por su enorme amor, y deben saber que me siento muy orgullosa de ustedes.

A mi sobrina Amaité, aunque eres muy pequeña, debes saber que eres lo más hermoso que ha llegado a nuestra familia, gracias por el simple hecho de existir.

A mi tío Mario, por darme uno de los mejores ejemplos de entrega y superación.

A mis compañeros y amigos los cuales considero parte muy importante en mi vida, gracias por compartir su tiempo y espacio conmigo, los quiero!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
2 MARCO TEÓRICO	4
2.1 Problemática de salud por enfermedades hídricas	4
2.1.1 Aspectos generales de la desinfección	4
2.1.2 Cloro	5
2.1.3 Luz ultravioleta	6
2.1.4 Ozono	8
2.2 Efectos de metales en microorganismos	9
2.2.1 Plata	9
2.2.2 Cobre	10
2.2.3 Hierro	10
2.3 Generalidades de los helmintos	11
2.3.1 Nematelmintos	11
2.4 Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	12
3 OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	14
3.1 OBJETIVOS	14
3.1.1 Objetivo general	14
3.1.2 Objetivos particulares	14
3.2 Hipótesis	14
3.3 Justificación	15
3.4 Estrategia de trabajo	16
3.4.1 Diagrama de la metodología experimental general	16
3.4.2 Primera etapa experimental	17
3.4.3 Segunda etapa experimental	18
3.5 Tercera etapa experimental	19
4 MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1 Primera etapa experimental	20
4.1.1 Obtención de los huevos de helminto (HH)	20
4.1.2 Cuenta y determinación de viabilidad	21
4.2 Segunda etapa experimental	22
4.3 Tercera etapa experimental	23
5 RESULTADOS	24
5.1.1 Viabilidad	24

5.2	Pruebas con Ag.....	24
5.3	Pruebas con Cu.....	25
5.4	Pruebas con Fe.....	26
5.5	Pruebas con Cu/Ag.....	26
5.6	Pruebas con AM (agregado mineral).....	28
5.7	Pruebas con FeS, Fe ₂ O ₃ , Cu ₂ O, Ag ₂ O, Fe ₂ SO ₄ , y CuSO ₄	29
5.8	Graficas de viabilidad de los huevos de helminto con los distintos metales a diferentes tiempos.....	31
5.9	Tablas de los resultados.....	34
5.10	Análisis estadístico.....	46
5.11	Análisis de varianza comparando entre minerales en todas las concentraciones y tiempos.....	46
5.12	Análisis de varianza comparando entre concentraciones en todos los minerales y todos los tiempos.....	47
5.13	Análisis de varianza comparando entre tiempos con todos los minerales en todas las concentraciones.....	47
6	CONCLUSIONES.....	48
7	LITERATURA CITADA.....	49
8	ANEXOS.....	52
8.1	Técnica para la determinación y cuantificación de huevos de helminto.....	52
8.2	Método de Flotación por la técnica de Faust.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3-1.- Diagrama general experimental.....	16
Figura 3-2. Diagrama de la obtención y determinación de la viabilidad de los huevos de helminto antes de los tratamientos con los agregados	17
Figura 3-3. Diagrama de la metodología usada en la exposición a los metales	18
Figura 3-4. Diagrama de la metodología realizada después de la incubación.....	19
Figura 4-1.- Obtención de huevos de helminto	20
Figura 4-2.- División en bloques de 10 H.H.....	22
Figura 5-1.- Comparación entre minerales	31
Figura 5-2 Comparación entre tiempos	31
Figura 5-3 Comparación entre concentraciones	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de los elementos presentes en el Agregado mineral	28
Tabla 2. Ag 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min	34
Tabla 3. Cu 0.01g/ml a 30,60 y 90 min	35
Tabla 4. Cu 0.05g/ml a 30, 60 y 90 min	36
Tabla 5. Cu 0.1g/ml a 30, 60 y 90 min	37
Tabla 6. Fe 0.01 g/ml a 30,60 y 90 min	38
Tabla 7. Fe 0.05g/ml a 30, 60 y 90 min	39
Tabla 8. Fe 0.1 g/ml a 30, 60 y 90 min	40
Tabla 9. Agregado mineral a 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min	41
Tabla 10. FeS 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min.....	42
Tabla 11. CuSO4 0.01g/ml a 30, 60 y 90 min	43
Tabla 12. Ag/Cu 0.05 g/ml a 30, 60 y 90 min	44
Tabla 13. Capacidad de inactivación de los distintos metales probados	45

RESUMEN

La desinfección es un proceso de gran importancia en el tratamiento de aguas residuales para su posterior reutilización, ya que existen microorganismos presentes en el agua residual que resultan dañinos para la salud pública. La elección de un buen desinfectante es una decisión difícil, pues se tiene que tener en cuenta que los microorganismos tienen diferentes susceptibilidades, además de los costos que genera el proceso de desinfección. Por lo anterior, el estudio de los metales como método de desinfección es un campo interesante por explorar.

En este trabajo se evaluó el efecto de los metales Ag, Cu y Fe (en forma de granalla), sobre la viabilidad de los huevos de helminto (*Toxocara canis*) a concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 g/ml y tiempos de contacto de 30, 60 y 90 minutos. Para la determinación de la viabilidad de los huevos de helminto (HH), se usó la metodología mencionada en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Los resultados obtenidos, evidencian que el Cu, Ag, Cu/Ag y el agregado mineral provocan la pérdida total de viabilidad de los HH en las concentraciones empleadas. Mientras que en las muestras en las que se aplicó Fe solo o en combinación con los otros dos metales, se presenta viabilidad de HH en diferentes porcentajes. En consecuencia, se puede afirmar que los metales usados ejercen un efecto negativo en la viabilidad de HH, aparentemente asociada con la afectación directa a la estructura de las capas que los protegen.

La secuencia de inactivación observada fue la siguiente: AM, Ag/Cu > Ag > Cu > Ag₂O > CuSO₄ > Cu₂O > Fe > FeS > Fe₂O₃ > Fe₂SO₄.

1 INTRODUCCIÓN

La reutilización de aguas residuales es una necesidad, pero éstas no tienen un proceso adecuado para su reuso. Lo anterior debido a que poseen un alto contenido de materia orgánica e inorgánica contaminante, la cual es un problema muy grave tanto para la salud humana como para el ambiente (Rojas, 1998; Garza, 2000).

Los suelos, al ser regados con esta clase de aguas no tratadas correctamente, pueden adquirir contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos tóxicos y microorganismos patógenos. Estos últimos son de gran importancia para la salud pública ya que transmiten enfermedades al ser humano y a los animales (Escalas, 2006).

En México, existen numerosas comunidades de escasos recursos, la mayoría de las cuales no poseen un sistema de tratamiento de aguas. Aunado a esto, los métodos convencionales resultan costosos. Es por ello, que en caso de necesidad de irrigación, las comunidades campesinas, se ven orilladas a utilizar aguas residuales sin tratar para irrigar sus cultivos.

Según Garza (2000), a principios de los años noventa, el instituto Nacional de Ecología (INE) estimaba que el 44.3% de las aguas residuales municipales sin tratamiento alguno se empleaban en el riego agrícola.

En este contexto, una opción para reducir costos tratamiento la representan los humedales artificiales (HA). Los HA están constituidos básicamente por tres componentes: 1) Plantas vasculares; 2) el lecho de empaque o medio de soporte de plantas y 3) microorganismos adheridos al medio de soporte y asociados a la rizósfera (Miranda, 2000). La importancia y trascendencia de estos sistemas radica fundamentalmente en que son más baratos y se adapta mejor a las condiciones climáticas de México. También se pueden combinar con otros sistemas de tratamiento existentes para optimizar su rendimiento. Los HA son sistemas altamente eficientes para eliminar bacterias y amebas patógenas de las aguas en tratamiento (Rivera y Calderón, 1993). A pesar de que los HA logran la disminución de gran parte de los microorganismos patógenos, se requiere de un paso adicional de desinfección para cumplir con la normatividad ambiental en materia de descarga de aguas residuales o para el reuso de las mismas. En este sentido, la desinfección constituye un proceso indispensable. Este proceso tiene por objetivo principal eliminar del agua los

microorganismos patógenos para el ser humano. Existe una variedad importante de métodos de desinfección que dependen del destino del agua tratada y del volumen de agua a tratar (Guimaraes *et al*, 2007; Maskew *et al* 1996).

El método más utilizado es sin duda el de cloración. No obstante, la aplicación excesiva de cloro (aprox. 2mg/L) a un determinado volumen de agua que contiene materia orgánica, puede originar la formación de subproductos indeseables, como los trihalometanos, los cuales presentan propiedades cancerígenas (Cáceres en Núñez *et al.*, 2005 y Castillo *et al*, 1997).

Una opción de desinfección de aguas residuales, interesante de explorar, es el uso de metales pesados. Este método no es nuevo en sí, se empleaba para la preservación del agua y evitar la presencia de microorganismos patógenos. En este sentido, se sabe que desde la antigüedad, los fenicios introducían monedas de plata en las ánforas de cerámica y cobre, para conservar el agua de consumo humano. Asimismo, en América, durante la colonización del antiguo oeste, también existía la costumbre de introducir un dólar de plata para la conservación del agua en barriles o ánforas de agua (Sánchez, 2004; Nies, 1999).

Por lo anterior, el presente trabajo está orientado a determinar la capacidad desinfectante de agregados minerales que contienen Ag, Cu y Fe sobre huevos de *T. canis*.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Problemática de salud por enfermedades hídricas

Nuestra sociedad en la actualidad da al agua un uso excesivo, pues cada persona en promedio ocupa más de 100 litros de agua diariamente, lo que desencadena en descargas a cuerpos receptores o en el mar, esto sobrepasa la capacidad de la naturaleza para que el agua tenga un proceso de autopurificación. (Miranda, 2000 y Torres, 1999)

Las aguas no tratadas pueden provocar distintos problemas de salud pública (enfermedades infecciosas intestinales) y afectar la vida acuática (poca o nula reproducción y muerte).

Los microorganismos que se hallan en el agua residual, suelo y bulbo, tales como bacterias coliformes (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) cocos (*Streptococcus faecalis* y *E. zymogenes*), pseudomonas (*Pseudomonas sp.*), salmonelas (*Salmonella typhi*) junto con huevos de helmintos y virus, generan infecciones gastrointestinales entre las que se encuentran diarreas, fiebre tifoidea y parasitismo por helmintos (Niedrum en García 2006).

En el 2000 en nuestro país la población era de 97.3 millones de habitantes, la tasa de mortalidad por diarreas ocasionadas por agentes infecciosos potencialmente hidrotansmisibles para niños menores de cinco años correspondía a 33.3 muertes por cada 100, 000 lo que representa que diariamente mueren por este concepto 14 niños (Ayala, 2007 y Rojas en García 2006).

La norma mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 establece los máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (Tesillos, *et al* 2007).

2.1.1. Aspectos generales de la desinfección

Los distintos procesos de desinfección utilizados actualmente en plantas potabilizadoras y en plantas depuradoras de aguas residuales presentan ventajas e inconvenientes al compararlos unos con otros.

Desde los inicios de la desinfección, su objetivo principal ha sido la eliminación de las epidemias hídricas por medio de la eliminación selectiva de bacterias indicadoras. Sin embargo, esta tendencia se ha visto modificada debido a dos descubrimientos hechos en los años 1970's y que han originado una reevaluación significativa de las prácticas establecidas para la desinfección (Ramalho, 1996).

El primer descubrimiento fue que los productos de desinfección pueden ser dañinos para el ser humano y que éstos se forman por reacción entre los diferentes desinfectantes y la materia orgánica contenida en el agua. El segundo descubrimiento fue la detección de nuevos microorganismos que no son eficazmente controlados por los procedimientos de desinfección tradicionales. Este último punto pone en evidencia que el uso de organismos indicadores discretos no es suficiente como prueba para asegurar una activación de un amplio intervalo de microorganismos patógenos. El control de estos problemas de salud pública demanda un alto nivel de comprensión de la desinfección y en muchos casos, se requieren estudios de laboratorio para el diseño y aplicación de este proceso.

La desinfección se realiza por dos métodos generales: los físicos y los químicos. Históricamente, el cloro fue el desinfectante principal de los métodos químicos que se usaba en las plantas de tratamientos en todo el mundo. La desinfección con cloro ha dado y continúa dando buenos resultados en términos generales de eliminación o inactivación de microorganismos patógenos.

2.1.2. Cloro

El bacteriólogo alemán Robert Koch (1881) demostró, bajo condiciones controladas de laboratorio, que el hipoclorito podía eliminar cultivos puros de bacterias. En los años cuarenta inicia la realización de una investigación sobre la desinfección de cloro, con gran énfasis sobre las bacterias. Las observaciones que se obtuvieron fueron: 1) Las células bacterianas tratadas con cloro, liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio, 2) las funciones de la membrana como la respiración y el transporte activo, resultan más afectadas por el cloro que los procesos citoplasmáticos, a partir de estos resultados los investigadores dirigieron su atención a la superficie de la célula bacteriana. La hipótesis que surgió fue que, bajo una presión ambiental, la pared de la célula bacteriana podía interactuar con el cloro. La exposición al cloro parece causar alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared de la célula. Al perder su estructura de esta

barreraprotectora, concluyen todas las funciones vitales, dando como resultado la muerte del microorganismo, lo que significa que pierde la capacidad de causar alguna enfermedad.

El beneficio principal del agua potable clorada es la protección de la salud pública a través del control de las enfermedades transmitidas por el agua. La cloración desempeña una función esencial en el control de agentes patógenos presentes en el agua.

El cloro es un oxidante fuerte que además de desinfectar, permite la remoción del color, hierro y manganeso y en ciertos casos reduce sabor y olor. En la operación de plantas de tratamiento, la precloración elimina las algas que se desarrollan en sedimentadores no cubiertos y permite el control de microorganismos que crecen en los filtros de arena. La precloración también oxida la materia orgánica que interfiere o inhibe la coagulación-floculación, permitiendo mejorar este último proceso (Romero, 2005).

Uno de los problemas que presenta el cloro es que se combina con las sustancias orgánicas naturales que puedan estar presentes en el agua para formar trihalometanos (THM), entre ellos cloroformo (carcinógeno).

Además del cloro gaseoso se utilizan sus derivados entre los que se encuentran los hipocloritos de sodio y calcio, el dióxido de cloro y las cloraminas.

El cloro y sus derivados no permiten sin embargo la eliminación de los virus del cólera y de la *Giardia lamblia*, por lo que a pesar de que el número de epidemias mundiales de origen hídrico disminuyó de 45 por cada 100,000 habitantes en 1938/1940 a 15 por cada 100,000 habitantes en 1966/1970, todavía falta mucho por hacer en esta materia. Además se ha comprobado que los productos de la cloración presentan un potencial carcinógeno par el ser humano.

2.1.3. Luz ultravioleta

Los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. La radiación UV es absorbida por los nucleótidos, los bloques constitutivos del ADN y ARN de la célula, según la longitud de onda, con valores de 200 y 260 nm (Fuentes, 2006). La UV absorbida promueve la formación de enlaces nucleótidos adyacentes, con lo que se crean moléculas dobles o dímeros (Jagger, 1967). Si bien la formación de dímeros de tiamina-tiamina son los más comunes,

también suelen ocurrir dímeros de citosina-citosina, citosina-tiamina, y dimerización del uracilo. La formación de un número suficiente de dímeros dentro de un microbio impide que este replique su ADN y ARN, lo que impide su reproducción. Debido a la dependencia de la longitud de onda para la absorción de UV por parte del ADN, la inactivación UV de los microbios también esta en función de la longitud de onda.

Aun no se conoce la dosis mínima de UV necesaria para la reducción de patógenos, existen muchas características muy específicas del lugar que necesitan considerar cuando se opta por una dosis de UV conveniente para desinfectar un determinado volumen de agua potable a un nivel aceptable (Wright, 2001).

Las variables que hay que considerar son la calidad de agua de la fuente y el nivel de contaminación microbiana, el impacto que tienen sobre la contaminación microbiana los procesos de tratamiento de agua localizados antes de la unidad de desinfección UV, la información epidemiológica que correlaciona las poblaciones microbianas con la ocurrencia de enfermedades, y el nivel de riesgo considerado aceptable para proteger a la comunidad de enfermedades hídricas.

Los inconvenientes en usar sistemas de desinfección UV, es que estos requieren una fuente confiable de electricidad para poder operar, estar ubicadas de manera que permitan un acceso fácil para fines de mantenimiento. Los operarios deben calibrar los sensores, revisar los dispositivos, limpiar fundas de las lámparas, inspeccionar y limpiar las superficies internas del reactor, reemplazar lámparas viejas y monitorear la calidad de agua. Se debe limpiar la unidad UV de desinfección y el sistema de distribución usando un desinfectante químico antes de poner en funcionamiento el sistema y cada vez que se necesite en el futuro.

El factor que afecta más en la eficiencia de este proceso es la turbiedad, ya que esta provoca dispersión y difracción en la energía luminosa, la materia orgánica también disminuye la eficiencia debido a que ella absorbe energía luminosa (Fuentes, 2006).

El agua no debe ser incrustante pues el carbonato de calcio se sitúa en las lámparas lo que disminuye su efecto.

2.1.4. Ozono

El ozono se produce cuando las moléculas de oxígeno (O₂) son disociadas por medio de una fuente de energía produciendo átomos de oxígeno que posteriormente chocan con una molécula de oxígeno para formar un gas inestable, el ozono (O₃), que se utiliza para desinfección de aguas residuales. La mayoría de las plantas de tratamiento generan ozono mediante la aplicación de una corriente alterna de alto voltaje (6 a 20 kilovoltios) a través de la brecha entre placas dieléctricas de descarga en donde se encuentra un gas de alimentación que contiene el oxígeno. El ozono es generado en la planta debido a que el gas inestable y se descompone en oxígeno elemental en un periodo corto de tiempo luego de su generación (Fuentes, 2006).

Cuando el ozono se descompone en agua, los radicales libres del peróxido de hidrógeno (HO₂) y del hidróxido (HO) que se forman tienen gran capacidad de oxidación y desempeñan un papel activo en el proceso de desinfección. En general, se cree que las bacterias pierden viabilidad debido a la acción protoplasmática dando como resultado el fisuramiento o lisis de la célula.

Los mecanismos de desinfección asociados con el uso del ozono incluyen:

1. El daño a los componentes de los ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas).
2. La ruptura de las uniones de carbono-nitrógeno que conduce a la despolimerización
3. Desintegración de la pared celular (Fuentes, 2006).

El ozono elimina malos olores y sabores al atacar directamente la causas que los provocan, la cual suele ser la materia orgánica en suspensión y la acción de los distintos microorganismos sobre ella, el ozono se aplica al inicio de tratamiento con cloro para eliminar los compuestos que dan lugar a la aparición de organoclorados durante la cloración final del agua.

Existen tres componentes básicos en un sistema de ozonación: el generador de ozono, el contactor de ozono y un dispositivo de degradación de ozono (USEPA, 1986)

Las desventajas que se tienen que considerar al emplear el ozono como desinfectante son:

1. La baja dosificación puede no desactivar efectivamente algunos virus, esporas o quistes.
2. El proceso de ozonización es una tecnología más compleja que la cloración o la desinfección con luz ultravioleta, por lo cual se requieren equipos ampliados y sistemas de contacto eficientes
3. El ozono es muy reactivo y corrosivo, requiriendo así de materiales resistentes a la corrosión tales como el acero inoxidable.
4. El proceso de ozonización no es económico para las aguas residuales con altas concentraciones de sólidos suspendidos, DBO y DQO.
5. El ozono es extremadamente irritante y posiblemente tóxico, así que los gases de escape que salen de la cámara de contacto deben ser eliminados para evitar que los trabajadores estén expuestos a ellos.

2.2 Efectos de metales en microorganismos

De acuerdo con la información disponible, los metales pesados pueden actuar tanto en el interior como en exterior de la célula. La mayor capacidad de inactivación de las células microbianas, se debe al potencial de oxidación de los iones metálicos, principalmente cuando actúan sobre las proteínas y los ácidos nucleicos. La plata y el cobre son ejemplos de metales pesados tóxicos para los microorganismos.

2.2.1 Plata

La plata es un metal pesado que generalmente se considera más tóxico que la mayoría de los demás metales, por lo que ha sido de gran interés tanto a nivel medioambiental como clínico. Debido a su toxicidad, la plata no es un elemento traza y se ha usado durante mucho tiempo como agente antimicrobiano en medicina (Slawson *et al* en Baena, 2005)

La actividad antimicrobiana de la plata se basa en su unión a membranas, enzimas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Los iones de plata se complejan fuertemente a los grupos donadores de electrones que contienen nitrógeno, oxígeno y

sulfuro (Baena, 2005) que están presentes en las bacterias en forma de aminas, hidroxilos, fosfatos y tioles.

2.2.2 Cobre

El cobre es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos ya que forma parte de muchas metaloenzimas y proteínas implicadas en el transporte de electrones, en las reacciones redox y en otras reacciones importantes (Lontie en Baena, 2005). Los microorganismos requieren para vivir concentraciones muy bajas de este metal (entre 1 y 10 μ M). Sin embargo, las concentraciones altas de cobre en su forma iónica Cu²⁺ son tóxicas para las células microbianas (MacLeod et al., 1967). La toxicidad del cobre se debe sobre todo a su interacción con los ácidos nucleicos (Lippert en Baena, 2005), a la alteración de los sitios activos de las enzimas y a la oxidación de componentes de la membrana. Todos estos procesos se deben a que el cobre genera radicales hidroxilos libres, que son muy tóxicos (Simpson y col., 1988).

2.2.3 Hierro

El hierro es el metal de transición más abundante en la corteza terrestre, y cuarto de todos los elementos. Los estados de oxidación más comunes son +2 y +3. Los óxidos de hierro más conocidos son el óxido de hierro (II), FeO, el óxido de hierro (III), Fe₂O₃, y el óxido mixto Fe₃O₄. Se conocen compuestos en el estado de oxidación +4, +5 y +6, pero son poco comunes, y en el caso del +5, no está bien caracterizado. El ferrato de potasio, K₂FeO₄, en el que el hierro está en estado de oxidación +6, se emplea como oxidante. El estado de oxidación +4 se encuentra en pocos compuestos y también en algunos procesos enzimáticos. Cuando el hierro se encuentra dentro de unos niveles normales, los mecanismos antioxidantes del organismo pueden controlar este proceso. Es usado para el tratamiento de aguas para diferentes procesos como coagulante, oxidante y desinfectante (Baena, 2005).

2.3 Generalidades de los helmintos

Los helmintos son animales invertebrados de cuerpo alargado con simetría bilateral y órganos definidos, sin extremidades, con reproducción sexuada durante el estadio adulto y con un tamaño que oscila entre décimas de milímetros a varios metros. Pueden dividirse en dos grupos, los platelmintos y nematelmintos (Pelczar, 1993 y Tay, 2002)

Se reproduce sexualmente formando huevos fértiles, que da lugar a larvas de diversa morfología y tamaño variable, algunas de las cuales pueden presentar varios estadios muy diferenciados entre sí en uno o diversos huéspedes.

2.3.1 Nematelmintos

Tienen una morfología cilíndrica, fusiforme o filamentosa, no segmentados, de tamaño variable desde 1mm hasta más de 50 cm. Poseen tubo digestivo completo, un sistema nervioso relativamente complejo y todos los grupos poseen diferenciación sexual entre machos y hembras, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos.

El cuerpo de los nematelmintos está limitado por una cutícula de gran importancia funcional. De ella se originan diversos elementos anatómicos de gran importancia fisiológica como papilas sensitivas, estiletes bucales, espículas y bolsas copulativas. Por debajo se sitúa la hipodermis y el sistema muscular longitudinalmente que facilita la movilidad y mantiene el tono del pseudoceloma en cuyo interior están los órganos corporales.

El aparato digestivo se inicia en la extremidad cefálica con la boca rodeada de 3 a 6 labios que en algunas especies pueden estar ausentes. La cavidad bucal de estructura esclerosada y provista de órganos lacerantes. El intestino recorre el cuerpo axialmente y termina, en las hembras, en un ano situado centralmente y próximo al extremo caudal y en los machos desemboca conjuntamente con los órganos genitales.

2.4 Ciclo de vida de *Toxocara canis*

Es un parásito que se desarrolla en su forma adulta en el intestino delgado de perros jóvenes, mientras que sus formas larvarias se encuentran enquistadas en las vísceras y musculatura esquelética de perros adultos. Otras especies como roedores, conejos y

ovinos actúan como hospederos paraténicos (Biagi, 1986; Fernández *et al*, 2005; González, 2006).

Los huevos de *T. canis* son eliminados en la materia fecal de cachorros infectados, estos huevos son muy resistentes a los factores ambientales y en suelos húmedos, sombríos y favorables de humedad, temperatura, sombra y aireación, el huevo forma en su interior la larva infectante del segundo estadio (L2) en unos 10 días a 24° C o en 15 días a 19° C (Romero, 1994).

Los huevos larvados que contienen el segundo estado larvario, pueden ser ingeridos por otro cachorro completando su ciclo o por el consumo de huevos con L-2 por un perro adulto o algún hospedador paraténico, también por trascendencia de larvas somáticas de forma transplacentaria y transmamaria.

Las larvas somáticas de las perras en especial durante la primera gestación y lactancia constituyen la principal fuente de la infestación. Además las hembras de *T. canis* son enormemente prolíficas porque pueden liberar hasta 200, 000 huevos por día, de modo que en los exámenes coproparasitológicos de cachorros es habitual la eliminación de varios miles de huevos por gramo de heces, en una infestación ligera se pueden observar la eliminación de 10,000 huevos por gramo de heces y un perro elimina en promedio 136 gramos de heces por día, eso significa que cada perro con ligera infestación contribuye diariamente a la contaminación ambiental con casi 1.4 millones de *T. canis* (Kassar, 1998)

Los huevos son esféricos y miden de 75 a 90 μm , poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas, la externa albuminosa, otras tres quitinosas, otra fibrilar e internamente la capa lipóidea, la cual proporciona una fuerte resistencia frente a las agresiones del medio exterior, en cualquier fase del desarrollo. Son de color marrón oscuro no segmentados y su contenido ocupa prácticamente todo el espacio interior.

Una de las técnicas aplicadas a los modernos desinfectantes, en la potabilización de agua, es la combinación de dos principios activos no antagónicos que se potencien entre sí en su acción biocida. Más aún, se busca la combinación de dos componentes con capacidad de desinfección, no solo no antagónica sino sinérgica. Como un ejemplo, están las aleaciones cobre-plata, las cuales aumentan de forma amplia la eficacia de cada uno de sus componentes.

En este contexto, se sabe que los huevos de helminto son estructuras de alta resistencia, por lo que su eliminación por el método desinfectante que se emplee, prácticamente garantiza la eliminación de otras estructuras microbianas indeseables. A este respecto, la presencia de estos agentes patógenos se encuentra restringida en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Es importante precisar que para el presente trabajo de tesis, se optó por emplear huevos de *Toxocara. canis*, debido a que el ser humano no es su hospedero específico, por lo que el riesgo de infección se ve prácticamente eliminado. Asimismo, al poseer varias capas que protegen al huevo, lo que lo hace más resistente a cualquier daño externo que otros huevos de helminto, lo que lo convierte en un excelente modelo de trabajo para pruebas de laboratorio.

Conjuntando por un lado la necesidad de desinfectar las aguas residuales, para que sean susceptibles de ser empeladas de manera salubre en el riego de campos agrícolas y, por otro, la posibilidad de emplear metales como desinfectantes, sin que se generen subproductos carcinógenos, se plantea la realización de presente proyecto de investigación.

3 OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo general

Conocer el efecto que causan agregados minerales que contienen Ag, Cu y Fe en la viabilidad de huevos de helminto (*Toxocara canis*).

3.1.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar el contenido de Fe Cu y Ag en el agregado mineral seleccionado
- 2) Determinar de viabilidad de los huevos de helminto (*T. canis*), después de ser sometido al agregado mineral a diferentes tiempos de exposición.
- 3) Determinar a través de Microscopía óptica el daño provocado por el agregado sobre los huevos de helminto (*T. canis*).

3.2 Hipótesis

Si los agregados minerales, Ag, Cu y Fe, en diferentes combinaciones y tiempos de exposición tienen efecto desinfectante, entonces afectaran la viabilidad de los huevos de helminto.

3.3 Justificación

El proceso de desinfección del agua es de suma importancia, ya que este implica la pérdida de viabilidad o inactivación de agentes patógenos. Por ello se tiene que proveer a la población de agua potable con una buena calidad, y así se evitara(n) problemas públicos de salud. Para alcanzar tal objetivo se han emitido normas mexicanas como lo son la NOM-127-SSA-1994 y la NOM-001-SEMARNAT-1996 que señalan los límites permisibles de contaminantes de las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores. En nuestro país el método más utilizado para la desinfección es el de cloración, por tener un costo muy bajo. La aplicación de este método tiene desventajas, la principal es cuando el cloro reacciona con la materia orgánica forma trihalometanos (compuestos carcinógenos), otros métodos de desinfección necesitan mayor infraestructura y mantenimiento, por ello la investigación de metales como desinfectantes es una propuesta interesante y muy rentable para nuestras comunidades.

3.4 Estrategia de trabajo

3.4.1 Diagrama de la metodología experimental general

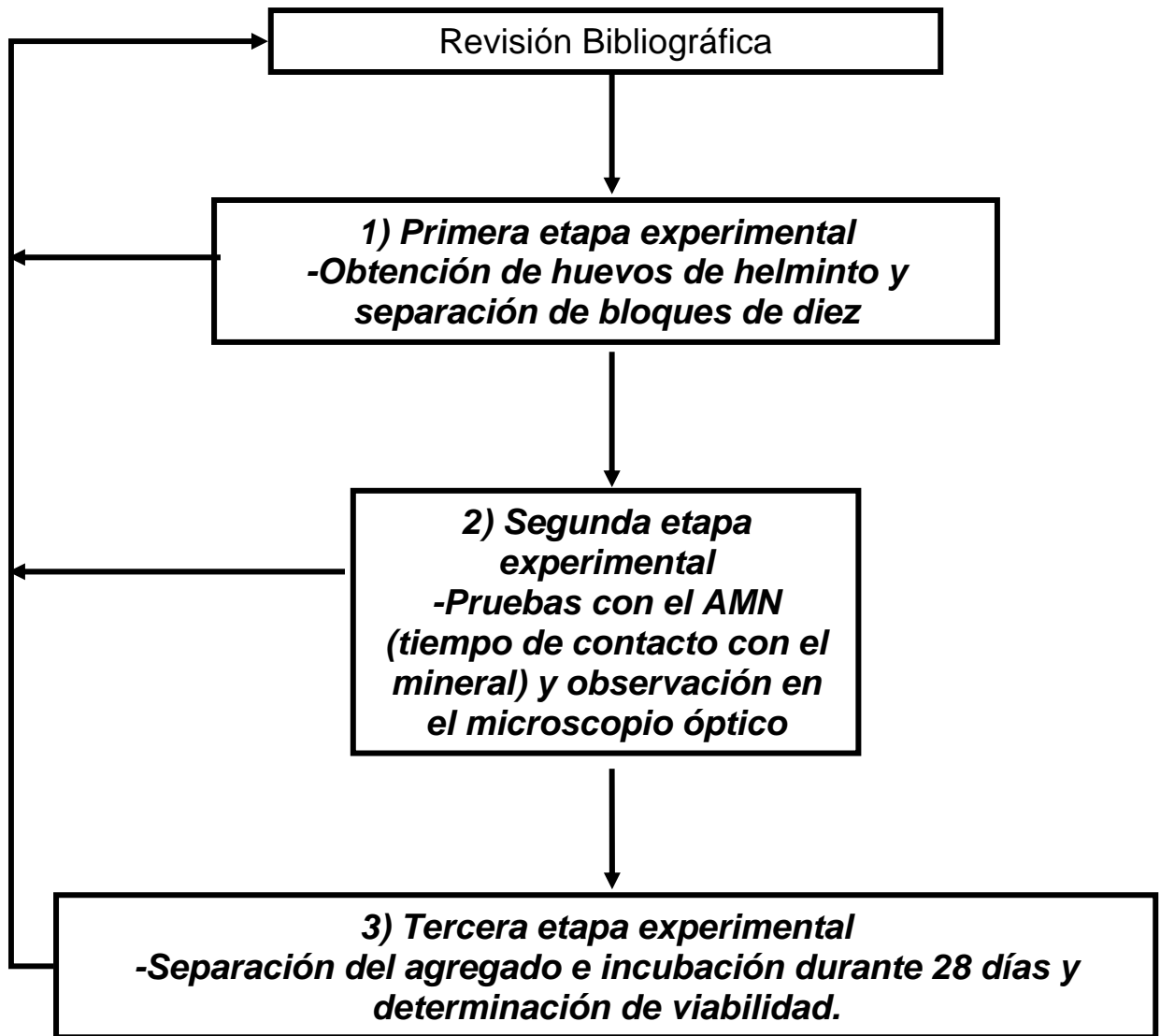


Figura 3.1-1.- Diagrama general experimental

3.4.2 Primera etapa experimental

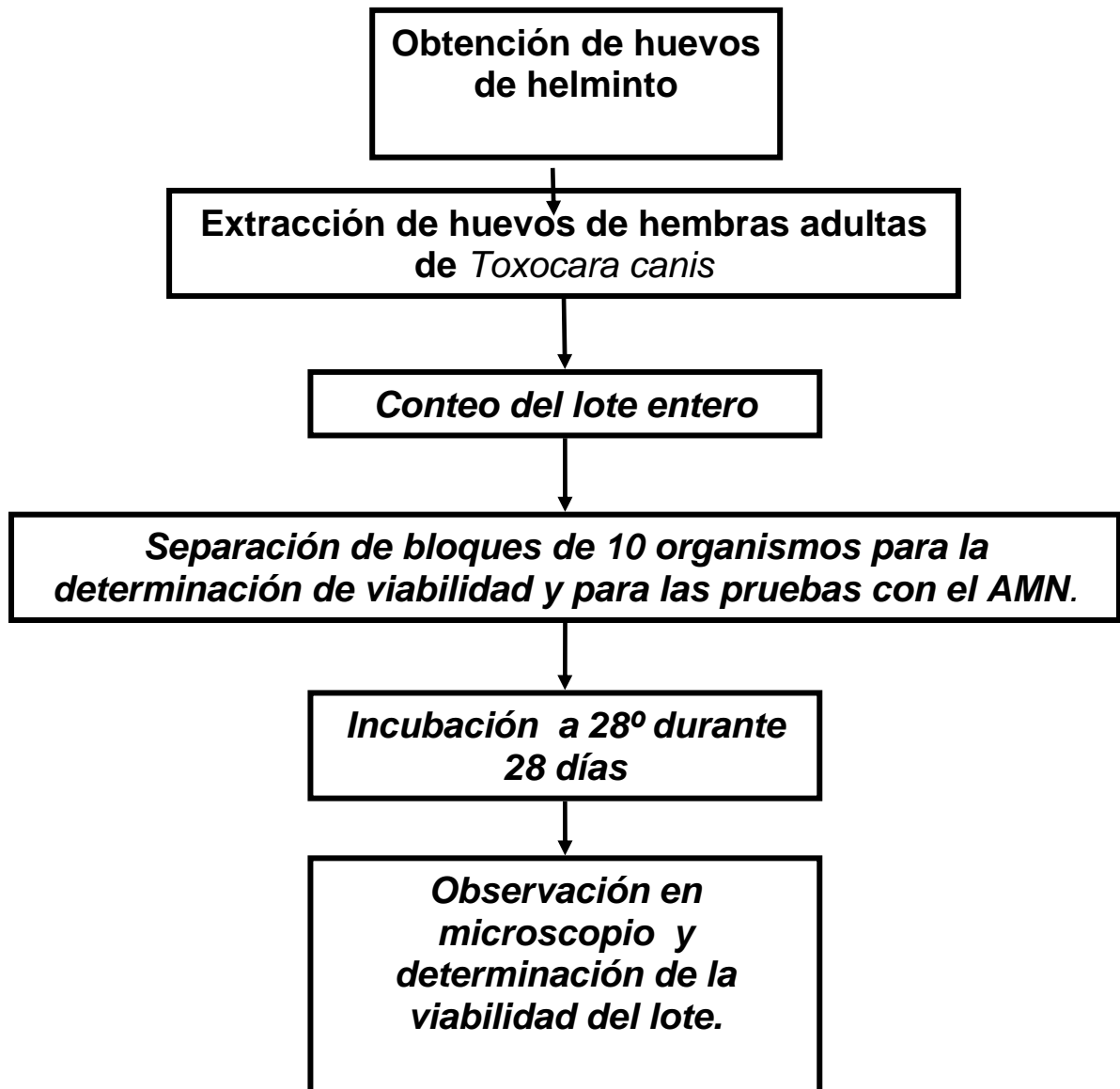


Figura 3.1-2. Diagrama de la obtención y determinación de la viabilidad de los huevos de helminto antes de los tratamientos con los agregados

3.4.3 Segunda etapa experimental

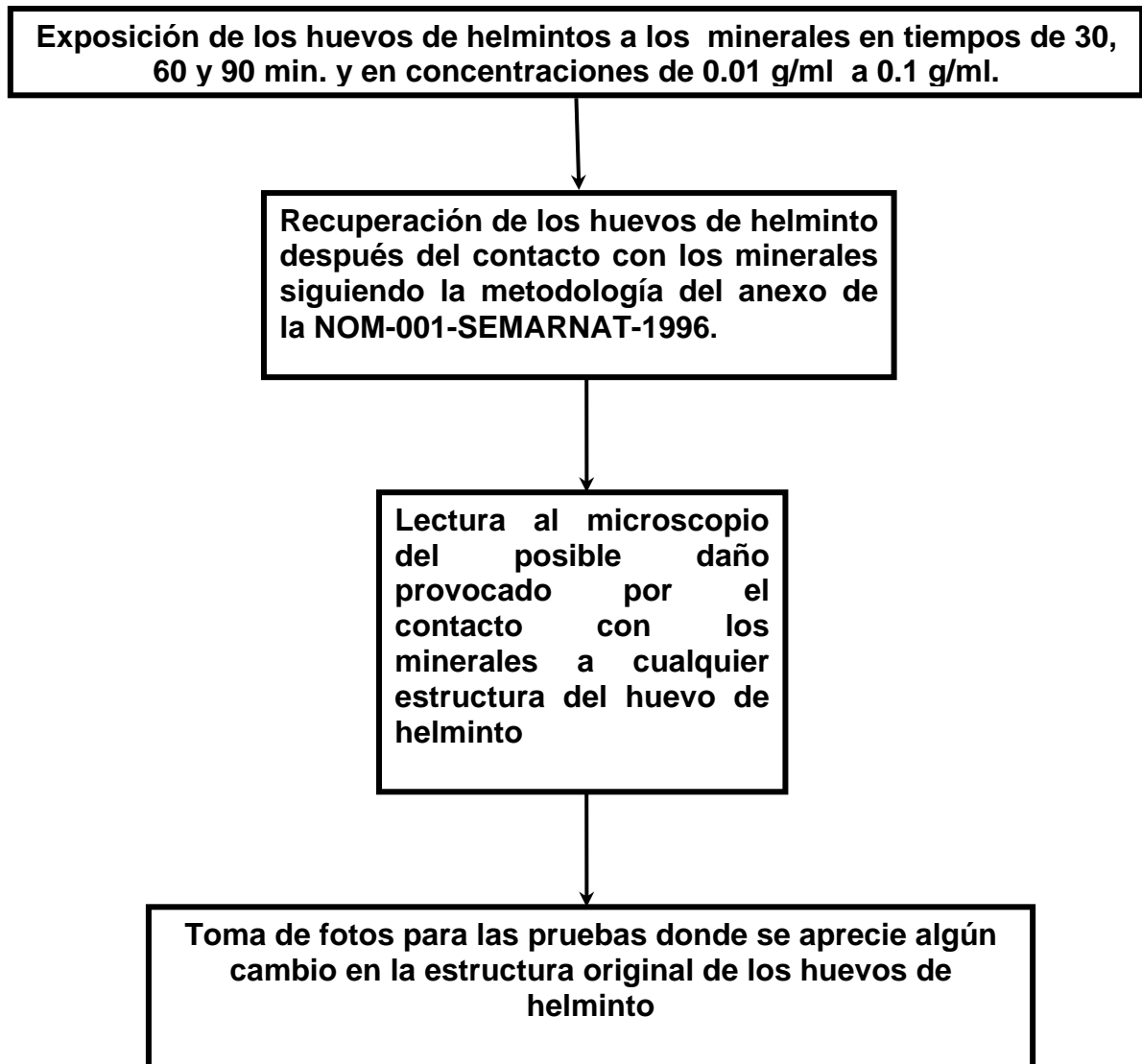


Figura 3.1-3. Diagrama de la metodología usada en la exposición a los metales

3.5 Tercera etapa experimental

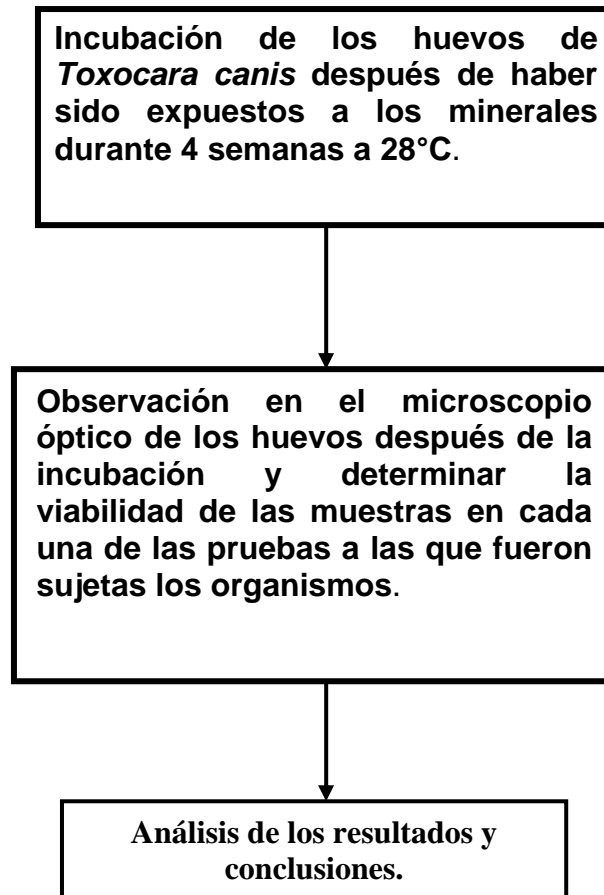


Figura 3.1-4. Diagrama de la metodología realizada después de la incubación

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar cada objetivo el trabajo se divido en 3 etapas:

4.1 Primera etapa experimental

4.1.1 Obtención de los huevos de helminto (HH).

En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, a partir del intestino delgado de cachorros de perros se obtuvieron las hembras adultas de *Toxocara canis*. Las hembras grávidas fueron disectadas longitudinalmente para la extracción de los órganos internos, estos fueron macerados, filtrados y lavados para la eliminación de la materia orgánica que quedase pegada a lo huevos de *T. canis* (Fig, 6-1). Se colocaron en tubos para centrifuga y se centrifugaron durante 3 minutos a 2000 rpm.; terminada la centrifugación, se reconstituyó la pastilla obtenida con solución fisiológica para su conservación y se mantuvieron refrigerados.

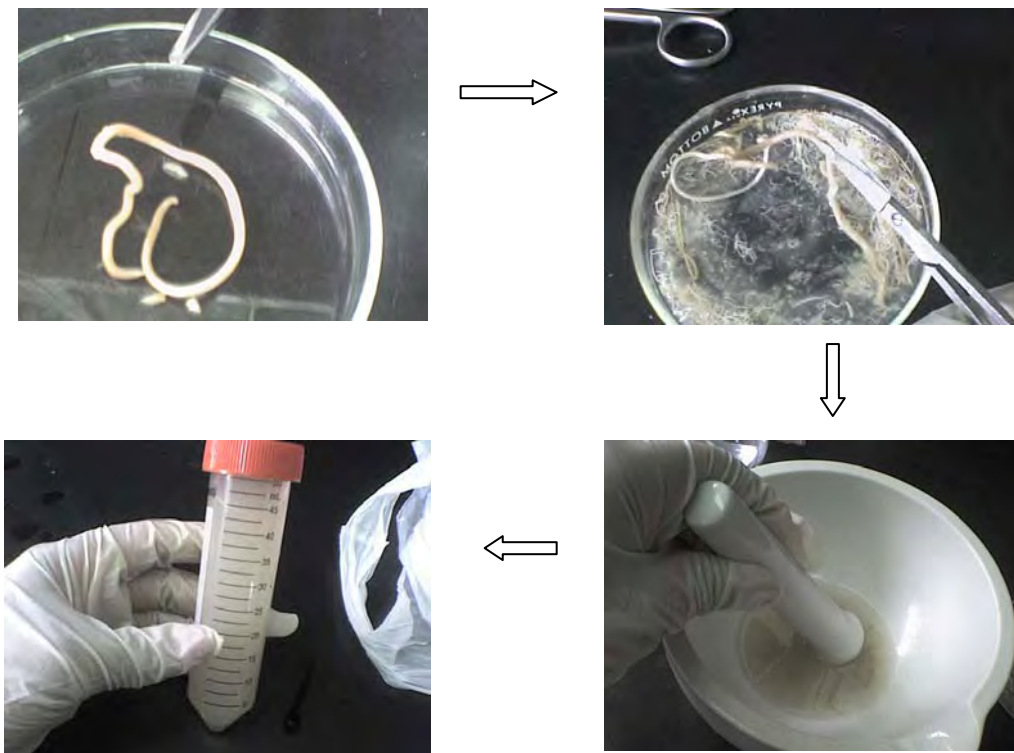


Figura 4-1.- Obtención de huevos de helminto

4.1.2 Cuenta y determinación de viabilidad

Para obtener la viabilidad del lote, se inició el conteo del lote con ayuda de un microscopio óptico de campo claro y una cámara de conteo DONCASTER.

De la pastilla obtenida se tomó con ayuda de una micropipeta, la cantidad de 1 ml de la suspensión homogenizada. Usando la cámara de conteo DONCASTER se realizaron 10 conteos de los huevos, enfocados con el objetivo de 40X, a efecto de conocer el número total de huevos: La viabilidad se determinó mediante el procedimiento de incubación in vitro, de acuerdo a lo descrito en la última parte de la técnica indicada en la NOM-001-SEMARNAT-1996. Terminado este proceso se determinaron los siguientes valores:

Número total de huevos por 100 μ l de la suspensión, en este valor solo se separaron el número de huevos no viables y el de los viables; La viabilidad se determinó por la presencia de la larva móvil dentro del huevo. De los 10 conteos realizados se tomó como valor final al valor promedio de huevos viables de *T. canis*.

Viabilidad se refiere a la capacidad de un huevo para desarrollarse en el medio hasta la etapa infectante (Rojas, 1998).

Se adaptaron pequeñas cajas petri con una capacidad de 1ml, para iniciar la división del lote de los H.H en bloques de 10 huevos por caja, para lograr este procedimiento se siguió la metodología realizada para el conteo y viabilidad.



Figura 4-2.- División en bloques de 10 H.H.

4.2 Segunda etapa experimental.

En esta etapa se expusieron directamente los huevos de helminto al agregado mineral y se determinó su viabilidad después de la exposición. Se tomaron dos bloques de 10 huevos, uno se empleó como testigo y el otro se le adicionó el agregado. Este procedimiento se realizó por triplicado. Con cada metal, compuesto y agregado se dejó actuar por 30, 60 y 90 minutos.

Después de haberse cumplido el tiempo de contacto, los huevos se separaron del agregado por medio de la técnica de Faust, se observaron en el microscopio óptico y se pusieron a incubar *in vitro* para la determinación de su viabilidad.

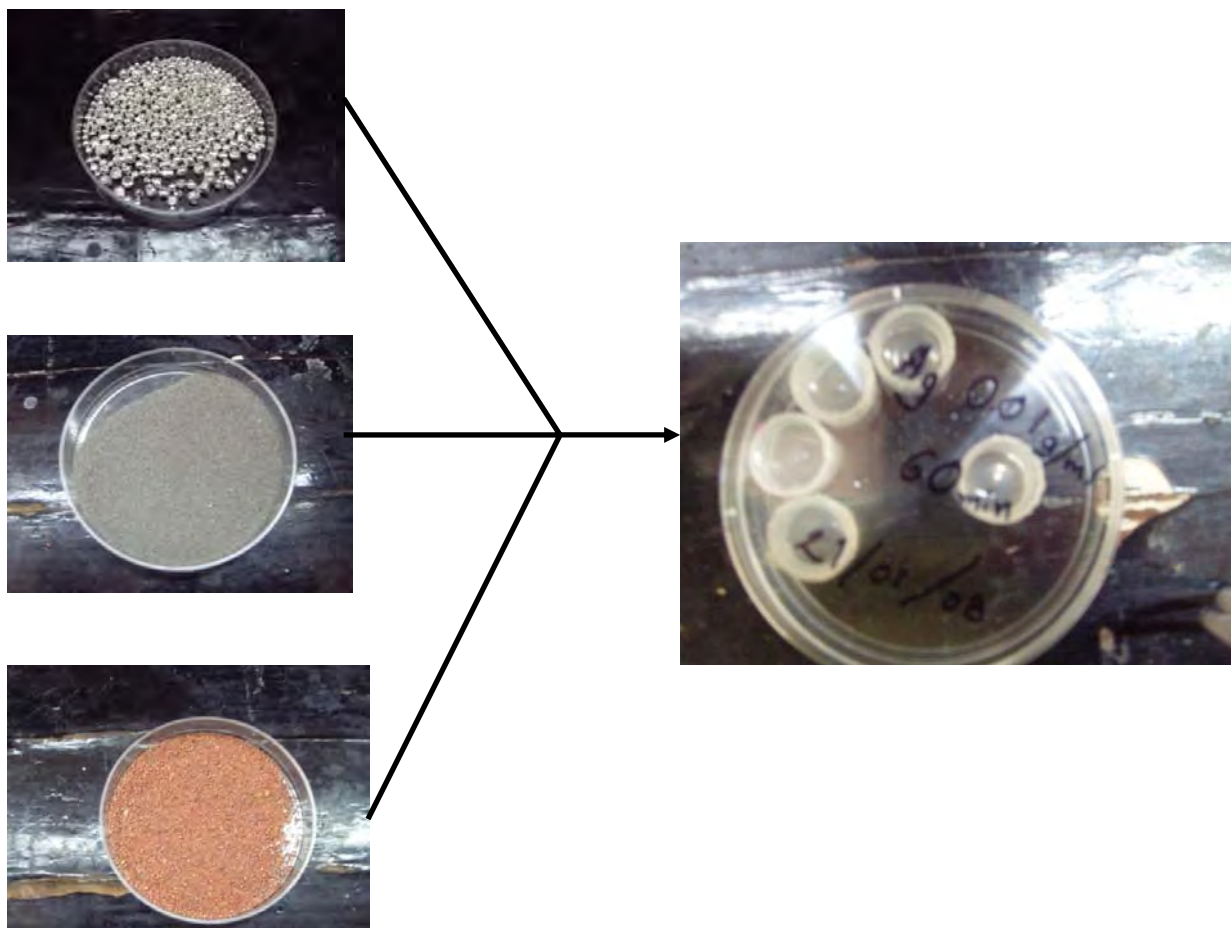


Figura 4.3.- Exposición al agregado mineral

4.3 Tercera etapa experimental

Al analizar las pruebas que tiene el mayor efecto negativo sobre la viabilidad de los huevos de helminto se obtuvieron las fotografías en donde se observaron los cambios más significativos en la estructura de los H.H. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico usando el análisis de variancia (ANOVA), comparación de medias y la prueba de t de Student. El programa estadístico empleado fue OriginPro 8.

5 RESULTADOS

Se exponen los resultados obtenidos de cada una de las pruebas realizadas con los agregados minerales. Los primeros resultados que se obtuvieron fueron acerca de la viabilidad que tenía el total de la muestra de HH. Subsecuentemente se muestran las imágenes obtenidas después de haber expuesto los HH ante los agregados minerales. Las fotografías fueron tomadas usando un microscopio óptico Zeizz West Germany equipado con un sistema de fotografía.

5.1.1 Viabilidad

Para calcular el porcentaje de la viabilidad de la muestra, se utilizó el método indicado en la NOM-001-SENARNAT-1996. Después de haber sido incubados a una temperatura de 28°C durante 28 días, se procedió a obtener el porcentaje de huevos larvados dio como resultado 88%.de viabilidad.

5.2 Pruebas con Ag

Los resultados de esta prueba, mostraron que la plata afecta en un gran porcentaje la viabilidad de los HH. En la tabla 2, se observa que en las concentraciones usadas las cuales fueron de 0.01g/ml hasta 0.1 g/ml de Ag, en todos los casos no hubo detección de larvas móviles (viabilidad). El tiempo que se manejo para cada prueba es des 30 a 90 minutos.

El mecanismos de acción de la plata en microorganismos es que produce una despolarización de la membrana celular y se une al ADN de los microorganismos, permitiendo mayor permeabilidad y paso del ión plata al interior, al igual que inhibe la síntesis proteica y precipita proteínas bacterianas. Pero aún no se ha reportado el exacto mecanismo de acción de este mineral sobre la inactivación de los huevos de helminto. En estas pruebas lo que se puede mencionar es que la Ag interactúa con la pared celular de este organismo y destanaturaliza las enzimas y proteínas superficiales (Craig, 2001) que se encuentran en la capa lipoproteína que protege al huevo. En las imágenes obtenidas se observa el adelgazamiento notable de la capa que envuelve al huevo, por ello se afecto la viabilidad de el organismo, pues al modificar la estructura de

protección al medio, evita el transporte de materia, energía y también afecta la respiración, dando como resultado la inactivación del HH. En las imágenes de la tabla 1. Los resultados de Ag 0.01, muestran que este mineral causa varios cambios en la estructura del huevo pues desde los 30 minutos de estar en contacto, se observa que la pared se adelgaza, el contenido del huevo sufre cambios en su forma y cantidad.

5.3 Pruebas con Cu.

En las pruebas realizadas con Cu, se obtuvieron resultados muy similares a los encontrados con Ag pues en las diferentes variaciones que se tuvieron en cuanto a tiempo (30, 60 y 90 min.) y concentraciones (0.01 g/m, 0.05g/ml y 0.1 g/ml), en ninguna de ellas se observaron larvas móviles, es decir en todos los casos se afectó drásticamente la viabilidad de los HH.

Los cambios observados se refieren a la afectación de la forma inicial del huevo, pues después del tratamiento se nota una gran diferencia al igual que en la coloración. El posible mecanismo de acción del Cu sobre la inactivación de los HH es que este metal altera los sitios activos de las enzimas presentes en la capa lipoproteica, penetrándola y así pueden interactuar con el ADN, proteínas y enzimas respiratorias impidiendo así el desarrollo larvario.

Las fotografías tomadas a las pruebas de Cu 0.01g/ml que se encuentran en la tabla 3. Mostraron diferencias al testigo, una de ellas es que la coloración interna del huevo se observa de un color más oscuro, además que la pared del huevo cambia drásticamente, en algunos casos se muestra un adelgazamiento en esta. Si recordamos que un huevo fértil no debe mostrar este tipo de alteraciones, se puede definir a estos huevos como no fértiles o inviábiles.

Las imágenes de las pruebas a 0.05g/ml de la tabla 4. Se observó que la pared se adelgace y por ello el huevo puede perder la capacidad infectante, pues la pared proporciona protección para el desarrollo de la larva, evitando que agentes extraños contaminen el contenido y alteren el correcto crecimiento y desarrollo de la larva.

Finalmente en la tabla 5. Las imágenes de los huevos que fueron expuestos al Cu con una concentración de 0.1 g/ml, muestran que pequeños fragmentos del material están adheridos a la pared del huevo, además que la parte interna del huevo pierde su forma original. La coloración sigue siendo alterada a un tono muy oscuro.

5.4 Pruebas con Fe.

En las pruebas realizadas se pueden determinar una relación entre concentración y efecto de la viabilidad pues a mayor concentración hubo mayor daño observable en los H.H al igual que en los resultados después de la incubación pues hubo menor presencia de larvas móviles en las pruebas que estuvieron sujetas a mayores concentraciones.

En la tabla 6. En el caso de las pruebas con Fe con la concentración de 0.01g/ml los cambios que se observan en las imágenes obtenidas es que al igual que en las pruebas realizadas con Cu la coloración inicial de los huevos cambia drásticamente a un color muy oscuro, en algunos casos también se observó que pequeñas trazas del mineral se quedaban adheridas en las paredes del huevo. En esta concentración lo que no se observó fue que la forma original del huevo cambiara, tampoco se observa un cambio muy notable en el grosor de la pared. En las imágenes de la tabla 6, aparecen pequeños cambios en la forma del huevo y también en la estructura de la pared, el cambio de la coloración es una característica constante.

5.5 Pruebas con Cu/Ag .

Una de las técnicas aplicadas a los modernos desinfectantes, en la potabilización de agua, es la combinación de dos principios activos no antagónicos que se potencien entre sí en su acción biocida. Más aún, se busca la combinación de dos componentes con capacidad de desinfección, no solo no antagónica sino sinérgica. Como un ejemplo, están las aleaciones cobre-plata, las cuales aumentan de forma amplia la eficacia de cada uno de sus componentes.

Esta acción sinérgica ha sido reportada por varios autores; Lin *et al.*, 1998, Pyle *et al.* , 1992, Huang *et al.* , 2007. Al combinar el Cu con la Ag intentamos obtener un efecto

sinérgico, el cual aumente la efectividad de inactivación en los huevos de helminto, en los resultados de esta combinación se observa que en ninguna de las pruebas hay viabilidad después del tratamiento, sus efectos biocidas actúan sobre la estructura de la capa lipoproteica, y así tienen acceso al interior del huevo para interactuar con proteínas, ADN y enzimas, para inactivarlo. El propósito de combinar estos dos elementos, es para obtener un efecto sinérgico, en las fotografías obtenidas En la tabla 12. Se observa un gran daño en toda la estructura, como el adelgazamiento de la pared, y cambios en la estructura interna del huevo.

- Las pruebas con hierro, muestran una mínima cantidad de huevos presentan cambios en su estructura, solo se observa que la estructura toma una coloración rojiza.
- Las pruebas realizadas con Ag y Cu, se observaron diferencias, en todas las concentraciones probadas. Los cambios que presentan los huevos fueron en el caso de la plata que la pared del huevo se adelgaza y en el caso del Cu la estructura interna del huevo se ve muy afectada pues se distingue una degradación.
- El agregado mineral al contener los tres metales aunque en pequeñas trazas se observan cambios en la estructura del huevo. En la pared de los huevos se observa que pequeñas cantidades de material se adhieren a este, y también la coloración del huevo cambia drásticamente tornándose a un color naranja. Esto ocurrió en concentraciones bajas y altas.
- Con los otros compuestos minerales no se observaba cambios tan visibles, en concentraciones bajas y tiempos cortos, los cambios se distinguían solo en la concentración más alta. En estos casos los cambios a los que nos referimos son que el interior del huevo se hace transparente, lo que nos podría indicar que el material interno se filtra por alguna fisura que la pared haya sufrido.

5.6 Pruebas con AM (agregado mineral).

El AM con el cual se trabajo contenía varios elementos entre ellos los tres que se usaron en las anteriores pruebas (Ag, Cu y Fe) todos ellos se presentan en diferentes concentraciones, para determinar el porcentaje que ocupa cada elemento en el agregado se llevó a cabo un análisis cuantitativo, realizado por análisis multielemental, en el cual se reportaron las siguientes concentraciones.

Tabla 1. Concentraciones de los elementos presentes en el Agregado mineral.

Elemento	% De la concentración en la que se encuentran los elementos presente en el AM.	Concentraciones de los elementos utilizadas en la pruebas		
		0.01g/ml	0.05 g/ml	0.1 g/ml
C	1.97	0.019	0.098	0.19
O	14.18	0.14	0.70	1.41
Mg	0.71	0.0071	0.035	0.071
Al	2.73	0.027	0.13	0.27
Si	8.32	0.083	0.41	0.83
P	0.08	0.00083	0.0041	0.0083
Si	4.02	0.040	0.20	0.402
K	0.96	0.0096	0.043	0.096
Ti	0.19	0.0019	0.0098	0.019
V	0.41	0.0041	0.020	0.041
Fe	15.33	0.15	0.76	1.53
Cu	0.37	0.003	0.018	0.037
Zn	3.09	0.03	0.15	0.30
As	1.17	0.01	0.058	0.11
Ag	12.34	0.12	0.61	1.23
Au	12.82	0.12	0.64	1.28
Hg	0.26	0.002	0.013	0.026
Pb	19.72	0.19	0.98	1.97

Como se observa el agregado también posee otros materiales, los que presentan mayor contenido son el Fe, Au y Ag. Los resultados obtenidos después del tratamiento en este caso fue una viabilidad nula, en todas las pruebas sin importar concentración y tiempo, parece ser que este material posee grandes cualidades desinfectantes, pues desde los primeros ensayos se observo un daño en la pared del huevo, y en la estructura interna, como lo fue un cambio de coloración. Estos resultados se deben a la presencia de

agentes desinfectantes como Ag y Cu, este último no se encuentra tan abundante en el compuesto pero no por ello podemos asegurar que no interactúo con los HH.

A lo largo de todas las pruebas se comprobó comprobado que el Ag tiene altos niveles de desinfección, pues en fotografías obtenidas después del contacto con este elemento se observaron daños en los HH. Como se observa en la tabla 9. Las pruebas realizadas con el agregado mineral el cual contiene en pequeñas trazas los tres minerales en cuestión, muestra efectos diferentes en el cambio de coloración del huevo, pues el color predominante es el marrón, en la concentración más baja y en el tiempo más corto se observan cambio de coloración, la pared es nota más delgada y el material se queda adherido en pequeñas cantidades al huevo, además que se observa que la estructura de la pared ha sido perforada y por ello el contenido se filtra a través de estas fisuras.

Los mecanismos de desinfección de estos elementos ya se han discutido anteriormente, aunque en esta prueba también se debe considerar que no solo los tres elementos (Fe, Ag y Cu) estuvieron presentes en la exposición pues como se señala en la tabla uno de los elementos más abundantes es el Fe aunque en la literatura no se reporta como un agente desinfectante muy importante, en las pruebas lo señala como posible agente biocida.

5.7 Pruebas con FeS, Fe₂O₃, Cu₂O, Ag₂O, Fe₂SO₄, y CuSO₄

Las muestras tratadas con concentraciones de 0.01 hasta 0.1 g/ml con el FeS después de haber sido incubadas reportaron huevos con larvas móviles, Estos resultados se observan en las fotografías de la tabla 10. En las primera pruebas con este compuesto, se observaron mínimos cambios en la estructura del huevo, como se observa en concentración de 0.01 a los treinta minutos, no se aprecia algún cambio significativo en la forma y color del HH, cuando aumentamos la concentración hubo diferentes resultados ya que la pared si muestra cambios al igual que la forma original.

Con estos compuestos en algunos casos se encontraron larvas móviles después del tratamiento. En el caso de Fe₂O₃ en todos las pruebas se reportaron la observación de larvas móviles, solo se detecto un cambio en la coloración del huevo. Aunque en las pruebas con el Fe también tuvieron resultados positivos en la desactivación de los

huevos de helminto, la concentración del mineral en este compuesto es menor, es quizá por ello que no se obtuvo una respuesta positiva en impedir el desarrollo larvario.

El Cu_2O presentó larvas en las concentraciones más bajas, pero en concentraciones más altas el efecto desinfectante fue aumentando es decir que a mayor concentración de Cu_2O menor será el posible desarrollo larvario de este agente patógeno.

Con el Ag_2O se observó que en algunos casos a bajas concentraciones no se presentaba desarrollo larvario, en las concentraciones de 0.05 y 0.1 hubo una gran disminución de viabilidad en los huevos después de haber sido incubados pues en concentraciones de 0.05 a 60 y 90 minutos de contacto no hubo presencia de larvas móviles es decir no había organismos que pudiesen ser potencialmente infectantes.

Las pruebas hechas con el Fe_2SO_4 dieron como resultado que en menores concentraciones y tiempos cortos había desarrollo de la etapa infectante del organismo, y en pruebas como 0.1 g/ml a 60 y 90 minutos hubo una baja proporción de helmintos viables, es decir que se necesita mayor tiempo de contacto y mayores concentraciones para alcanzar la desinfección también para este mineral como en el caso de Ag_2O .

5.8 Graficas de viabilidad de los huevos de helminto con los distintos metales a diferentes tiempos.

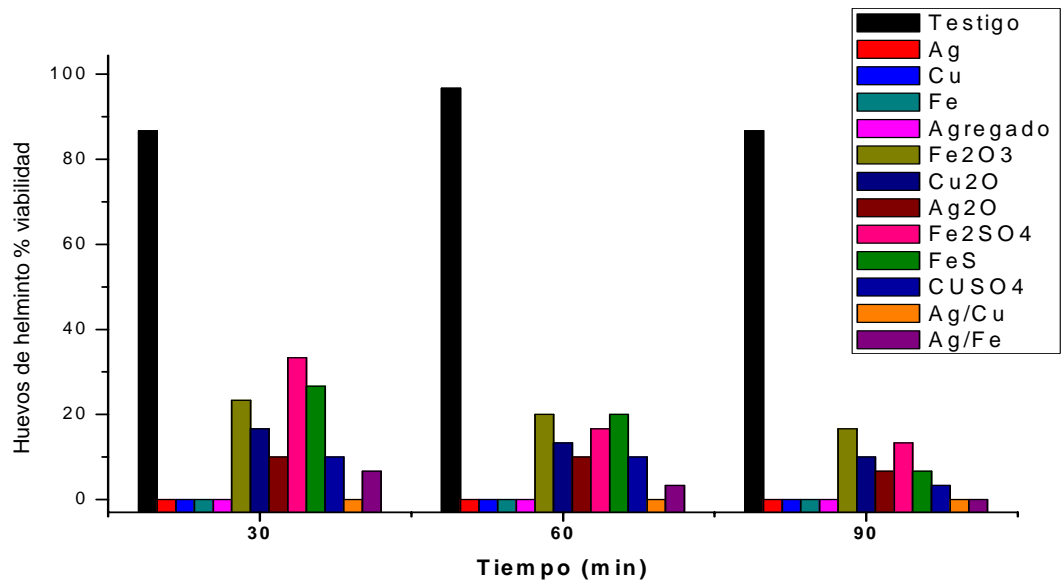


Figura 5-1.- Comparación entre minerales

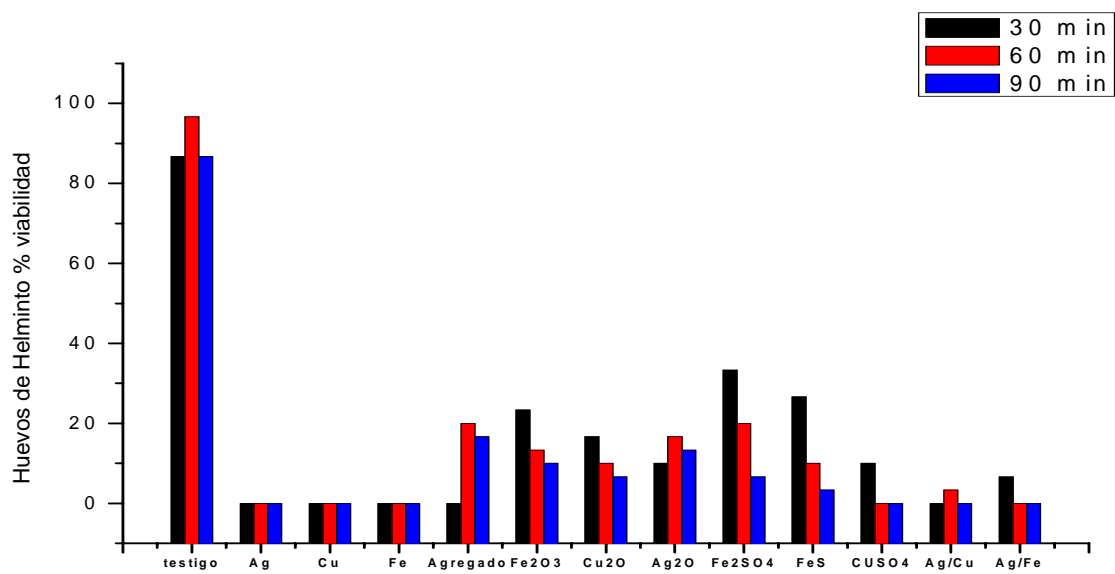


Figura 5-2 Comparación entre tiempos

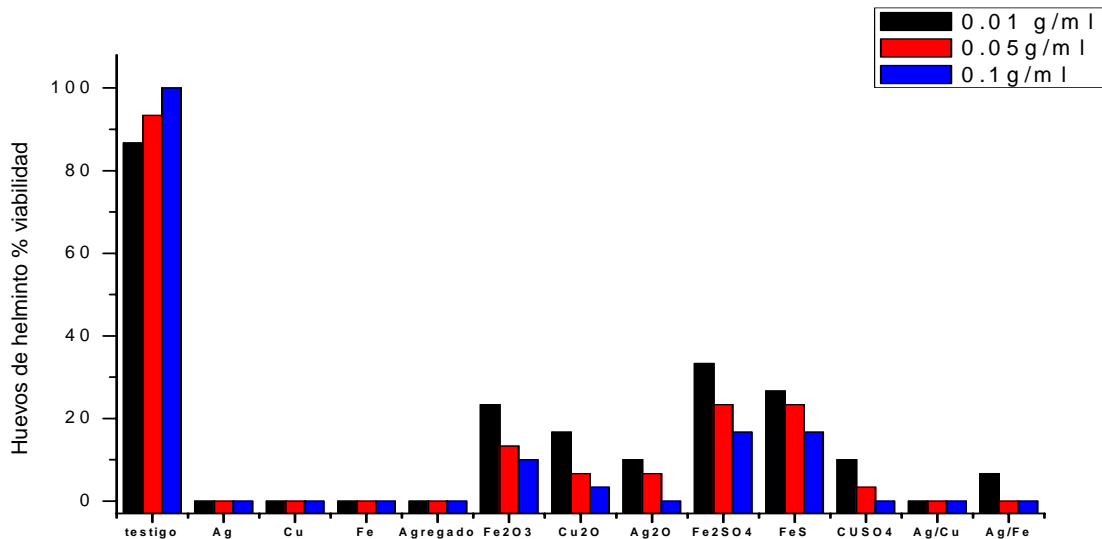


Figura 5-3 Comparación entre concentraciones

En las gráficas obtenidas respecto a los resultados, se observa que al aumentar la concentración en algunos compuestos la viabilidad va disminuyendo, y en algunos esta llega a ser nula.

En casos particulares podemos observar que el Ag y el Cu, así como su combinación y el AM siempre arrojaron como resultado una viabilidad cero, desde los 30 minutos y concentración de 0.01 g/ml.

La inactivación de los huevos de helminto, dependió principalmente del mineral utilizado, y no del tiempo, ni la concentración que se manejaron, ya que los resultados obtenidos son insignificantes comparados con los resultados de los diferentes minerales probados. El análisis estadístico (ANOVA) indicó la diferencia significativa en la viabilidad de los huevos de helminto como resultado de la interacción de los diferentes metales, al realizar la prueba de T de student, se detecto que los minerales que presentaban los resultados más significativos fueron Ag, Cu, la combinación de ambos y el agregado mineral. Todo ello corrobora la acción desinfectante de estos minerales en referencia a los helmintos.

Con estos resultados indican que Ag, Cu, Ag/Cu y el agregado mineral son eficientes en desactivar elementos patógenos que estén presentes en el agua como lo son los huevos de helminto

En la actualidad el reúso de aguas residuales se ha vuelto una necesidad, aunque en muchas localidades o regiones de nuestro país no se cuenta con la infraestructura necesaria para realizar este proceso, es por ello que se trabaja para desarrollar nuevas tecnologías con bajo costo y fáciles de realizar, para que el agua sea tratada adecuadamente y evitar que nuestra población sufra de enfermedades hídricas o que nuestros suelos sean contaminados con materiales que se transportan en el agua.

A continuación se presentan las fotografías de los huevos de *Toxocara canis* después de haber sido expuestos a los diferentes compuestos. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio óptico de campo de procesamiento de imágenes

5.9 Tablas de los resultados

Tabla 2. Ag 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Ag	0.01	30	
		60	
		90	

Tabla 3.Cu 0.01g/ml a 30,60 y 90 min.

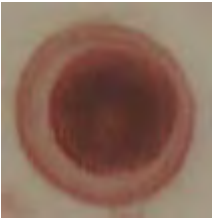



Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Cu	0.01 g/ml	30	
		60	
		90	

Tabla 4. Cu 0.05g/ml a 30, 60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Cu	0.05	30	
		60	
		90	

Tabla 5. Cu 0.1g/ml a 30, 60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Cu	0.1	30	
		60	
		90	

Tabla 6. Fe 0.01 g/ml a 30,60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Fe	0.01	30	
		60	
		90	

Tabla 7. Fe 0.05g/ml a 30, 60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Fe	0.05	30	
		60	
		90	

Tabla 8. Fe 0.1 g/ml a 30, 60 y 90 min




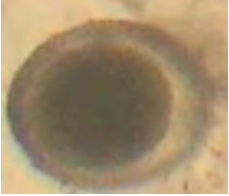
Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Fe	0.1	30	
		60	
		90	

Tabla 9. Agregado mineral a 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min.





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
AM	0.01	30	
		60	
		90	

Tabla 10. FeS 0.01 g/ml a 30, 60 y 90 min





Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
FeS	0.01	30	
		60	
		90	

Tabla 11. CuSO₄ 0.01g/ml a 30, 60 y 90 min.









Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
CuSO ₄	0.01	30	
		60	
		90	

Tabla 12. Ag/Cu 0.05 g/ml a 30, 60 y 90 min.

Metal	Concentración g/ml	Tiempo (min)	Foto
Testigo			
Ag/Cu	0.05	30	
		60	
		90	

En la siguiente tabla se indica la capacidad de inactivación de mayor a menor proporción de cada uno de los metales probados en los H.H. Se obtuvo la siguiente secuencia de inactivación:

AM, Ag/Cu > Ag > Cu > Ag₂O > CuSO₄ > Cu₂O > Fe > FeS > Fe₂O₃ > Fe₂SO₄

Tabla 13. Capacidad de inactivación de los distintos metales probados

Concentración y tiempo Metal	0.01 g/ml durante 30 minutos	0.05 g/ml durante 60 minutos	0.1 g/ml durante 90 minutos
	Agregado Mineral (AM)	++++	+++++
Ag/Cu	++++	++++	+++++
Granalla de Ag	+++	+++	++++
Granalla de Cu	++	+++	+++
Ag₂O	++	+++	+++
CuSO₄	+	++	++
Cu₂O	+	++	++
Limadura de Fe	+	+	++
FeS	+	+	++
Fe₂O₃	+	+	++
Fe₂SO₄	+	+	+

Nota: Capacidad de inactivación: baja (+), ++ (regular), +++ (media), ++++ (alta)

5.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar la variante de la cual dependía la afectación en la viabilidad de los HH. Las variantes que se usaron fueron los diferentes compuestos utilizados, el tiempo de contacto que fue de 30 a 90 minutos y la concentración del compuesto las cuales fueron de 0.01 g/ml hasta 0.1g/ml.

Para ello se ocuparon las siguientes hipótesis:

HO: $C_1 = C_2 \dots C_1 = 0$ → Las concentraciones, tiempos o minerales no muestran diferencias entre ellas.

HA: $C_1 \neq 0$ → Las concentraciones, tiempos o minerales muestran diferencias entre ellas.

El valor de significancia en todas las pruebas es 0.05, con ello se indica que al menos hay un par de variantes que son diferentes entre ellas, con ello se rechaza la hipótesis nula para determinar cual de las variantes son diferentes entre sí se ocupa la prueba de T de Student.

5.11 Análisis de varianza comparando entre minerales en todas las concentraciones y tiempos.

DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Significancia
Model 9	1815.1519	201.68724	7.35886	0.0001
Error 20	548.14815	27.40741		
Total 29	2363.3333			

La significancia es menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, así se obtiene que al menos entre dos compuestos muestran diferencias entre ellos. Se realizó una prueba de T de Student para determinar cuales son los compuestos que muestran estas diferencias. Al realizar esta prueba se reportó que son el Cu, Ag, Fe, AM y Ag/Cu, los que muestran un efecto negativo en la viabilidad de los HH.

5.12 Análisis de varianza comparando entre concentraciones en todos los minerales y todos los tiempos.

DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Significancia
Model 2	176.06838	88.03419	0.13335	0.87559
Error 36	23765.81197	660.16144		
Total 38	23941.88034			

La significancia es mucho mayor que 0.05 así que comparando entre concentraciones no hay diferencia significativa entre ellas.

5.13 Analisis de varianza comparando entre tiempos con todos los minerales en todas las concentraciones.

DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Significancia
Model 2	195.4416	97.7208	0.16348	0.8491
Error 36	21519.65812	597.75628		
Total 38	21715.09972			

Al comparar entre los tiempos de contacto, se obtuvo una significancia mayor a 0.05 con lo cual aceptamos la hipótesis nula, lo que nos indica que no hay diferencias entre ellas.

En el análisis de varianza comprobamos que el efecto que cause el elevar las concentraciones no afecta en gran medida la viabilidad de los organismos, al igual que al incrementar el tiempo de contacto, el factor más importante que afecta notablemente la estructura de los huevos y por ende la viabilidad de estos es sin duda el tipo de agregado que se este utilizando. Pues en la ANOVA de comparar los minerales la significancia fue mucho menor a 0.05 esto nos indico que por lo menos entre dos de los minerales había diferencias significativas.

6 CONCLUSIONES

Se determinó la concentración en el agregado mineral de cada uno de los elementos utilizados en las pruebas a través de un análisis multielemental. El más abundante es el Fe con 15% en promedio, después la plata con un poco más del 12% y por último el Cu que solo se encuentra en un 0.37% del total.

Al inicio de las pruebas se obtuvo la viabilidad total de toda la muestra de los huevos, que fue del 88%, después de haber sido expuestos directamente a los diferentes minerales y elementos la viabilidad fue severamente afectada, pues en algunos casos encontramos una viabilidad nula.

En las pruebas realizadas con una exposición de 30 minutos se observó daño en la estructura de los huevos, al llevar a cabo la incubación, no se reportó la observación de larvas móviles lo cual indicaría viabilidad. En las pruebas hechas con tiempo de contacto de 60 y 90 minutos, en ninguna de ellas hubo la presencia de larvas móviles.

Los daños que ocurrieron en la estructura de los huevos fueron varios, desde la observación de pequeñas trazas del material adheridas a la pared, el cambio de coloración es probablemente por el alto contenido de hierro en el material, la pared también presenta daños en su grosor, en tiempos de mayor contacto (90 min.) se advierte pequeñas fisuras en la pared, lo que provocó que el organismo no llegara al estado larvario (infectante).

La secuencia de inactivación obtenida fue siguiente: **AM, Ag/Cu > Ag > Cu > Ag₂O > CuSO₄ > Cu₂O > Fe > FeS > Fe₂O₃ > Fe₂SO₄**

7 LITERATURA CITADA

- Ayala, I. A. 2007. Efecto desinfectante del ozono sobre huevos de helminto, bacterias y amibas en aguas residuales. Tesis de licenciatura. UNAM, México. D. F. pp. 53
- Biagi, F. 1986. Enfermedades parasitarias. 2da edición. La prensa médica mexicana, S.A. Ed. México D. F. pp. 296
- Baena, G. I. 2005. Estudio de la actividad bactericida de Aceros inoxidable con cobre. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. España. pp. 221.
- Castillo, E. I., Sánchez, V. G. y Rosales, C. F. 1997. Situación de la depuración de aguas residuales Municipales en México. Memorias Técnicas XI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Zacatecas, México. Tomo I, 456-462.
- Escalas, C. A. (2006). Tecnologías y usos de las aguas residuales en México. Tecnologías sostenibles para el tratamiento de aguas y su impacto en los sistemas acuáticos. Consultado en 2009 disponible en : http://tecspar.org/curso_chile/a_escalas/tecnologias_y_usos_de_aguas_residuales_en_mexico_a_escalas.pdf
- Fernández, A. C. y Ortiz R. C. 2005. Evaluación del tratamiento con dosis repetitivas de una asociación albendazol-ivermectina contra las larvas enquistadas de *Toxocara canis* en ratones blancos. Tesis de licenciatura. FESC-UNAM. México. pp. 61.
- Fuentes, S. M. 2006. Fundamentos y avances en la desinfección de aguas residuales tratadas. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. pp. 142.
- García, R. J. 2002. Evaluación de compuestos desinfectantes en la eliminación de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* presentes en agua. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
- Garza, A. V. 2000. Reuso agrícola de las aguas residuales de Cd. Juárez, (Chih., México) [en línea]. En el Valle de Juárez y su impacto en la salud pública. Salud Pública, 1, 3. Consultado en 2009, disponible en http://www.repyn.uanl.mx/3/ensayos/aguas_residuales.html#3
- González, G. T. 2006. Distribución anatómica de larvas somáticas de *Toxocara canis* en la musculatura y tejido cerebral de jerbos mongólicos y ratones blancos de la cepa CD-1. Tesis de licenciatura FESC-UNAM. México. pp.46.
- Guimaraes, J. R., Ibáñez, J., Litter Marta y Pizarro, R. Desinfección de agua. Consultado en 2009 disponible en: <http://www.psa.es/webeng/solwater/files/CYTED01/22cap15.pdf>

- Jagger, J. 1967. Introduction to research in ultraviolet photobiology. Englewood Cliffs. : Prentice-Hall Inc. New Jersey. pp.481.
- Kassar, T. 1998. Helminología veterinaria. 1ra edición, Acribia S. A Ed. Zaragoza, España. pp. 296
- Kachur, A., Cameron, K. y Biaglow, J. 1998. Mechanism Of Cooper- Catalyzed Autoxidation of Cysteine. Free Radical Research. 31:1. pp. 23-34.
- Rojas, V. M. 1998. Evaluación de la factibilidad de utilizar colorantes biológicos para determinar la viabilidad de huevos de helminto. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F. pp. 69
- Miranda, R. M. 2000. Desarrollo, situación actual y aplicación actual de humedales artificiales de flujo horizontal en México. Tesis de Licenciatura. UNAM. México, D. F. pp. 96.
- MacLeod, A.R., Kuo. C. S y Gelinas. R. 1967. Metabolic injury to bacteria. Metabolic injury induced by distilled water or Cu^{++} in the plating diluent. Journal of bacteriology. American Society for Microbiology. Vol. 93, número 3. USA. pp. 961-969.
- Maskew, F., Gordon. C., Geyer, J., y Okun, D. A. 1996. Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. Vol. 2. Ingeniería sanitaria y de aguas residuales. Duodécima reimpresión. Editorial Limusa, S.A de C.V. Grupo Noriega editores. México, D.F. pp.764.
- Nies, D. H., 1999. Microbiol heavy-metal resistance. Appl microbiol biotechnol. Germany. 51:730-750.
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Nación. Junio 22 de 1997, México, D. F.
- Núñez, M.A, Gamiño R., García, D., Garza J., Hernández, P., Cárdenas, A., Martínez, L. y Moreno, L. 2005. Análisis de trihalometanos totales en agua potable del área metropolitana de Monterrey, N.L. Ciencia UANL. Vol.VIII, número 003. pp. 358-361.
- Pelczar, M., Reid, D. R., Chan, E.C.,1993. Microbiología. 4ta Ed. Editorial Mc Graw Hill. México, 1993. pp.826.
- Rojas, V. M., Orta, V. y Franco, V. 2008. Comparación de mecanismos de acción de desinfectantes aplicados en aguas residuales .Aquaforum año 12, núm.49. pp.19-22.
- Romero, G. R., 2005. Desinfección de agua potable y de aguas residuales tratadas por métodos de cloración. Tesis de .Licenciatura. FESZ-UNAM, Mexico. D.F. pp.59.

- Ramalho, R. S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. 2ª edición, Reverte Ed. España. pp. 705.
- Rivera, F. y Calderón, A. 1993. Biotratamiento de aguas negras. Información Científica y Tecnológica, CONACYT. 15: 12-15.
- Romero, C. R. 1994. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 1ra edición. Medica panamericana. Ed. México D.F. pp. 904.
- Sánchez, G. L. 2004. Desinfecciones Alcora, S. Publicación electrónica revisado en 2009 disponible en: http://www.cresca.upc.edu/congreslegionella/2004/ponencies/power-point/PONENCIAS/Luis_A_Sanchez_Ionizacion_metalica.pdf
- Seoáñez, C. M 1999. Aguas residuales: Tratamiento por humedales artificiales, fundamentos científicos, tecnológicos y diseño. Mundi-Prensa (Ed). Madrid, España. pp. 326.
- Simpson, A. J., Cheeseman, H. K., Smith, E. S. y Dean, T. R. 1988. Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. Biochem (Ed). Great Britain. pp. 519-523
- Tay, Z. J., Velasco, C. O., Lara, A. R. y Gutiérrez, Q. M. 2002. Parasitología Médica. Méndez Ed. 7ª Ed. México. pp. 504.
- Torres, R. J. selección y diseño de un sistema de filtración a partir de la comparación de dos medios de filtración para remover huevos de helminto e un efluente primario avanzado. 1999. Tesis de licenciatura. UNAM. México. D.F. pp. 167
- Tortora, J. G., Funke, R., Case, C. L. 1993. Introducción a la microbiología. Ed. Acribia. España. pp. 792
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1986. Design Manual: Municipal Wastewater Disinfection. EPA Office of Research and Development. Cincinnati, Ohio. EPA/625/1-86/021.
- Wilks, S., Michels, H. y Keevil, C. 2005. The survival of *Escherichia coli* 0157 on a range of metal surface. International Journal of Food Microbiology. N. 105. pp. 445-454.
- Wright, H. B., Cairns W. L. 2001. Desinfección de agua por medio de luz ultravioleta. Consultada en 2009 disponible en: <http://www.ingenieroambiental.com/2info/ultravio.pdf>
- Zhang, S. y Crow, S. 2001. Toxic effects of Ag (I) and Hg (II) on *Candida albicans* and *C. maltosa*: a Flow cytometric Evaluation. American Society for Microbiology. Vol. 67, No.9. pp. 4030-4035.

8 ANEXOS

8.1 Técnica para la determinación y cuantificación de huevos de helminto

1)Fundamento

Utiliza la combinación de los principios del método difásico y del método de flotación, obteniendo un rendimiento de un 90%, a partir de muestras artificiales contaminadas con huevos de helminto de Ascaris.

2)Equipo

Centrífuga: Con intervalos de operación de 1000 a 2500 revoluciones por minuto
Períodos de operación de 1 a 3 minutos
Temperatura de operación 20 a 28 °C

Bomba de vacío: Adaptada para control de velocidad de succión
1/3 hp

Microscopio óptico: Con iluminación Köheler
Aumentos de 10 a 100X; Platina móvil; Sistema de microfotografía

Agitador de tubos: Automático
Adaptable con control de velocidad

Parrilla eléctrica: Con agitación

Hidrómetro: Con intervalo de medición de 1.1 a 1.4 g/cm³

Temperatura de operación: 0 a 4 °C

REACTIVOS

- Sulfato de zinc heptahidratado
- Acido sulfúrico
- Eter etílico
- Etanol
- Agua destilada
- Formaldehído

Solución de sulfato de zinc, gravedad específica de 1.3

- Fórmula
- Sulfato de zinc 800 g
- Agua destilada 1,000 ml

Preparación

Disolver 800 g de sulfato de zinc en 1,000 ml de agua destilada y agitar en la parrilla eléctrica hasta homogeneizar, medir la densidad con hidrómetro. Para lograr la densidad deseada agregar reactivo o agua según sea el caso.

Solución de alcohol-ácido

- Fórmula
- Acido sulfúrico 0.1 N 750 ml
- Etanol 350 ml

Preparación

Homogeneizar 750 ml del ácido sulfúrico al 0.1 N, con 350 ml del etanol para obtener un litro de la solución alcohol-ácida. Almacenarla en recipiente hermético.

MATERIAL

- Garrafones de 8 litros
- Tamiz de 160 mm (micras) de poro
- Probetas graduadas (1 litro y 50 ml)
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50 ml
- Pipetas de 10 ml de plástico
- Aplicadores de madera
- Recipientes de plástico de 2 litros
- Guantes de plástico
- Vasos de precipitado de 1 litro
- Bulbo de goma
- Magneto
- Cámara de conteo Doncaster
- Celda Sedwich-Rafter

CONDICIONES DE LA MUESTRA

- 1 Se transportarán al laboratorio en hieleras con bolsas refrigerantes o bolsas de hielo.
- 2 Los tiempos de conservación en refrigeración y transporte deben reducirse al mínimo
- 3 Si no es posible refrigerar la muestra líquida, debe fijarse con 10 ml de formaldehído al 4% o procesarse dentro de las 48 horas de su toma.
- 4 Una muestra sólida debe refrigerarse y procesarse en el menor tiempo posible.

9 INTERFERENCIAS

La sobreposición de estructuras y/o del detritus no eliminado en el sedimento, puede dificultar su lectura, en especial cuando se trata de muestras de lodo. En tal caso, es importante dividir el volumen en alícuotas que se consideren adecuadas.

PRECAUCIONES

- 1 Durante el procesado de la muestra, el analista debe utilizar guantes de plástico para evitar riesgo de infección.
- 2 Lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista.

11 PROCEDIMIENTO

- 1 Muestreo
 - a) Preparar recipientes de 8 litros, desinfectándolos con cloro, enjuagándolos con agua potable a chorro y con agua destilada.
 - b) Tomar 5 litros de la muestra (ya sea del afluente o efluente).
 - c) En el caso de que la muestra se trate de lodo, preparar en las mismas condiciones recipientes de plástico de 1 litro con boca ancha.
 - d) Tomar X gramos de materia fresca (húmeda) que corresponda a 10 g de materia seca.
- 2 Concentrado y centrifugado de la muestra
- 3 La muestra se deja sedimentar durante 3 horas o toda la noche.
- 4 El sobrenadante se aspira por vacío sin agitar el sedimento.

- 5 Filtrar el sedimento sobre un tamiz de 160 mm (micras), enjuagando también el recipiente donde se encontraba originalmente la muestra y lavar enseguida con 5 litros de agua (potable o destilada).
- 6 Recibir el filtrado en los mismos recipientes de 8 litros.
- 7 En caso de tratarse de lodos, la muestra se filtrará y enjuagará en las mismas condiciones iniciando a partir del inciso c.
- 8 Dejar sedimentar durante 3 horas o toda la noche.
- 9 Aspirar el sobrenadante al máximo y depositar el sedimento en una botella de centrífuga de 250 ml, incluyendo de 2 a 3 enjuagues del recipiente de 8 litros.
- 10 Centrifugar a 400 g por 3 minutos (1,400 - 2,000 rpm por 3 minutos, según la centrífuga).
- 11 Decantar el sobrenadante por vacío (asegurarse de que exista la pastilla) y resuspender la pastilla en 150 ml de $ZnSO_4$ con una densidad de 1.3.
- 12 Homogeneizar la pastilla con el agitador automático, o aplicador de madera.
- 13 Centrifugar a 400 g por 3 minutos (1,400 - 2,000 rpm por 3 minutos).
- 14 Recuperar el sobrenadante virtiéndolo en un frasco de 2 litros y diluir cuando menos en un litro de agua destilada.
- 15 Dejar sedimentar 3 horas o toda la noche.
- 16 Aspirar al máximo el sobrenadante por vacío y resuspender el sedimento agitando, verter el líquido resultante en 2 tubos de centrífuga de 50 ml y lavar de 2 a 3 veces con agua destilada el recipiente de 2 litros.
- 17 Centrifugar a 480 g por 3 minutos (2,000 - 2,500 rpm por 3 minutos, según la centrífuga).
- 18 Reagrupar las pastillas en un tubo de 50 ml y centrifugar a 480 g por minutos (2,000 - 2,500 rpm por 3 minutos).
- 19 Resuspender la pastilla en 15 ml de solución de alcohol-ácido (H_2SO_4 0.1 N) + C_2H_5OH a 33-35% y adicionar 10 ml de éter etílico.
- 20 Agitar suavemente y abrir de vez en cuando los tubos para dejar escapar el gas (considerar que el éter es sumamente inflamable y tóxico).

- 21 Centrifugar a 660 g por 3 minutos (2,500 - 3,000 rpm por 3 minutos, según la centrífuga).
- 22 Aspirar al máximo el sobrenadante para dejar menos de 1 ml de líquido, homogeneizar la pastilla y proceder a cuantificar.
- 23 Identificación y Cuantificación de la Muestra
 - a) Distribuir todo el sedimento en una celda de Sedgwich-Rafter o bien en una cámara de conteo de Doncaster.
 - b) Realizar un barrido total al microscopio.

CÁLCULOS

- 1 Para determinar los rpm de la centrífuga utilizada, la fórmula es:

$$\sqrt{\frac{Kg}{r}}$$

Donde:

g: fuerza relativa de centrifugación

K: constante cuyo valor es 89,456

r: radio de la centrífuga (spindle to the centre of the bracker) en cm

La fórmula para calcular g es:

$$g = \frac{r(rpm)^2}{K} \text{ ;Error! Argumento de modificador no especificado.}$$

Para expresar los resultados en número de huevecillos por litro es importante tomar en cuenta el volumen y tipo de la muestra analizada.

8.2 Método de Flotación por la técnica de Faust.

- 1) Se mezcla y homogeniza en un vaso de precipitado parte de la muestra con 25 ml de solución fisiológica.
- 2) Se pasa por un embudo con un filtro a un tubo de centrifuga buscando retener los residuos más voluminosos.
- 3) La suspensión obtenida en la etapa anterior se centrifuga a 2500 revoluciones por minuto durante 5 minutos.
- 4) Se descarta el sobrenadante y se secando vuelve resuspender el sedimento en solución fisiológica por agitación, volviendo a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
- 5) El último sedimento se resuspende en una solución de sulfato de zinc al 33 % de densidad esta suspensión se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.
- 6) Del material obtenido se extrae una muestra del material suspendido en el menisco superior de la interfase líquido/aire de donde se extrae mediante asa o pipeta Pasteur.