

Recuento e identificación de huevos de helmintos en aguas residuales urbanas de la Región de Murcia

Por: **Pedro Simón Andréu¹**; **Carlos Lardín Mifsut¹**; **Silveria Pacheco Ballarín²**

¹**Entidad de Saneamiento y Depuración de la Región de Murcia (ESAMUR).**
C/Madre Paula Gil Cano. Edificio Torre Jemeca, 9º.30009 Murcia.
Tel: 968.879.520, Fax: 968.721.047, www.esamur.com

²**TECNOMA, S.A.**
Avda. Juan Carlos I. Edificio Central, bajo.30100 Espinardo (Murcia)
Tel: 968.879.515; Fax: 968.899.795; spacheco@tecnoma.es

Resumen

El recuento e identificación de huevos de helmintos presentes en las aguas residuales resulta imprescindible para cumplir los criterios de calidad de las aguas de reutilización recogidos en el Real Decreto 1620/2007. El estudio se lleva a cabo sobre influentes, efluentes secundarios y/o efluentes terciarios de estaciones depuradoras de la Región de Murcia. El recuento se realiza mediante el método Bailenger modificado y la identificación en base a criterios morfológicos y morfométricos. Los resultados muestran el grado de cumplimiento de la normativa de reutilización, así como la incidencia de las diferentes especies de huevos de helmintos en los influentes de las EDAR's.

Palabras clave: Agua residual, huevos, helmintos, recuento, identificación, Real Decreto 1620/2007.

Abstract

Count and identification of helminth eggs in Murcia Region municipal wastewater

Helminth eggs count and identification in wastewater is essential to comply with wastewater reuse quality guidelines of Real Decreto 1620/2007. This study was performed on influents, secondary effluents and/or tertiary effluents of Murcia Region wastewater treatment plants (WWTPs). Count is performed by the modified Bailenger's method, and the identification is based on morphological and morphometric criteria. Results show the degree of compliance with wastewater reuse regulations, and incidence of different species of helminth eggs present in influent wastewater to WWTPs.

Keywords: Wastewater, eggs, helminths, count, identification, Real Decreto 1620/2007.

1. Introducción

La reducción cada vez más acentuada de las masas de aguas continentales ha supuesto un incremento del uso de aguas depuradas y regeneradas para riego de cultivos. Es por ello que deben cumplirse unas premisas sanitarias que hagan que la reutilización de aguas no suponga un riesgo para la salud humana.

En este sentido, se ha publicado la normativa legal específica para la reutilización de aguas depuradas en nuestro país; contenida en el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

Con estos antecedentes, resulta de extraordinario interés poder caracterizar en los efluentes de las diferentes estaciones depuradoras de agua residual (EDAR) de la Región de Murcia los parásitos patógenos humanos que puedan estar presentes en el agua residual. Asimismo, conviene evaluar el rendimiento de las plantas depuradoras en cuanto a la eliminación de parásitos, en las distintas fases de la misma, en aras de su mejora, y disponer de una herramienta para establecer un programa de vigilancia sanitario. Por todo ello, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, a través de la Consejería de Sanidad, y la Entidad de Saneamiento y Depuración han elaborado un Convenio de Colaboración para la identificación de microorganismos presentes en las aguas residuales de interés sanitario y su comportamiento en los procesos de depuración habitualmente utilizados en las EDAR de la Región.

Desde el punto de vista parasitológico las aguas residuales pueden contener estructuras diversas como quistes y ooquistes de protozoos, huevos, larvas y adultos de helmintos de vida libre y, huevos y larvas de helmintos parásitos.

Los helmintos son animales invertebrados de cuerpo alargado con simetría bilateral y órganos definidos, con reproducción sexual y tamaño variable. Pueden dividirse en dos grupos, los platelmintos o helmintos planos (cestodos y trematodos) (**Figura 1-B,C**) y los nematelmintos o helmintos redondos (nemátodos) (**Figura 1-A**). Se reproducen sexualmente formando huevos fértiles, que dan 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 intermediarios hasta transformarse en adultos.

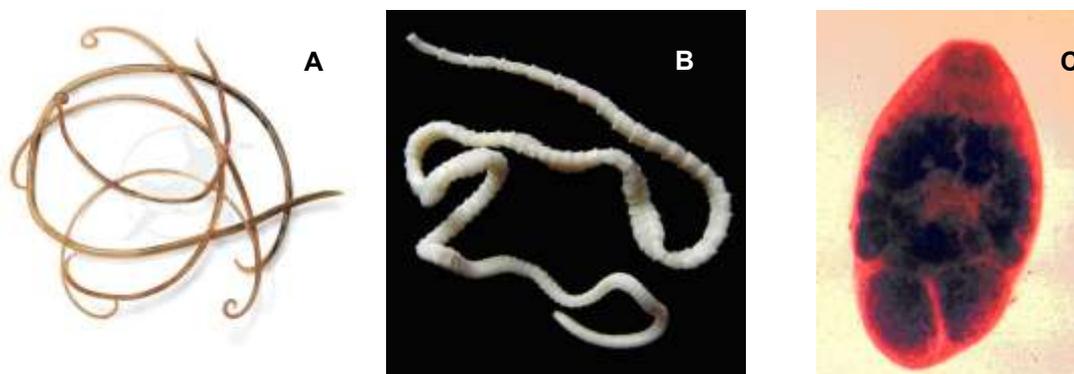


Figura 1. A: Nematodos; **B:** Cestodo; **C:** Trematodo.

2. Material y método de determinación

2.1. Estaciones de muestreo

Se han llevado a cabo diversos muestreos para realizar el análisis parasitológico de influente, efluente secundario y efluente terciario de 35 estaciones depuradoras de la Región de Murcia. A continuación se describen esquemáticamente las instalaciones de depuración seleccionadas como estaciones de muestreo:

Cod.	EDAR	Vol. Anual tratado (m3)	AÑO CONSTRUCCIÓN	CAPACIDAD (m3/d)	Tipo de Tratamiento
01A	Abanilla	423.746	2001	1.500	F.A. - AP + Filtr Arena + UV
02A	Abarán	747.478	2002	4.500	F.A. - AP
03A	Águilas	1.995.860	1980	8.000	F.A. - Conv + Coag + Floc + Filtr Arena + UV
05A	Alcantarilla	3.055.683	2001	13.000	F.A. - DE
08A	Alhama	1.281.085	2003	5.400	F.A. - AP + Filtr Arena Cerrados + UV
09A	Archena	1.690.491	2001	7.500	F.A. - AP
10A	Beniel	672.428	2005	5.000	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filtr. arena + UV
13A	Calasparra	848.346	R2005	6.000	F.A. - AP + MBR + UV
15A	Caravaca de la Cruz	1.722.302	2005	8.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filtr + UV
16A	Cabezo Beaza	9.084.226	2001	35.000	F.A. - Conv
16C	Mar Menor Sur	3.520.421	1998	50.000	F.A. - AP
18A	Ceutí	944.637	2007	8.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filtr. anillas + UV
19A	Cieza	2.137.862	2001	10.000	F.A. - AP
20A	Fortuna	506.845	2004	2.500	F.A. - AP + Filt Anillas + UV
21A	Fuente Álamo	547.150	2005	4.500	F.A. - AP + Filtr + Coag + Floc + UV
22An	Jumilla	1.865.906	2007	12.000	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt Arena + UV
23A	Librilla	251.022	2004	2.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt Arena + UV
24A	La Hoya	2.813.106	1999	20.000	F.A. - DE + UV
25A	Lorquí	1.267.272	2006	5.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt Arena + UV
26An	Mazarrón	3.557.740	2004	15.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt Anillas + UV
27An	Molina Norte	4.735.786	2003	25.000	F.A. - DE + Lamin + Coag + Floc + Filt Arena + UV
28A	Moratalla	480.460	2005	4.500	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt Arena + UV
29AN	Mula nueva	1.289.388	2007	6.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt discos + UV
30A	Murcia Este	27.081.217	2000	100.000	F.A. - A2O modificado
30F	El Raal	1.851.716	R2008	4.200	F.A. - AP
33AN	Puerto Lumbreras	128.631	2008	5.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt arena + UV
35A	San Javier	3.474.260	2007	22.500	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt arena + UV
36A	San Pedro	2.647.054	2007	20.000	F.A. - MBR + UV
37A	Torre Pacheco	1.285.622	2004	5.000	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt Anillas + UV
37H	Roldán, Lo Ferro, Balsicas	579.116	2006	5.500	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt arena + UV
38A	Torres de Cotillas	1.420.237	2007	12.000	F.A. - AP + Coag + Floc + Filt arena + UV
39A	Totana	1.520.445	2001	6.000	F.A. - AP
41A	La Unión	706.882	2002	4.100	F.A. - AP + Filt Anillas
43A	Yecla	1.451.605	2007	8.000	F.A. - AP + Lamin + Coag + Floc + Filt arena + UV
901B	Santomera Norte	956.916	2004	4.000	F.A. - AO

88.542.941

FA	Fangos activos
AP	Aireación prolongada
AO	Orbal
UV	Desinfección Ultravioleta
DE	Doble Etapa
Lamin	Depósito laminación

Los 59 muestreos se han llevado a cabo sobre 35 instalaciones de depuración seleccionadas. El volumen de agua residual tratado anualmente por estas instalaciones supone el 89% del volumen total de agua residual que se depura cada año en la Región de Murcia, sucediéndose de forma aleatoria las depuradoras con tratamiento secundario y las instalaciones con procesos de regeneración más avanzados.

2.2. Método de determinación

El análisis parasitológico se ha realizado empleando un método difásico de sedimentación/flotación (Ayres & Mara, 1996) basado en la técnica de examen coprológico de Bailenger (1979), metodología propuesta por la OMS y recomendada como método de recuento por el RD 1620/2007.

Las muestras, 2 litros para influentes y 25 para efluentes, una vez en el laboratorio, fueron sometidas a un proceso de sedimentación en un recipiente abierto de paredes rectas durante un mínimo de 12 horas. Se eliminó el 90% de sobrenadante mediante bomba de succión y el sedimento, una vez bien lavado el contenedor con solución detergente, fue transferido a tubos de centrifuga y centrifugado a 1000 g durante 15 minutos. Tras centrifugarlo se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido fue resuspendido en un volumen de solución tampón acetato-acético de pH 4,5. A continuación se añadió un volumen de éter dietílico o de acetato de etilo igual al doble del volumen del sedimento obtenido. Se agitó vigorosamente la solución y se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos. Se obtuvo así una distribución en fases (fase etérea superior, tapón intermedio sólido lipófilo y fase acuosa inferior) y sedimento sólido. Las fases superiores se eliminaron y se conservó el sedimento, donde están concentrados los huevos de helmintos.

De este sedimento, se transfirieron alícuotas de 0.05 ml a un portaobjetos, cubriéndose con cubreobjetos y examinando toda la preparación al microscopio con un objetivo de 20x, utilizándose el de 40x para confirmar el diagnóstico. Para mayor precisión se realizaron observaciones de diversas alícuotas representando como mínimo el 15% del volumen total del sedimento bruto. En el caso de depuradoras con tratamiento terciario de depuración y/o en aquellas muestras en las que el volumen de sedimento final fue muy pequeño, se observó todo el sedimento entre porta y cubreobjetos.

La identificación se realizó en base a criterios morfológicos y morfométricos. El uso de un micrómetro ocular para conocer la dimensión de los huevos, además de resultar imprescindible a la hora de su identificación, permitió descartar especies con igual morfología pero con dimensiones diferentes a las humanas por ser su procedencia de origen animal (**Imagen 1**). Asimismo, el uso de estos criterios para la identificación de los huevos resultó determinante a la hora de distinguir estructuras que podrían ser consideradas como huevos (**Imagen 2**), debido a su gran similitud.



Imagen 1.- Huevo de Tricórido de gran tamaño (76 x 35 μm) (origen animal)



Imagen 2.- Tecameba (arriba) y huevo de *Hymenolepis diminuta* (abajo).

La concentración de huevos se calculó mediante la ecuación:

$$N = AX/PV$$

donde:

N = número de huevos por litro de la muestra

A = número de huevos contados en el volumen observado

X = Volumen del producto final (en ml)

P = volumen observado (en ml)

V = volumen de muestra original (en litros)

3. Resultados

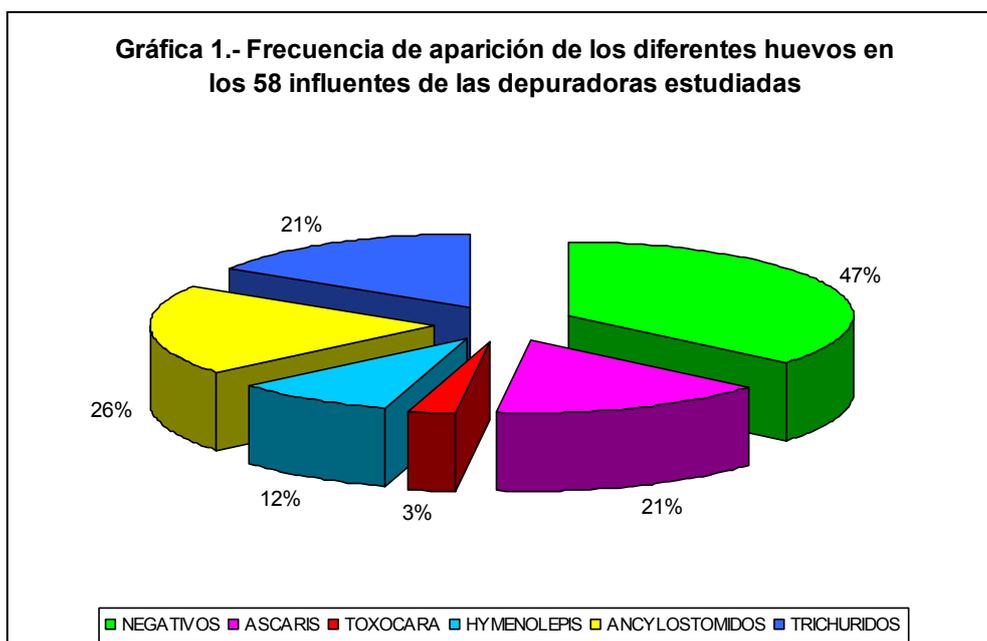
Los resultados que se exponen a continuación hacen referencia, no sólo a los géneros *Ancylostoma*, *Trichuris*, *Ascaris* y *Taenia* (RD 1620/2007), sino a todas las especies potencialmente patógenas para el hombre encontradas en las muestras estudiadas.

Los resultados obtenidos en cada muestreo, para cada depuradora, se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Nº de huevos de helmintos/l encontrados en las EDAR participantes en el estudio en los muestreos realizados.

	Influyente	Efluente 2º	Efluente 3º		Influyente	Efluente 2º	Efluente 3º
Muestreo 1	6,3	<0,1	-	Muestreo 31	<1	<0,1	-
Muestreo 2	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 32	<1	1,3	<0,1
Muestreo 3	<1	<0,1	-	Muestreo 33	<1	0,8	<0,1
Muestreo 4	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 34	30	<0,1	-
Muestreo 5	<1	0,1	-	Muestreo 35	50	0,8	<0,1
Muestreo 6	-	0,8	-	Muestreo 36	50	0,75	-
Muestreo 7	8	<0,1	<0,1	Muestreo 37	7,2	<0,1	<0,1
Muestreo 8	50	<0,1	<0,1	Muestreo 38	8,8	<0,1	-
Muestreo 9	1	<0,1	-	Muestreo 39	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 10	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 40	2	<0,1	<0,1
Muestreo 11	4,4	0,26	<0,1	Muestreo 41	3,1	<0,1	<0,1
Muestreo 12	1,3	<0,1	-	Muestreo 42	12,5	<0,1	<0,1
Muestreo 13	60	1,3	<0,1	Muestreo 43	<1	-	<0,1
Muestreo 14	60	2,5	-	Muestreo 44	<1	<0,1	-
Muestreo 15	6,6	<0,1	<0,1	Muestreo 45	<1	<0,1	-
Muestreo 16	1,8	<0,1	-	Muestreo 46	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 17	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 47	1	<0,1	<0,1
Muestreo 18	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 48	<1	<0,1	-
Muestreo 19	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 49	3,8	<0,1	<0,1
Muestreo 20	2	<0,1	<0,1	Muestreo 50	1	<0,1	<0,1
Muestreo 21	7,2	-	<0,1	Muestreo 51	1	<0,1	-
Muestreo 22	<1	<0,1	-	Muestreo 52	8,3	<0,1	<0,1
Muestreo 23	<1	<0,1	-	Muestreo 53	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 24	6	<0,1	<0,1	Muestreo 54	1,5	<0,1	<0,1
Muestreo 25	<1	<0,1	-	Muestreo 55	<1	<0,1	-
Muestreo 26	<1	<0,1	<0,1	Muestreo 56	2,4	<0,1	<0,1
Muestreo 27	<1	<0,1	-	Muestreo 57	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 28	150	<0,1	-	Muestreo 58	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 29	5	<0,1	<0,1	Muestreo 59	<1	<0,1	<0,1
Muestreo 30	167	<0,1	<0,1				

En la gráfica 1 se muestra la frecuencia de aparición de las diferentes especies de helmintos halladas en los influentes analizados:



Como muestra la **Gráfica 1**, no se han detectado huevos de helmintos parásitos en el 47% de los muestreos realizados en influentes (27/58). Todos los huevos de helmintos detectados pertenecen a un total de cinco géneros de Cestodos y Nematodos, no habiéndose encontrado ningún huevo de Trematodo.

Los huevos de Ancylostómidos (**Figura 2-E**) han sido los que se han detectado en mayor número de ocasiones (15/58) respecto al total de huevos encontrados en los influentes analizados. *Ancylostoma* parasita tanto a humanos (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*) como a animales.

También se han encontrado huevos de *Ascaris* (**Figura 2-A,B,C**) y *Trichuris* (**Figura 2-D**) en un 21 % de los influentes estudiados (12/58 para ambas especies). *Áscaris* es el mayor nematodo intestinal parásito de la especie humana y del cerdo, y llega a alcanzar 40 cm. de longitud. *Trichuris* es un helminto de distribución universal cuya infestación suele ser asintomática, aunque las infestaciones masivas provocan problemas digestivos.

Un 12% de los huevos encontrados en influentes pertenecen a la clase Cestoda (7/58), concretamente al género *Hymenolepis* (**Figura 2-G,H**). La *hymenolepiosis* constituye la causa más frecuente de infección por cestodos en el sureste de Estados Unidos y Latinoamérica. De las dos especies patógenas para el hombre, la *Hymenolepis nana* es la más frecuente ya que es el único cestodo cuyo ciclo biológico no requiere de hospedador intermediario y puede haber autoinfección interna. La infección se adquiere a partir de agua, alimentos y manos contaminadas.

Otro tipo de huevo hallado en los influentes analizados es el de *Toxocara* (2/58) (**Figura 2-I**). El género *Toxocara* contiene varias especies de gusanos parásitos, propio de los cánidos y félidos, y sólo secundariamente afectan al ser humano, produciendo la enfermedad denominada “larva migrans visceral” o “larva migrans ocular”.

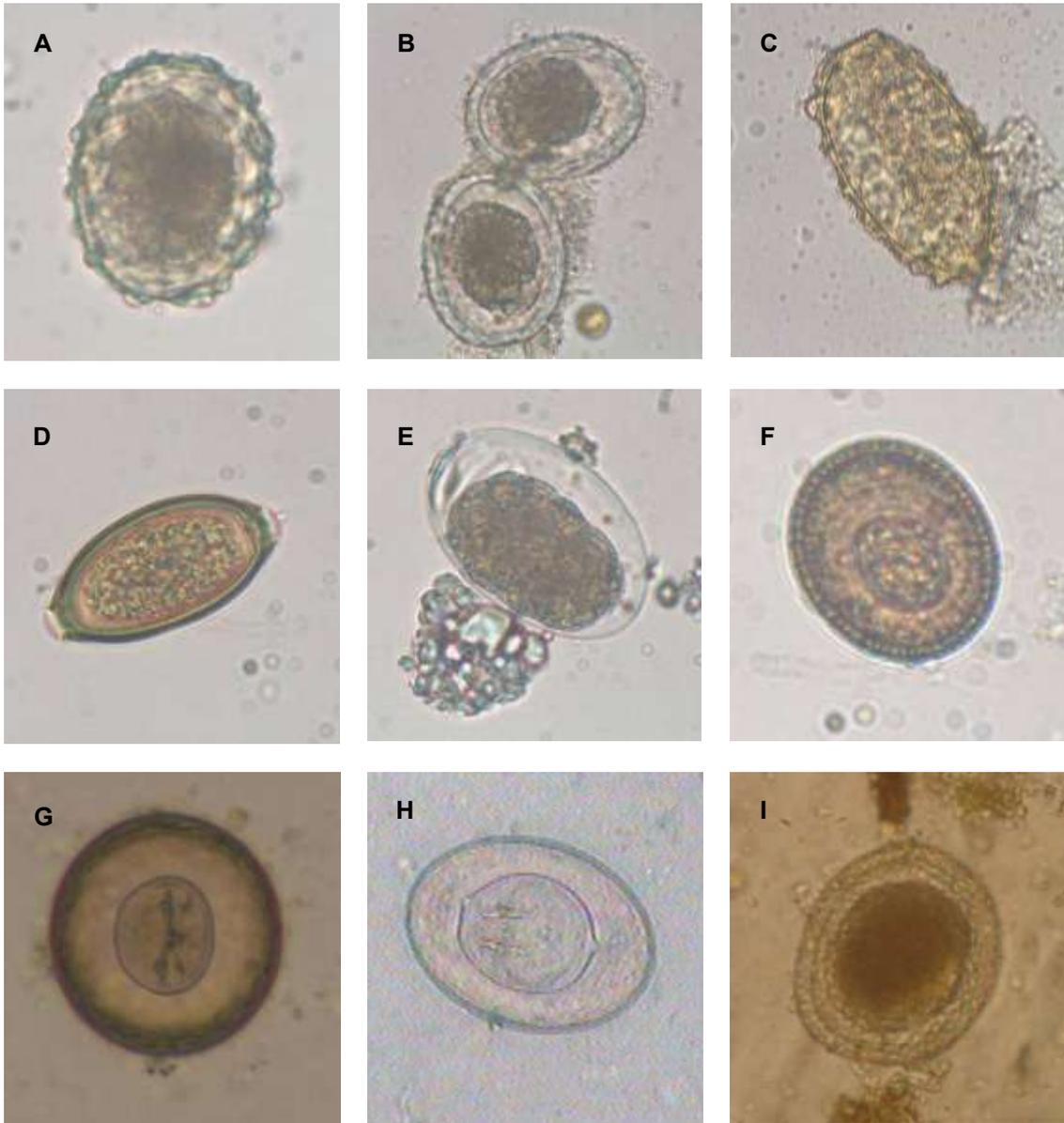


Figura 2. Fotografías de huevos detectados. **A, B, C:** *Ascaris sp.* (**A:** corticado y fértil, 68x55 μm ; **B:** decorticado y fértil, 65x52 μm ; **C:** corticado e infértil, 100x52 μm); **D:** *Trichuris sp.* (56x28 μm); **E:** Ancilostomátido (68x46 μm); **F:** *Taenia sp.* (41x36 μm); **G:** *Hymenolepis diminuta* (76x72 μm); **H:** *Hymenolepis nana* (50x42 μm); **I:** *Toxocara sp.* (90x75 μm).

Durante las analíticas realizadas se detectó también alguna estructura parasitaria compatible con ooquiste de *Eimeria*, coccidio parásito de muchas aves y mamíferos domésticos, pero no del hombre. Además, se han detectado numerosas larvas, huevos y algunos adultos de nematodos de vida libre, como por ejemplo *Heterodera* spp. (**Imagen 3**), nematodo parásito de vegetales. Así mismo, también se detectó un gran número de huevos de ácaros en diferentes estadios de evolución.



Imagen 3. Huevo de *Heterodera*

De las 57 muestras de efluentes analizadas tras tratamiento secundario, un 84 % no presentaban huevos de helmintos tras la decantación. Las especies detectadas tras la decantación secundaria han sido *Taenia* (**Figura 2-F**), *Ascaris*, *Toxocara*, *Hymenolepis*, *Trichuris* y *Ancylostoma*. La frecuencia de aparición de estas especies en el efluente de decantación fue muy similar, por lo que no depende de las características morfológicas de los huevos, siendo achacable a episodios de bulking filamentoso, lo que puede provocar salidas puntuales de sólidos y, por tanto, huevos con el clarificado.

En ninguno de los efluentes de plantas con tratamiento terciario se detectaron huevos de helmintos.

4. Conclusiones

- Casi la mitad de los muestreos realizados (47%) no presenta huevos de helmintos parásitos en su influente.
- En los 57 muestreos realizados en los tratamientos secundarios, el 84% de las EDAR estudiadas no presenta huevos de helmintos parásitos tras el tratamiento secundario.
- De los efluentes de las depuradoras estudiadas, el 93% cumplía los criterios de calidad exigidos por el Real Decreto 1620/2007 para ser considerados como aptos para riego agrícola por presentar en sus efluentes < 1 huevo/10 l.
- Los huevos de *Ancylostoma* (26%), *Ascaris* y *Trichuris* (21%) son los más frecuentes en los influentes de estas EDAR, seguidos de los de *Hymenolepis* (12 %). La himenolepiosis, o parasitación por *Hymenolepis* es rara en nuestro país, pero su incidencia en niños se ha incrementado, por lo que debería ser investigada en nuestro medio dada la facilidad de transmisión que presenta.
- Hay que señalar que, aunque el género *Toxocara* parasita perros y gatos, puede producir zoonosis en el hombre, dando lugar al denominado “síndrome de larva migrans visceral”, por lo que debe ser tenido en cuenta ya que, además, ha sido hallado en influentes (3%) y efluentes secundarios en el presente estudio.
- El RD 1620/2007 establece la determinación de, al menos, los géneros *Ascaris*, *Trichuris* y *Ancylostoma*, sin embargo, el presente estudio pone de manifiesto la presencia de huevos de otros géneros de helmintos parásitos (*Toxocara*, *Hymenolepis*, *Taenia*) que, si bien no “escapan” a los tratamientos terciarios, podrían también recogerse en la legislación bajo el título Helmintos parásitos.
- No se ha podido determinar si el origen de los huevos hallados en los análisis realizados es animal o humano. De cualquier forma, los huevos identificados podrían producir infestaciones en el hombre, por lo que no pueden ser menospreciados.
- **En ninguno de los efluentes terciarios analizados se han detectado huevos de helmintos parásitos.**
- Aunque el Real Decreto 1620/2007 señala una frecuencia mínima de muestreo y análisis de nematodos intestinales quincenal en el agua depurada para uso agrario, ampliable a un mes si tras un año de control resulta improbable su presencia en agua, con los resultados expuestos en este estudio se considera que esta frecuencia podría alargarse hasta, al menos, tres meses en el caso de depuradoras con tratamiento terciario, tras demostrar durante un año, con el control quincenal, que el agua a reutilizar no contiene elementos parasitarios.

Bibliografía

- (1) AYRES, R.M & DUNCAN MARA, D. (1996) Análisis de aguas residuales para su uso en agricultura. Manual de técnicas parasitológicas y bacteriológicas de laboratorio. Organización Mundial de la salud, Ginebra. (1996).
- (2) OMS (1989). Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Serie de Informes Técnicos 778. Organización Mundial de la salud.
- (3) Identificación de huevos por helmintos en aguas residuales. Artículos técnicos 221 febrero del 2002. Tecnología del agua.
- (4) Soto Beltrán Marcela, Chaidez Quiroz Cristóbal, Gortáres Moroyoqui Pablo, Rubio Carrasco Werner, Martínez Rodríguez Célida, Meza Astorga Paola, Castro del Campo Nohelia. “Incidencia de Cryptosporidium y Giardia en Agua de Irrigación en el Valle de Culiacán, Sinaloa”. XIV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, Sinaloa, Mayo del 2004.
- (5) OMS (2006). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Vol- 2. Wastewater use in agriculture. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- (6) Bailenger J. (1979). Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. J. Am. Med. Tec., 41: 65-71.
- (7) Perez O.G. Eficacia del tratamiento biológico convencional utilizado en la estación depuradora L’Horta Nord-Conca de Carraixet (Alboraia, Valencia España), para la eliminación de los Huevos de Helmintos de las aguas residuales. Clon Revista Institucional de La Universidad de Pamplona. Pamplona: n.1, p.5 - 16, 2003.
- (8) Gracenea, M., Montoliu, I. (2007) Presencia de Huevos de Helmintos Parásitos en Aguas Residuales: Estudio Cualitativo y Cuantitativo. Implicaciones Sanitarias de su Reutilización. Ponencias AEAS.
- (9) Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- (10) Lucas Sáez E., Fleta Zaragoza J., Gracia Casanova M., Vázquez Olivares M., Gallego Vela S., Clavel Parrilla A.y Llorente Cereza M.T. Himenolepiosis intestinal en la infancia. Anales de Pediatría, Volumen 58 - Número Supl.3 p. 1 – 72. 52 Congreso de la Sociedad Española de Pediatría.