



Unidad de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de Servicio Social del Proyecto:
Identificación de entidades parasitarias (especialmente Helmintos) de interés para la salud por observación microscópica, así como la determinación de compuestos con actividad mutagénica en muestras de aguas residuales y potables de la Ciudad de México.

Quien presenta:
Ana Karina Esquivel González

Lugar:
Sistema de Aguas de la Ciudad de México
Subdirección para el Análisis y Gestión de la Calidad del Agua

Periodo de realización:
23 de Septiembre del 2019 - 23 de Marzo del 2020

Asesor interno:
Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

Asesor externo:
M. en C. Luis Antonio Nava Vargas

Introducción

La Organización Mundial de la Salud refiere que el agua es indispensable para la vida y es necesario poner a disposición de los consumidores un abastecimiento satisfactorio y de calidad.

El abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades, para lo cual, se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características microbiológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas, con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua en los sistemas, hasta la entrega al consumidor (NOM-127. 1994).

Para que el agua pueda ser considerada apta para consumo humano, esta debe garantizar que no presenta en su composición contaminantes objetables (químicos o agentes infecciosos) y que no tiene un efecto nocivo para la salud, si el agua cumple con estas características se le puede denominar como agua potable. Por su parte, las aguas de tipo residual, son de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (NOM-001. 1996). Ante la escasez de recursos hídricos, la explosión demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales tratadas es una importante alternativa como fuente adicional de suministro, particularmente para riego agrícola (NMX-113. 2012). Esta última práctica es muy común debido a su alta concentración de nutrientes, lo cual mejora el rendimiento de las cosechas, sin embargo, la presencia de contaminantes puede generar riesgos sanitarios para los agricultores y los consumidores de los productos, en especial cuando se trata de aquellos que se consumen crudos (sin procesos de cocción) como las hortalizas (Beltrán, M. & et al. 2018). Los helmintos representan un elevado riesgo a la salud humana debido a que sus diversos estadios infecciosos (huevos embrionados o larvas) son altamente persistentes en el agua contaminada. Así, el agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales, sobre todo cuando ésta se emplea para el riego de cultivos (Gallego, L. M & et al. 2014).

Por otra parte, de entre todos los contaminantes que se puedan presentar en el agua, existen algunos que son menos probables o cuya presencia está en bajas concentraciones, sin embargo, resulta importante identificar aquellas muestras que puedan contenerlos por el riesgo potencial que representan; estos son los compuestos mutagénicos. Básicamente, estos son agentes que pueden cambiar o alterar la información genética de un organismo, causando con esto mutaciones (Albaladejo, R. & et al. 1995). Enfermedades como el cáncer pueden presentarse por una mutación somática, aunque para llegar a representar un problema grave, sus concentraciones deben ser elevadas, y de exposición prolongada, sin embargo, la determinación de sustancias capaces de inducir

mutaciones genéticas se ha convertido en un importante proceso dentro de la evaluación y control de la seguridad ambiental y debe ser incluida como parámetro adicional en el monitoreo de la calidad del agua (Albaladejo, V. R & et al. 2003). El ensayo de mutagenicidad son *S. typhimurium* (test de Ames) ha sido ampliamente empleado para la detección de mutagenicidad en aguas.

Teniendo presente el panorama anterior y sabiendo que los problemas de salud relacionados con agua es un problema latente, es que resulta necesario monitorearla, por esta razón, en la CDMX se encuentra el Sistema de Aguas de la Ciudad de México (SACMEX) que es el ente gubernamental responsable de la operación del Sistema Hidráulico de la Ciudad de México; formando parte de esta institución está el Laboratorio Central de Control de Calidad del Agua que se diseñó y construyó para medir la calidad del agua. Este cuenta con las instalaciones y equipo necesario para realizar los análisis físicos, químicos y biológicos de los parámetros que evalúan la calidad del agua potable, residual y residual tratada. Como medio de organización, el laboratorio Central de Control está dividido en secciones analíticas que se dedican a la determinación de parámetros específicos, dentro de los cuales se encuentran: Bacteriología de agua potable, fisicoquímicos de agua potable, análisis de metales y químicos inorgánicos, análisis de orgánicos, análisis especiales, virología, toxicidad, control de calidad, parasitología y mógatenos, en estos dos últimos es donde se llevó a cabo la presente investigación.

Objetivo General

Identificar y cuantificar huevos de helminto que puedan representar un riesgo para la salud que estén presentes en las muestras de aguas residuales y potables, así como la presencia o ausencia de compuestos mutagénicos en las mismas, con el fin de evaluar la calidad del agua.

Objetivos específicos

- Identificar puntos del muestreo en la Ciudad de México que representen un riesgo a la salud, tanto en agua potable como residual.
- Identificar y cuantificar huevos de helminto siguiendo un método certificado para aguas residuales y potables.
- Identificar presencia o ausencia de compuestos mutagénicos en aguas residuales y potables, siguiendo un método de concentración-extracción y la prueba de Ames, de acuerdo a fuentes bibliográficas.
- De acuerdo a los resultados, evaluar la eficiencia de los tratamientos a los que el agua es sometida.

Fundamento teórico

Los parásitos y la salud

Los parásitos intestinales representan un problema de salud pública, especialmente para los habitantes de las regiones tropicales y subtropicales. Los países en vías del desarrollo mantienen elevadas tasas de prevalencia debido a las deficientes condiciones de saneamiento ambiental, la pobreza, la falta de medidas de control y prevención adecuadas (Fausi, A. & et al. 2018).

Cuando nos referimos a un parásito, se habla de un microorganismo que vive sobre otro organismo (llamado huésped) o en su interior y se beneficia del huésped, obteniendo nutrientes, por ejemplo. Aunque esta definición se aplica a bacterias, hongos y virus, el término suele referirse sobre todo a: Los protozoos (como las amebas) y los gusanos (helmintos) (NMX-113. 2012), que se encuentran dentro de los agentes etiológicos de las infecciones gastrointestinales, cuya identificación y cuantificación de sus huevos en muestras de aguas es uno de los objetos de estudio de este proyecto.

Los gusanos adultos habitan en el intestino delgado, donde depositan sus huevos, que salen con las heces del hospedero. La transmisión es de hombre a hombre mediante la ingestión de huevos embrionados. Las manifestaciones clínicas están en relación a la carga parasitaria, siendo escasas en las infecciones leves a moderadas y acentuadas en los casos de infecciones masivas. Se puede llegar a producir anorexia, dolor abdominal, prurito alrededor del ano, irritabilidad y diarreas (Acosta L. & et al. 2016).

Helminto

El término helminto es designado a un amplio número de organismos que incluyen a todos los gusanos parásitos (de humano, animales y vegetales) y de la vida libre, con forma y tamaño variado. Estos poseen órganos diferenciados y sus ciclos de vida comprenden la producción de huevos o larvas (infecciosas o no) y la alternancia compleja de estadios que incluyen hasta tres huéspedes diferentes (NMX-113. 2012).

Pertenecen al subreino de los Metazoarios, lo cual indica que son animales multicelulares, en las cuales las células se hayan diferenciadas formando órganos con funciones especiales, y además divididos en dos ramas; los Platelmintos (gusanos planos) y los Nematelmintos (gusanos redondos). A su vez, lo primeros están subdivididos en dos clases; los Tremátodos (duelas) y los Céstodos (tenias). Los Nematelmintos por su parte, incluyen la clase Nemátodo, de los cuales algunos son parásitos del hombre mientras que la mayoría son formas de vida libre o parásitos de los animales y de las plantas (Fausi, A. & et al. 2018).

Aunque los parásitos de Helminto no son estudiados generalmente por los microbiólogos, su presencia en aguas (sobre todo residuales) es de gran preocupación con respecto a la salud humana debido a sus diversos estadios infecciosos (Acosta L. et al. 2016). El huevo constituye la etapa más contagiosa de los parásitos de helminto; son excretados en las heces y se extienden a las aguas residuales, en el suelo o en los alimentos. Así, el agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se

encuentre en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales (NMX-113. 2012).

Morfología de los huevos buscados en las muestras de aguas residuales

Debido a las formas y características definidas que presentan los huevos de helminto, es que se pueden identificar visualmente una a una las estructuras de estos. El tamaño de estos oscila entre los 10-100 μm , con una densidad de entre 1.05-1.18 g/mL (NMX-113. 2012), características que permiten que pueden ser removidos o concentrados mediante procesos convencionales de tratamiento como sedimentación y filtración. Una vez concentrados, es cuestión solo de revisar su morfología y asignar el género o la especie.

Ascaris lumbricoides

La morfología del huevo que ayuda a su identificación es que, este posee tres membranas; la externa mamelonada (pegajosa albuminoide), la media quitinosa y una interna lipídica. (Fausi, A. & et al. 2018)

Hymenolepis nana

Es el cestodo más común en humanos. Los huevos contienen una oncosfera con seis ganchos y está rodeado por una membrana con dos engrasamientos polares, de los cuales surgen de 4 a 8 filamentos. (Acosta, L. & et al. 2016)

Hymenolepis diminuta

El reservorio son insectos y roedores y vive en el intestino delgado. Las características del huevo es que estos, son casi esféricos, con unas dimensiones de 70-80 micras de diámetro. Poseen una cáscara transparente y ligeramente amarillenta, con embrión no estriado con forma de limón y sin filamentos. (Amores, S. & et al. 2002)

Trichuris trichiura

Tricocéfalo, llamado así por su semejanza a un látigo (parte anterior delgada y parte posterior ancha).

El huevo presenta un tamaño de 40-50 micras y tiene forma de barril, en cuyos polos presentan una especie de tapones mucosos. Su contenido es granuloso y fino. (Fausi, A. & et al. 2018)

Trichosomoides sp

Se le considera geohelminto, debido que, para completar su ciclo biológico, los huevos requieren estar en tierra durante un periodo de 3 a 4 semanas para alcanzar el estadio de huevo larvado, que es la forma infectante para el humano.

Los huevos tienen unas dimensiones de 60-65 micras, con forma alimonada o barrilete, con tapones en los extremos que sobresalen ligeramente y contienen una larva adentro. (Amores, S. & et al. 2002)

Toxocara sp

Presenta huevos esféricos/subesféricos, con pared gruesa y cubierta externa con marcados hoyos (a modo de pelota de golf). (Amores, S. & et al. 2002)

Necator sp

Tienen forma ovalada y una delgada capa que los recubre y protege. Miden de 50-80 micras. (Amores, S. & et al. 2002)

Mutación

El término mutación se refiere al mecanismo biológico universal que promueve modificaciones genéticas en los organismos. A nivel molecular, hay una alteración de la molécula de ADN (Sandoval, A. M. 2019). Considerando el gen como la información hereditaria contenida en un segmento determinado del ADN, y por tanto con una estructura lineal definida por la secuencia de pares de bases que lo componen, una mutación puede considerarse como un cambio en la secuencia de pares de bases o que se recorra la lectura de estas, resultando en la formación de proteínas alteradas o ausentes en el organismo que sufre la mutación. (Albaladejo, R. & et al. 1995)

Compuesto mutagénico

Un compuesto mutagénico, mutágeno o agente mutagénico, se refiere a un agente químico o físico que se integra con el ADN, causando mutaciones. Pueden ser de tipo físico como los rayos UV y rayos X, los cuales van dirigidos a ocasionar daños en la secuencia/ conformación y estructura del ADN, o de tipo químico, de los cuales existen más de 500, 000 compuestos que pueden generar principalmente, transiciones y transversines en la secuencia del ADN. (Sandoval, A. M. 2019)

Existen varias fuentes potenciales de mutágenos en el agua, como: los efluentes de tratamientos de aguas residuales, los residuos de los terrenos agrícolas, contaminantes químicos añadidos o formados durante el proceso de tratamiento del agua (coagulantes, floculantes, productos usados en la desinfección, compuestos orgánicos clorados, etc.), compuestos producidos en los tanques de almacenamiento o en las tuberías, incluso la transformación microbiana de compuestos químicos a mutágenos.

Al evaluar la mutagenicidad se busca conocer la capacidad o el grado de afección por parte de cierto compuesto químico o derivado de este, la cual puede clasificarse en carcinogénica, teratogénica (deformación en el feto durante su gestación), o clastogénica (aparición de posibles síndromes) al ser evaluada en modelos in vivo. (Arboleada, A. & et al. 2014)

Prueba de Ames

La prueba de Ames fue creada en 1970 por el doctor Bruce Ames y su grupo de investigación de la Universidad de Berkeley en California. Es un método directo se utiliza en la evaluación de mutagenicidad de muestras problema (agua, aire,

lixiviados de residuos sólidos, extractos acuosos, etc.). (Albaladejo, R. & et al. 1995)

La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* genéticamente modificadas, una bacteria del colon portadora de una mutación (his-) que le impide fabricar una de las enzimas requeridas para la síntesis del aminoácido histidina, un aminoácido esencial de las proteínas (Sandoval, A. M. 2019). A consecuencia de la mutación, la bacteria no puede crecer en un medio nutritivo mineral, a menos que el medio sea complementado con una fuente externa de histidina. En ocasiones la mutación his- sufre una reversión: una mutación reversa que restaura la secuencia normal en el código de ADN para la enzima requerida y con ello, devuelve el suministro interno de histidina. La reversión se descubre ya que solo las bacterias que la han sufrido pueden formar colonias en un medio sin histidina. La tasa de mutación reversa, ordinariamente es muy baja, pero cuando la bacteria es expuesta a un producto que provoque mutaciones, esta se incrementa considerablemente. Esta es la base teórica del test de Ames. (Farmacopea Argentina 2020)

Con el fin de hacer más sensible y adaptable a las condiciones experimentales a la cepa original his-, se le hacen modificaciones:

- La *S. typhimurium* tiene una cubierta bastante impermeable que reduce e incluso impide la penetración de muchos productos químicos en la célula, la modificación consiste en introducir en ella una mutación que provoca defectos en la pared.
- Se hace la cepa más sensible a los agentes que dañan el ADN, eliminando su capacidad de llevar a cabo el proceso de reparación por escisión, de manera que la mayor parte de las lesiones originales no son reparadas.
- Introducción de un plásmido, un elemento genético externo que hace a la duplicación del ADN más propensa a errores.

En general, ambas cepas presentan mutaciones con respecto a la pared celular denominada rfa por medio de la cual se afecta la síntesis de polisacáridos esenciales para su construcción y a su vez la permeabilidad de la misma, permitiendo el paso de moléculas que presentan un elevado peso molecular como lo es el cristal violeta haciéndola sensible a este; también presentan la delección en el marcador uvrB, la cual está relacionada con una deficiencia en el sistema de reparación por escisión de bases, esta es evidenciada al no obtener crecimiento tras exponer las cepas a luz ultravioleta, un conocido mutágeno del ADN que impide la replicación celular, estas dos mutaciones hacen que la bacteria sea mucho más sensible a los agentes mutágenos. No menos importante, es el hecho que ambas presentan el plásmido pKM101 que las hace resistente a la ampicilina, un antibiótico de amplio espectro. (Sandoval, A. M. 2019)

Ahora bien, lo que hace eficaz el test de Ames, es mezclar las bacterias del ensayo con un extracto de hígado de rata (S9 mix), y así someter al producto químico analizado a los procesos metabólicos de los mamíferos, dado que,

normalmente no son las formas originales de los compuestos químicos los que son activos, sino sus metabolitos. En la práctica el test de Ames se efectúa añadiendo la muestra a analizar, las bacterias his- inmersas en un extracto de hígado de rata y, posteriormente se siembra en un medio nutritivo carente de histidina. Tras dos días de incubación, cualquier célula que haya sufrido la mutación reversa dará lugar a colonias. El número de colonias proporciona una estimación de la capacidad mutagénica del compuesto o sustancia analizada. (Albaladejo, V. R. 1995)

Las cepas utilizadas inicialmente eran, TA1535, TA1536, TA1537 y TA1538, pero durante los últimos años se añadieron TA98, TAI00, TA97, TAI02 y la TA104. Además, se han realizado distintos tipos de modificaciones al protocolo inicial, dando lugar a varios métodos de ensayo, cada uno de los cuales es válido dependiendo del tipo de información que se desee obtener y de la naturaleza del compuesto a ensayar.

La determinación de sustancias capaces de inducir mutaciones genéticas se ha convertido en un importante proceso dentro de la evaluación y el control de la seguridad ambiental y por ello está incluida como parámetro en los programas de monitoreo de la calidad del agua, ya que, identificando posibles puntos de riesgo, es que se puede disminuir o desaparecer la exposición a los mismos, junto con los daños que estos acarrearán, y el test de Ames juega un papel importante para alcanzar este objetivo. (Arboleda, A. & et al. 2014)

Metodología

Durante la realización del servicio social en los laboratorios del SACMEX se analizaron y evaluaron diferentes muestras de agua en los laboratorios de parasitología y mutágenos (cabe aclarar que estos comparten instalaciones, áreas y algunos equipos en común, sin embargo, uno es independiente del otro, incluso, las muestras que le llegan a cada uno, aunque pueden coincidir, la mayoría del tiempo son diferentes).

En el SACMEX se analizan muestras de aguas residuales, residuales tratadas (de las dos anteriores se encuentran más de 20 puntos diferentes) y potables, estas últimas, provenientes de los principales puntos de suministro de agua para la CDMX: Lerma, La Caldera, Chalmita, Cutzamala, Magdalena Contreras y el Peñón. El número de muestras que entra por laboratorio, así como su origen, es muy variado, por ello se tuvo que seleccionar los puntos de muestreo que se incluyeron en este proyecto y los criterios fueron:

Fecha; aquellas muestras que entraran dentro de los seis meses de realización del servicio social y que entraran periódicamente, para poder evaluar el parámetro a diferentes tiempos, esto para las muestras que entran a parasitología, en mutágenos, la fecha de evaluación de muestras es después de tres meses iniciado el servicio social (por situaciones internas del laboratorio).

Origen de la muestra; se trató de incluir al menos un par de muestras de diferentes orígenes o tipos de muestra. Por el tipo de parámetro que se evalúa en parasitología, las muestras que se analizan son residuales y residuales tratadas (de plantas tratadoras de agua residual, lagos, pozos, garzas y canales), sin embargo, se lograron incluir dos puntos de muestreo de aguas potables (que se evaluaron de forma extraoficial al laboratorio, es decir, que el SACMEX no las incluye en su registro de resultados). Por su parte, el laboratorio de mutágenos recibe mayormente muestras de aguas potables y residuales tratadas (se incluyeron los puntos de muestreo que llegaron a coincidir con los del laboratorio de parasitología).

Determinación y cuantificación de entidades parasitarias

Se realiza por observación microscópica y para ello las muestras deben concentrarse:

Primero las muestras se sedimentan por gravedad, posteriormente se filtran (si se trata de aguas residuales) y pasan por un segundo paso de sedimentación, pero en centrífuga a 400 G (esto último se hace hasta tener una muestra de aprox. 200 ml, de una inicial de 5 l). Lo siguiente es clarificar y se hace en dos partes: *Flotación**, donde se añade una solución de ZnSO₄ con densidad de 1.29 -1.31 g/ml. Una vez que se tiene la columna de flotación esta se separa por decantación del resto y posteriormente se rompe densidad con agua (para permitir que las entidades parasitarias sedimenten nuevamente). Lo siguiente es sedimentar en centrífuga a 1000 G y repetir hasta tener un volumen de muestra de aprox. 20 ml para con este proceder a realizar un *lavado bifásico* (a fin de eliminar contaminantes liposolubles que pueda dificultar la observación al microscopio). Para este paso, se agrega a la muestra acetato de etilo y una solución ácido-alcohol 65:35 (H₂SO₄ 0.1 N y etanol), se centrifuga a 660 G y se realizan una serie de lavados hasta finalmente obtener una muestra de 5 ml que será la que se observe al microscopio.

*Para las muestras de agua potable, se omite la flotación.

Para el último paso, se homogeniza la muestra final y se distribuye 1 ml en una celda de Sedgewick-Rafter, con el objetivo de 10x se realiza un barrido y se procede a identificar y cuantificar las entidades parasitarias. Finalmente, el número de entidades parasitarias se reporta sobre litro.

Determinación de compuestos mutagénicos

- *Concentración de la muestra*

Las muestras iniciales de análisis son de 5 l, pero una vez que llega, esta debe ajustarse a 8 l y se filtra por goteo con ayuda de una columna que contiene un filtro y 30 ml de resina polimérica de intercambio iónico (esto puede durar 4-6 horas) y el agua se recolecta en otro garrafón. Una vez filtrado los 8 l de muestra,

se le ajusta a un pH de 2 (con HCl 2 N) para revertir la polaridad. Nuevamente se filtra la muestra con ayuda de las columnas antes mencionadas, pero en este paso el agua filtrada se puede desechar, ya que, para el ensayo, lo siguiente será extraer el analito de interés de la columna. Posteriormente y con ayuda de un soporte universal, se hace eluir con 100 ml de una mezcla orgánica hexano-acetona y se deja en la campana de extracción para evaporar los compuestos volátiles. El tiempo de espera será el suficiente hasta completar mínimo 6 muestras más para el posterior bioensayo. Una vez colectadas y completadas las muestras, se resuspenden con dimetilsulfóxido (DMSO) y se coloca en viales para su almacenamiento. Lo siguiente será el bioensayo de la prueba de Ames, donde se utilizan 2 cepas de *Salmonella typhimurim* previamente almacenadas y congeladas: TA100 y TA98 que tienen la característica de ser auxotróficas a histidina.

- *Previo al bioensayo*

Es importante mencionar que previo al ensayo, se le hicieron pruebas de verificación de sus características (lo anterior solo fue realizado por el químico titular del laboratorio de mógatenos).

Dos días antes del bioensayo, se obtuvo el cultivo de las cepas en fase estacionaria, para esto, en frascos estériles con tapón se colocaron 5 ml de caldo de cultivo nutritivo, y de las cepas congeladas, se extrajo por raspadura una porción y se incubó en el medio de cultivo. Los frascos se envolvieron en papel aluminio para protegerlos de la luz y se sumergieron en un baño con agitación a 37 °C por 16 horas aproximadamente, pasado este tiempo, se sacaron y conservan a 4 °C hasta el día de la prueba con las muestras de agua.

- *Prueba de Ames*

Para preparar los medios, primero se colocan en tubos de ensayo (13 X 100 mm, con tapa de polipropileno) 0.1 ml de la muestra colectada a analizar y 0.1 ml del cultivo bacteriano y finalmente se agregan 2 ml de agar de superficie, todo lo anterior se agita levemente con ayuda de un vortex y una vez homogenizado, se vierte el contenido a una placa con agar de medio mínimo, se distribuye en toda la superficie y se deja solidificar en una superficie plana. Finalmente, se deja incubar a 37 °C por 24 hrs. Todo este proceso se hace por triplicado.

Lo siguiente será, repetir el procedimiento anterior, pero con activación enzimática, con 0.5 ml S9, (que es una combinación de homogenizado de hígado de rata con algunos cofactores). Igualmente, se repite tres veces.

Un paso importante es incluir en el ensayo controles, tanto del disolvente (para descartar su actividad mutagénica) como controles positivo y negativo, donde se repite el proceso ya mencionado, con algunas diferencias:

Control de disolvente: Se añade al tubo 0.1 ml de DMSO

Control positivo: se agrega 0.1 ml de un mutágeno estándar, 0.0025 mg de 2-Nitrofluoreno para la cepa TA98 y 0.0015 mg de azida sódica para TA100.

Control negativo: Agar de medio mínimo con histidina, a través de este control se verifica la tasa de reversión espontánea.

Una vez terminado el tiempo de incubación, lo último es proceder al conteo del número de colonias revertantes prototróficas por placa. Es importante mencionar que, para el conteo, se debe considerar que la morfología de las cepas de *Salmonella typhimurim* es muy característica: son blancas, traslucidas y tienen una superficie lisa y bordes regulares.

Los resultados serán expresados a través de la razón de mutagenicidad (RM), que es la razón entre el número de revertantes de la placa de prueba (revertantes espontáneos inducidos) y el número de revertantes en la placa control (revertantes espontáneos).

Resultados

Huevos de helminto

| Muestra | Fecha | # Huevos | Huevos totales/L |
|--------------------------------|------------|----------|------------------|
| Ptar. Coyoacán | 01/10/2019 | 0 | 0 |
| | 13/11/2019 | 0 | 0 |
| | 18/12/2019 | 0 | 0 |
| | 04/02/2020 | 0 | 0 |
| | 03/03/2020 | 0 | 0 |
| Ptar. Santa Fé | 03/10/2019 | 0 | 0 |
| | 16/10/2019 | 0 | 0 |
| | 05/11/2019 | 0 | 0 |
| | 15/11/2019 | 0 | 0 |
| | 05/12/2019 | 0 | 0 |
| | 27/12/2019 | 1 | 0.2 |
| | 17/01/2020 | 0 | 0 |
| | 03/02/2020 | 0 | 0 |
| | 20/02/2020 | 0 | 0 |
| 05/03/2020 | 0 | 0 | |
| Descarga Manantiales Zacapa | 10/10/2019 | 3 | 0.6 |
| | 05/11/2019 | 2 | 0.4 |
| | 21/11/2019 | 0 | 0 |
| | 16/12/2019 | 0 | 0 |
| | 27/02/2019 | 5 | 1 |
| | 20/03/2019 | 4 | 0.8 |
| Descarga Embarcadero Nativitas | 10/10/2019 | 1 | 0.2 |
| | 05/11/2019 | 3 | 0.6 |
| | 21/11/2019 | 6 | 1.2 |
| | 16/12/2019 | 4 | 0.8 |
| | 27/02/2019 | 2 | 0.4 |
| 20/03/2019 | 4 | 0.8 | |

| | | | |
|---------------------------------|------------|---|-----|
| Lago Viejo de Chapultepec | 11/11/2019 | 0 | 0 |
| | 26/11/2019 | 0 | 0 |
| | 23/12/2019 | 0 | 0 |
| | 03/02/2020 | 2 | 0.4 |
| Lago Azcapotzalco- Tezozomoc | 12/11/2019 | 1 | 0.2 |
| | 27/11/2019 | 0 | 0 |
| | 04/12/2019 | 0 | 0 |
| | 20/12/2019 | 1 | 0.2 |
| | 18/02/2020 | 0 | 0 |
| | 04/03/2020 | 0 | 0 |
| Canal Apatlaco Centro | 28/10/2019 | 0 | 0 |
| | 20/11/2019 | 0 | 0 |
| | 12/12/2019 | 2 | 0.4 |
| | 19/02/2020 | 2 | 0.4 |
| | 12/03/2020 | 1 | 0.2 |
| Canal Chalco-Viveros | 28/10/2019 | 2 | 0.4 |
| | 22/11/2019 | 1 | 0.2 |
| | 12/12/2019 | 0 | 0 |
| | 19/02/2020 | 2 | 0.4 |
| | 12/03/2020 | 1 | 0.2 |
| Garza bosque de las Lomas | 11/11/2019 | 0 | 0 |
| | 16/12/2019 | 0 | 0 |
| | 18/02/2020 | 0 | 0 |
| Garza Ermita | 16/12/2019 | 0 | 0 |
| | 18/02/2020 | 0 | 0 |
| Cutzamala (Potable) | 23/12/2019 | 0 | 0 |
| La caldera (Potable) | 23/12/2019 | 0 | 0 |

Prueba de Ames

Considerando que el control positivo fue de 22.6 (M.R)

| Cepa TA 98 | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|-----------|-----------|----------|---------------|-----------|-----------|----------|
| Muestra | Con S9 | | | | Sin S9 | | | |
| | RV/P | MR | IM | C | RV/P | MR | IM | C |
| Lerma 05/12/2019 | 11 | 16.3 | 0.72 | N.M | 19 | 23.3 | 1.03 | N.M |
| | 17 | | | | 23 | | | |
| | 21 | | | | 28 | | | |
| Cutzamala 05/12/2019 | 15 | 13.6 | 0.60 | N.M | 17 | 25.6 | 1.13 | N.M |
| | 11 | | | | 37 | | | |
| | 15 | | | | 23 | | | |
| Magdalena Contreras 03/02/2020 | 18 | 22.3 | 0.98 | N.M | 25 | 24 | 1.06 | N.M |
| | 28 | | | | 28 | | | |
| | 21 | | | | 19 | | | |
| Ptar Coyoacán 18/12/2019 | 26 | 22.3 | 0.98 | N.M | 33 | 35.3 | 1.56 | L.M |
| | 18 | | | | 28 | | | |

| | | | | | | | | |
|------------------------------|----|------|------|-----|----|------|------|-----|
| | 23 | | | | 45 | | | |
| Ptar. Santa Fé 27/12/2019 | 33 | 25.6 | 1.13 | N.M | 38 | 30.6 | 1.35 | N.M |
| | 26 | | | | 30 | | | |
| | 18 | | | | 24 | | | |

RV/P: No de colonias revertantes por placa

MR: Media de revertantes

IM: Indice de mutagenicidad

C: Calidad

Considerando que el control positivo fue de 112.3 (M.R)

| Cepa TA 100 | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------|-------|------|-----|--------|-------|------|-----|
| Muestra | Con S9 | | | | Sin S9 | | | |
| | RV/P | MR | IM | C | RV/P | MR | IM | C |
| Lerma 05/12/2019 | 80 | 92.6 | 0.82 | N.M | 94 | 100.6 | 0.89 | N.M |
| | 93 | | | | 98 | | | |
| | 105 | | | | 110 | | | |
| Cutzamala 05/12/2019 | 76 | 82.6 | 0.73 | N.M | 98 | 101.3 | 0.9 | N.M |
| | 90 | | | | 106 | | | |
| | 82 | | | | 100 | | | |
| Magdalena Contreras 03/02/2020 | 88 | 94 | 0.84 | N.M | 102 | 114 | 1.01 | N.M |
| | 92 | | | | 128 | | | |
| | 102 | | | | 112 | | | |
| Ptar Coyoacán 18/12/2019 | 120 | 109.6 | 0.97 | N.M | 133 | 119 | 1.05 | N.M |
| | 113 | | | | 116 | | | |
| | 96 | | | | 118 | | | |
| Ptar. Santa Fé 27/12/2019 | 134 | 116 | 1.03 | N.M | 142 | 132 | 1.17 | N.M |
| | 98 | | | | 126 | | | |
| | 116 | | | | 128 | | | |

RV/P: No de colonias revertantes por placa

MR: Media de revertantes

IM: Indice de mutagenicidad

C: Calidad

Análisis de resultados

Huevos de Helminto

El resultado del conteo se escribe como huevos de helminto/l, por lo tanto, al expresar el resultado se consideró que la muestra era de 5 l inicialmente.

La NOM-003-ECOL-1997 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas, donde especifica que: para el reúso de estas en servicios al público con contacto directo se acepta 1 h/l, y cuando se trata de servicios al público con contacto indirecto u ocasional, el valor aceptado es de 5 h/l.

Con la información anterior, se puede decir que casi todas las muestras analizadas entran dentro de los rangos permitidos (ya que en su mayoría son muestras de agua cuyo destino no es el consumo humano) a excepción de dos que provienen de descargas: Manantiales Zacapa y Embarcadero Nativitas con valores de 1 y 1.2 respectivamente, aunque este valor solo se presentó en una fecha de muestreo, las otras entran perfecto en los rangos establecidos.

En general se puede observar que la presencia de huevos de helminto es mayor en los sitios de descarga, seguida por los canales y lagos, mientras que, en las dos únicas muestras de agua potable, su presencia fue nula (aunque cabe mencionar que solo fue una fecha de muestreo).

Prueba de Ames

Con el fin de evaluar la posible mutagenicidad de las muestras de agua antes mencionadas (dos correspondientes a plantas tratadoras y tres más a puntos de distribución de agua potable de la CDMx), se realizó la prueba de Ames utilizando dos cepas: TA 98 y TA 100, cuyos datos se muestran en las tablas de resultados y se analizan a continuación:

Se denomina índice de mutagenicidad (IM) al cociente que se obtiene de dividir los revertantes inducidos (MR) sobre el valor de los revertantes espontáneos. El valor que este nos arroje, servirá para determinar la cualidad de la muestra: cuando dicho índice alcanza valores entre 1.5 y 2 se considera como ligera mutación (L. M.), si es superior a 2 corresponde a una mutación positiva (M. P.) y todo valor inferior a 1.5 indica un valor no mutagénico (N. M.).

Con la información anterior, se puede afirmar que no se ha obtenido una evaluación mutagénica positiva en ninguna de las muestras, ya que todas estuvieron en valores inferiores al 1.5 (a excepción de la muestra de Ptar. Coyoacán con la cepa TA 98 que superó ligeramente el 1.5).

Por otra parte, se puede observar que con ambas cepas, el IM aumenta cuando no se usa activación enzimática (S9), sin embargo, no llega ninguna muestra a ser positiva (M. P.).

Los valores más altos de índice de mutagenicidad se pueden apreciar en las muestras pertenecientes a las plantas tratadoras de agua, pero no llegan tampoco a ser positivas, así mismo, se aprecia que la cepa TA100 proporciona I.M. mayores con respecto a TA 98, con lo que se puede decir que es más sensible para detectar mutagenicidad.

Conclusión

Como conclusión para el presente proyecto, y en base a los objetivos establecidos al inicio, se puede decir que los puntos de muestreo de agua potable y residual aquí estudiados, tentativamente no representan un peligro potencial a la salud (en lo parámetros estudiados), ya que cada uno entra dentro de los rangos aceptables: con respecto a los huevos de helminto, ninguna

muestra presenta más de dos entidades por litro y con respecto a la evaluación mutagénica, de las muestras de agua de consumo y tratadas no se encontró actividad mutagénica positiva en ninguna. Sin embargo, para poder afirmar con certeza que estas muestras no representan un peligro, es necesario que el monitoreo siga de forma rigurosa y periódica, ya que siempre se pueden identificar riesgos nuevos o posibles de origen químico o biológico, esto por la creciente utilización de sustancias en la industria, la agricultura o incluso el medio doméstico.

Recomendaciones

Con la prueba de Ames se determina la presencia o ausencia de un compuesto mutagénico en un muestra, sin embargo, de ser positiva, esta no nos indica de que compuesto se trata, por ello sería interesante cotejar los datos que el laboratorio de mutágenos obtiene con los del laboratorio de compuestos orgánicos, donde si hacen una identificación por HPLC.

Aunque ya es un trabajo que ya se realiza dentro del laboratorio central del SACMEX, es importante mencionar en este proyecto la importancia de buscar alternativas de reúso a los puntos de agua de descarga (para el llenado de lagos artificiales, como opción para centros de lavado de autos e incluso como agua de riego en la agricultura), ya que, de acuerdo a los resultados, entran en el límite para poder considerar esta opción.

Bibliografía

- Acosta, L., Amaya, I. D., Blanco, Y., Del Valle, N., Devera, R. A., Hernán, R., Mijares, V., Nastasi, J., Requena, I., Salazar, A., Sanchez, E. & Veruska, E. (2016). *Hymenolepis nana* infection in an indigenous community from Bolívar State, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop*;68 (1)
- Albaladejo, R., Astasio, P., Calle, E., Domínguez, V., Gil, M., Granados, B., Ortega, M. & Villanueva, R. (1995) Evaluación de la Actividad Mutagénica de Aguas de consumo Público por Medio del Test de AMES. *Rev. Esp. Salud Pública*, 69 (5), 393-408.
- Albaladejo, V. R. (2003). Evaluación de la mutagenicidad inducida por concentrados orgánicos derivados de aguas de consumo público por medio del test de Ames. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina.
- Amores, S., Bernabeu, A., Bernacer, I., Esteban, J.G., Gómez, D. & Pérez, O.G. (2002). Identificación de Huevos por Helminthos en Aguas Residuales. Tecnología del Agua. *Artículo técnico*, Recuperado el 20 de marzo del 2020 de http://www.bibliotecagbs.com/archivos/ta_221.pdf
- Arboleda, A., Benítez, N., Bravo, E., Jiménez, A., Muñoz, A., Sánchez, N. & Vivas, H. (2014). Mutagenicity evaluation caused by heavy metals found in Cauca river water in the city of Cali, Colombia. *Rev. Colombiana de química*, 43 (2), 18-24.

- Beltrán, M., Campos, M. C., Fuentes, N. & Moreno, G. (2018). Huevos de helmintos como indicadores de contaminación de origen fecal en aguas de riego agrícola, biosólidos, suelos y pastos. *Rev Biomédica*, 38 (1), 42-53.
- Ensayo de *Salmonella*/Fracción microsomal (Test de AMES) para la detección de mutagenicidad. En *Farmacopea Argentina* (pp. 99-102). Consultado el 18 de marzo en http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/farmacopea_vol_iv/files/assets/basic-html/toc.html
- Fauci, A., Hauser, S., Jameson J. L., Kasper, D., Longo, D. & Loscalzo, J. (2018). Introducción a las helmintosis. En *Harrison. Principios de medicina Interna*. Mc Graw Hill Education.
- Gallego, L. M., Heredia, H. L., Hernández, T. M., Naranjo, M. M., Salazar, J. J. & Suárez, B. L. (2014). Identification of intestinal parasites in water from deep wells located in four municipalities of the state of Aragua, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop*, 66 (2), 164-173.
- Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI-2012, Análisis de agua – Medición del número de huevos de helminto en aguas residuales y residuales tratadas por observación microscópica - método de prueba. Recuperado el 15 de febrero del 2020 de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166809/NMX-AA-113-SCFI-2012.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicio al público. Recuperado el 20 de marzo del 2020 de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69207.pdf>
- PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Recuperado el 20 de marzo de 2020 de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5581179&fecha=06/12/2019
- Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Recuperado el 15 de febrero del 2020 de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5510140&fecha=05/01/2018
- Sandoval, A. M. Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*. Prueba de Ames. Recuperado el 20 de diciembre del 2019 de https://www.academia.edu/9126858/Prueba_de_Ames