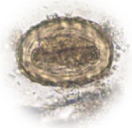
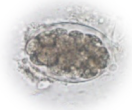
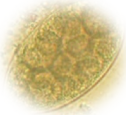
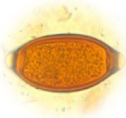
TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES TROPICALES

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE FORMAS DE DISPERSIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES EN AGUAS RESIDUALES DE TENERIFE

Autora:
Betania C. Seguí López – Peñalver
Tutores:
Dr. Basilio Valladares Hernández
Dra. Cristina González Martín

Facultad de Farmacia
Universidad de La Laguna (ULL)

Tenerife, 2018

AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Cristina González Martín**, por haber sido muchísimo más que la cotutora de este trabajo; nunca le agradeceré lo suficiente tantísimo esfuerzo y paciencia aguantando mi continua fuga de ideas, mis audios interminables y mis WhatsApp los domingos por la tarde entre otras muchas cosas; ¡Lo conseguimos!*

*A la **Dra. Emma Carmelo Pascual**, porque con una sola frase cambió por completo mi forma de pensar. A mis **compañeros del Laboratorio de Aguas y Medio Ambiente**, por ser así de únicos. Al **Dr. Basilio Valladares**, por haber construido, con su dedicación infinita y su pasión por las Enfermedades Tropicales, el camino por el que muchos podemos andar hoy, y a todos los profesores y profesionales de la rama que han hecho que la Parasitología y la Microbiología sean para mí como un juego al que nunca me cansaré de jugar.*

*A **Natalia Clemente Sánchez** y **Sara Pérez Hormigo**, por ser tan imprescindibles y admirables para mí, y por haber ido conmigo siempre de la mano en lo mejor y en lo peor; sin ellas nada habría sido igual, ni yo sería quien soy. A **José Luis Sancho Fernández**, por ser mi suerte y mi mano derecha durante tantísimos años y en tantísimas batallas, y porque nuestra amistad es uno de los mayores regalos que me ha dado la vida. A **Jonás Pérez Chinea**, por ser uno de mis pilares fundamentales en tantísimos momentos y entenderme siempre. A **Matilde Fernández Rodríguez**, por marcar la diferencia con su "Attraversiamo", y por tantas horas filosofando sobre cómo arreglar el mundo. A mi ahijada **Xenia**, por darle sentido a todo incluso antes de llegar. A **Rubén Delgado Hernández**, por haberse convertido en uno más de la "familia que elegí" y cuidar de mis dos estrellitas. A todos y cada uno del resto de mis amigos, por formar parte del ejército que llevo detrás, y apoyarme y aguantarme siempre.*

*A mi madre **Agustina López-Peñalver Rodríguez**, por haber hecho siempre lo imposible para que todo sea posible; por ser mi motor y mi motivación cada día y, simplemente, por ser ELLA. A mi padre **Javier Seguí Dolz**, por ser un gran ejemplo de incansable fuerza de voluntad, por lograr todo lo que ha logrado superándose día a día y demostrarme que querer siempre es poder. A **Francisco de Lamo Bas**, por la complicidad que nos une, por los pequeños pero enormes detalles, y por haber sido mucho más que un padre para mí. A mi hermano **Raimundo Seguí López-Peñalver**, por haber estado siempre juntos a pesar de la distancia, por haberme motivado a empezar este camino y, porque desde ahora y más que nunca, no me cansaré de mirarlo como quien mira a la luna. A **Diego López Gilabert**, por ser así de auténtico y haberme ayudado a crecer. Al resto de mi familia, por hacerme sentir cerca a pesar de estar tan lejos, y al resto de personas que en algún momento y, de un modo u otro, me hicieron aún más fuerte.*

A Anita y Mundito, porque, aunque un día se hicieron invisibles, siempre están conmigo y gracias a ellos esto ha sido posible; va por ustedes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES 2

1.2 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES EN TENERIFE 3

1.3 PARASITOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES 4

2. OBJETIVOS 8

3. MATERIAL Y MÉTODOS 9

3.1 MUESTRAS 9

3.2 PROCESADO 10

3.3 VISUALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN 10

3.4 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS 11

3.5 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO 11

4. RESULTADOS 13

4.1 DEPURADORA A 13

4.2 DEPURADORA O 13

4.3 DEPURADORA G 13

4.4 DEPURADORA C 15

4.5 DEPURADORA B 15

5. DISCUSIÓN 16

5.1 EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE DEPURACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES 16

5.2 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS 16

5.3 IDENTIFICACIÓN DE LARVAS 17

5.4 UTILIDAD DE OTROS MICROORGANISMOS COMO BIOINDICADORES DEL TRATAMIENTO DE DEPURACIÓN 17

6. CONCLUSIONES 19

7. ANEXOS

7.1 ANEXO A. MÉTODO BAILENGER MODIFICADO 21

7.2 ANEXO B. CICLOS BIOLÓGICOS DE HELMINTOS INTESTINALES MÁS FRECUENTEMENTE RELACIONADOS CON AGUAS RESIDUALES 26

7.3 ANEXO C. IMÁGENES DE LOS HELMINTOS INTESTINALES IDENTIFICADOS EN ESTE ESTUDIO 30

7.4 ANEXO D. GLOSARIO DE IMÁGENES DE OTROS MICROORGANISMOS 31

8. BIBLIOGRAFÍA 35

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de agua en Canarias, un recurso escaso por factores como la situación geográfica o el comportamiento hidrogeológico de las islas, ha ido aumentando al mismo tiempo que ha crecido la población **(22)**. Así, se hace necesaria la reutilización de las aguas depuradas, lo que implica un riesgo para la salud pública por la posible presencia de microorganismos patógenos. Este riesgo depende de la contaminación del agua a la entrada de las estaciones depuradoras y del método de depuración elegido **(7, 8)**.

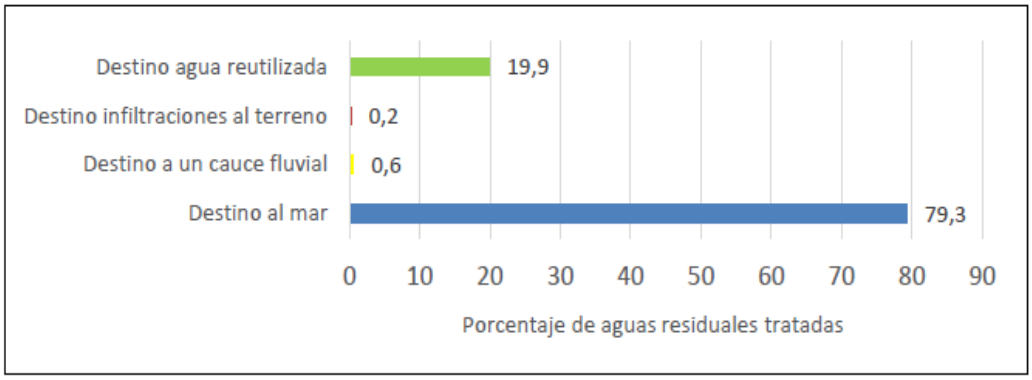


Figura 1: Destinos de las aguas residuales tratadas durante el año 2014 en Canarias **(15)**.

En base a esto es importante resaltar el ahorro de "agua limpia" que supondría aumentar el uso de aguas regeneradas, suponiendo su utilización una alternativa óptima para evitar la escasez de recursos hídricos en el archipiélago **(10)**.

Según datos publicados por el Instituto Canario de Estadística (ISTAC), en el año 2014, un 80% de las aguas residuales tratadas fueron vertidas al mar **(Figura 1)** y, por tanto, no aprovechadas **(10, 15)**. El Plan Hidrológico de Tenerife de 2015, recoge los datos sobre el origen del agua para abastecimiento en la isla **(19)**. Así, las aguas subterráneas representan un 82,1%, un 16,7% es agua desalada y tan sólo un 1,2% aguas regeneradas **(Figura 2).** De los recursos destinados a riego agrícola, tan sólo el 7,2% proviene de aguas regeneradas; mientras que, de los destinados a riego de campos de golf, se alcanza hasta el 59,1% **(19)**.

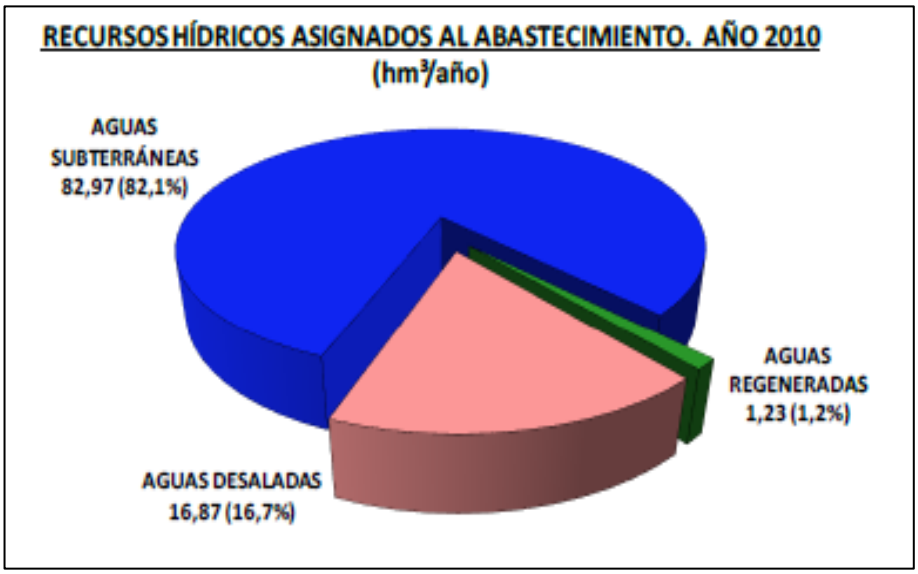


Figura 2: Recursos hídricos asignados al abastecimiento, año 2010 **(19)**.

1.1 Sistemas de tratamiento de aguas residuales

El agua residual es una combinación de líquidos de diferentes entornos según su origen sea doméstico, industrial, agrícola o urbano; a la que pueden agregarse eventualmente aguas subterráneas, superficiales y pluviales.

A su vez, el agua residual tratada da lugar a:

- Agua depurada: se define como las aguas residuales que han sido tratadas adecuando su calidad a la legislación de vertidos aplicable.
- Agua regenerada: es el agua residual depurada a la que se le ha sometido a un tratamiento adicional para obtener una calidad adecuada al uso posterior al que se destina **(10)**.

La depuración consiste en la aplicación y combinación de diferentes procesos según las necesidades de calidad del agua requerida para sus usos posteriores **(Tabla 1) (17)**. Según el contaminante que se quiera eliminar, se recurrirá a diferentes procesos físicos, químicos y biológicos **(13)**. Para los patógenos del tipo helmintos intestinales, los métodos más comúnmente utilizados son: cloración, ozonización y radiación UV. En la **Figura 3** se muestra el diagrama general de una EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales).

SISTEMA	OBJETIVO	PROCESOS PRINCIPALES
Pretratamiento	Eliminación de sólidos de mayor volumen que hayan sido arrastrados o las grasas y aceites presentes en el agua para evitar que estos puedan dañar algún equipo, obstruir tuberías o ralentizar el proceso si pasan al resto de la planta.	Desbaste: consiste en hacer pasar el agua a través de una reja en la que los sólidos de mayor tamaño son retenidos. Desarenado: eliminación de partículas sólidas de pequeño tamaño. Desengrasado: eliminación de grasas, aceites, espumas y demás materiales flotantes con una densidad inferior a la del agua.
Tratamiento primario	Eliminación de una fracción de los sólidos en suspensión y la materia orgánica presente en el agua residual.	Sedimentación. Tras la etapa de pretratamiento, el agua se envía a grandes decantadores, donde se deja el tiempo suficiente para que las partículas sedimenten.
Tratamiento secundario	Eliminación de los sólidos suspendidos y la materia orgánica biodegradable del agua residual.	Lodos o fangos activados: Eliminación de sustancias biodegradables mediante la acción de microorganismos en un reactor biológico (normalmente compuesto por un tanque de aireación y un sedimentador secundario. Sistemas de biorreactores de membrana (MBR): Unificación de los fangos activados con la tecnología de membrana para la separación de sólidos. Mejora la calidad del efluente producido.
Tratamiento terciario/avanzado	Eliminación de contaminantes específicos: tóxicos o compuestos no biodegradables para proporcionar al agua unas características determinadas que la haga apta para un fin determinado.	Filtración mediante arena. Desinfección (que generalmente se realiza mediante cloro, ozono o radiación UV). Utilización de humedales artificiales.

Tabla 1: Resumen de los sistemas de tratamiento de aguas residuales **(10, 13)**.

1.2. Depuración de aguas residuales en Tenerife

En los últimos años se ha producido un descenso importante tanto en la cantidad como en la calidad del agua de los acuíferos isleños debido a la sobreexplotación de los mismos, lo que evidencia que el uso de aguas regeneradas es de vital importancia **(13)**. Actualmente en la isla, el tratamiento más comúnmente usado es

el de fangos activados **(Figura 4)**. Las limitaciones principales son la producción ocasional de sólidos debido a factores ambientales y la alta carga de patógenos, lo cual puede influir en que el efluente no cumpla con la calidad requerida **(9)**.

Como alternativa, se plantea el uso de sistemas de biorreactores de membrana (MBR), los cuales logran la retención total de sólidos y patógenos. Así, esta tecnología presenta como ventaja la obtención de un efluente de mejor calidad **(8)**.

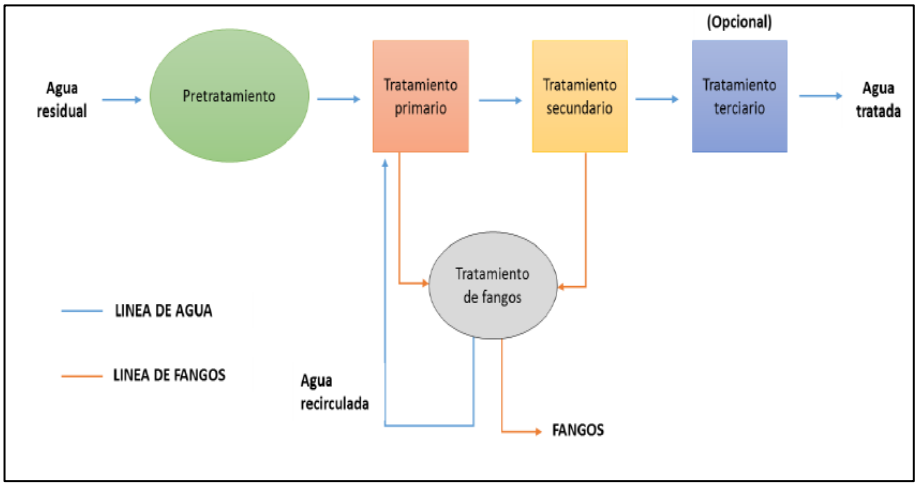


Figura 3: Diagrama general de una EDAR que incluye la línea de agua y la línea de fangos **(10)**.

1.3. Parasitología de las aguas residuales

En las aguas residuales, y dependiendo de su origen y zona geográfica, se puede encontrar gran variedad de formas de dispersión de parásitos intestinales. Entre los más frecuentes están los huevos de helmintos (Ej.: *Ascaris* spp., *Trichuris trichiura, Taenia* spp.) **(Tabla 2)**. Su importancia epidemiológica reside en su larga persistencia en el entorno, una baja dosis infectiva y la capacidad de permanecer viables en suelos durante largo tiempo **(20)**. Es por ello que el R.D. 1620/2007, el cual establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, recoge los criterios de calidad para el parámetro "nematodos intestinales". Hay que analizarlo en prácticamente todos los usos previstos de las aguas regeneradas, con un valor máximo admitido (VMA) de 1 huevo/10 L para la mayoría de los casos, y en el que hay que considerar los géneros *Ancylostoma, Ascaris* y *Trichuris* **(23)**. Se menciona también al género de cestodos *Taenia* spp., que hay que considerar si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne **(12)**. Los ciclos biológicos de los helmintos más frecuentes en aguas residuales se presentan en el **Anexo B**.

Figura 4: Ejemplo de estructura de EDAR (Sta. Cruz de Tenerife).

Según un estudio realizado en Tenerife para determinar la contaminación en áreas recreativas por formas de dispersión parasitaria, se obtuvo que, en el 85,2% de los parques había presencia de uno o más helmintos. Se identificaron huevos de *Trichuris trichiura*, Uncinarias, *Hymenolepis* spp. y *Ascaris* spp., **(Figura 5)** con una prevalencia en torno al 2% **(27)**. Es por ello que los huevos de estos parásitos representan uno de los principales riesgos sanitarios, resultando como indicadores importantes para determinar si las aguas regeneradas pueden ser usadas para riego **(25)**.

AGENTE CAUSAL	ENFERMEDAD Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	PRESENTACIÓN CLÍNICA
Ascaris lumbricoides	La ascariasis es la infección helmíntica humana más común. Distribución mundial.	Aunque las infecciones pueden causar retraso del crecimiento, las lombrices adultas generalmente no causan síntomas agudos. Las altas cargas de gusanos pueden causar dolor abdominal y obstrucción intestinal. La migración de gusanos adultos puede causar oclusión sintomática del tracto biliar o expulsión oral. Durante la fase pulmonar de la migración larval, pueden aparecer

		síntomas pulmonares (tos, disnea, hemoptisis, neumonitis eosinofílica, síndrome de Loeffler).
Uncinarias (Ancilostomas)	Es la segunda infección de helmintos humanos más común. Las especies de *Ancylostoma* son de distribución mundial, principalmente en áreas con clima húmedo y cálido del viejo mundo, mientras que la especie *Necator americanus* es propia del Nuevo Mundo.	La anemia por deficiencia de hierro es el síntoma más común de la infección por *Ancylostoma* y puede estar acompañada de complicaciones cardíacas. Los síntomas gastrointestinales y nutricionales / metabólicos también pueden ocurrir. Además, durante la penetración de las larvas filariformes (L3) pueden aparecer manifestaciones locales de la piel ("picazón en el suelo") y se pueden observar síntomas respiratorios durante la migración pulmonar de las larvas.
Trichuris trichiura	El tercer gusano redondo más común en los humanos. Distribución mundial, con infecciones más frecuentes en áreas con clima tropical y malas prácticas sanitarias, y entre los niños.	Puede cursar de forma asintomática. Las infecciones graves, especialmente en niños pequeños, pueden causar problemas gastrointestinales (dolor abdominal, diarrea, prolapso rectal) y posible retraso del crecimiento.
***Trichostrongylus* spp.**	En todo el mundo, más común en zonas de cría de ganado.	Aunque principalmente son parásitos de animales, se sabe que varias especies de *Trichostrongylus* infectan a los humanos. La mayoría de las infecciones son asintomáticas, pero las graves pueden causar problemas gastrointestinales (dolor abdominal, diarrea, anorexia), dolor de cabeza, fatiga, anemia y eosinofilia.
Taenia saginata (tenia de vacuno) ***Taenia solium*** (tenia de cerdo)	*T. saginata* y *T. solium* tienen distribución mundial. *T. solium* es más prevalente en las comunidades más pobres, donde los humanos viven en estrecho contacto con los cerdos y comen carne de cerdo poco cocinada. *T. solium* también puede causar cisticercosis.	La teniasis puede resultar asintomáticas o puede causar problemas digestivos (pérdida de peso, dolor abdominal, malestar, etc.). Ocasionalmente, la apendicitis o la colangitis pueden ser el resultado de la migración de las proglótides. La característica más importante de la teniasis por *T. solium* es el riesgo de desarrollo de cisticercosis.
Hymenolepis nana ***Hymenolepis diminuta***	*H. nana* es la causa más común de las infecciones por cestodos y se encuentra en todo el mundo. En áreas templadas, su incidencia es mayor en niños y grupos institucionalizados. *H. diminuta*, aunque menos frecuente, por ser eminentemente parásitos de roedores, ha sido reportado en varias partes del mundo.	Las infecciones por *H. nana* e *H. diminuta* son más a menudo asintomáticas. Las infecciones graves con *H. nana* pueden causar debilidad, dolores de cabeza, anorexia, dolor abdominal y diarrea.

Tabla 2: Parásitos intestinales frecuentes en aguas residuales y enfermedades parasitarias provocadas por Nematodos y Cestodos. Fuente: Center for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov).

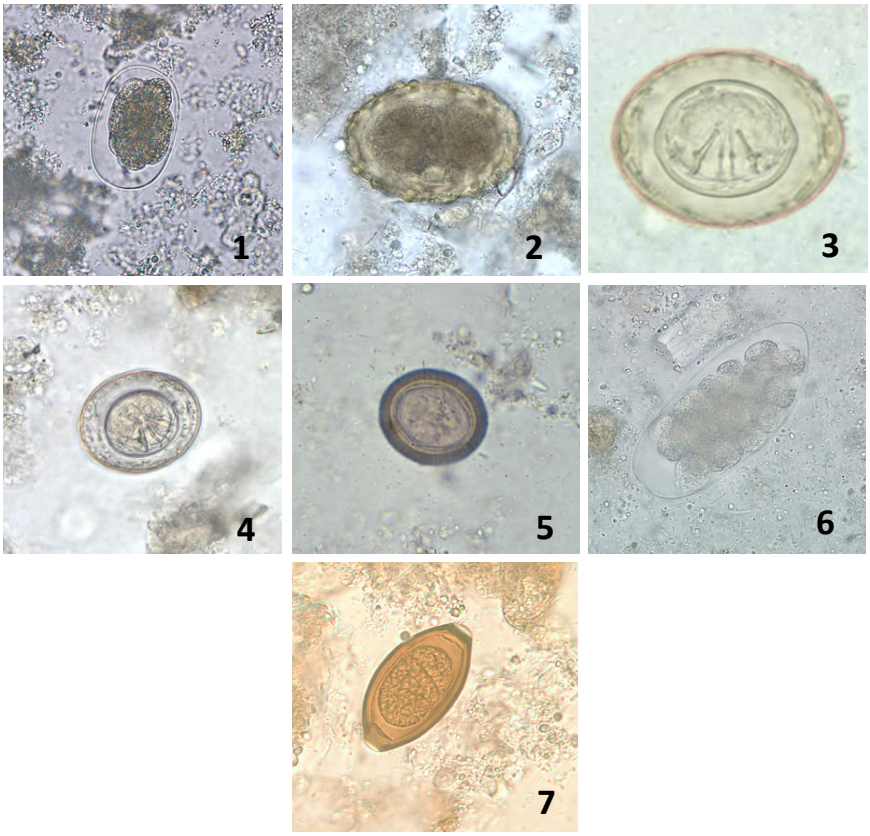


Figura 5: Imágenes de las formas de dispersión de los parásitos intestinales más frecuentes en aguas residuales. 1: huevo de *Ancylostoma duodenale* (Uncinaria), 2: huevo fértil de *Ascaris lumbricoides*, 3: huevo de *Hymenolepis diminuta*, 4: huevo de *Hymenolepis nana*, 5: huevo de *Taenia* spp., 6: huevo de *Trichostrongylus* spp. y 7: huevo de *Trichuris trichiura*. Fuente: Center for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov).

2. OBJETIVOS

Con estos precedentes, y queriendo conocer el estado actual de las aguas depuradas en relación a los parámetros parasitológicos de las mismas, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Analizar la presencia de formas de dispersión parasitarias en muestras de agua procedentes de la entrada y salida de varias depuradoras de la isla.

2. Determinar que las aguas regeneradas cumplen con los criterios establecidos en el R.D. 1620/2007 para dicho parámetro.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Se obtuvieron un total de 18 muestras de agua, siendo la mitad de entrada a la depuradora y la otra mitad de agua regenerada. Procedían de plantas depuradoras de la red pública y de depuradoras privadas pertenecientes a complejos hoteleros. Fueron recogidas por personal de las instalaciones y recibidas en el laboratorio el mismo día de la recogida. Las muestras se codificaron como Depuradora A, O, G, C y B por motivos de confidencialidad.

En cuanto a la procedencia, las depuradoras O, G y A reciben agua tanto de origen urbano como agrícola; la Depuradora B es eminentemente urbana y la Depuradora C tiene origen doméstico. En la **Tabla 3** se detalla brevemente las características y composición de cada tipo.

TIPO DE AGUA RESIDUAL	CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN
Domésticas	De viviendas y servicios, derivadas del metabolismo humano y actividades domésticas. Contaminación principal: materia orgánica normalmente biodegradable. Gran cantidad de microorganismos.
Urbanas	Aguas residuales domésticas o la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales (previamente tratadas) y/o aguas de escorrentía pluvial (confluyen en un sistema colector). Las propiedades de estos vertidos dependen del núcleo de población en el que se generen (influyen factores como número de habitantes, existencia de industrias dentro del núcleo, tipo de industria, etc.).
Agrícolas	De la actividad agrícola en las zonas rurales. Suelen presentar también sustancias tóxicas.

Tabla 3: Características y composición de los tipos de aguas residuales de las depuradoras analizadas **(6).**

Tres de los puntos de muestreo se analizaron por duplicado (A, O y G), recogidos en febrero y mayo (O y G) y en febrero y abril (A). Los otros dos puntos de muestreo se analizaron en febrero y abril (B) y marzo (C).

El uso posterior en todas las depuradoras es para riego, a excepción de la Depuradora O, que es para vertido.

3.2. Procesado

Las muestras se procesaron de acuerdo a los establecido en la legislación aplicable, el R.D. 1620/2007 **(23)**, que especifica que la técnica de análisis es el Método Bailenger modificado **(3)**. Ver **Anexo A**.

3.3. Visualización e identificación

La visualización no se realizó empleando la cámara de McMaster descrita en el método Bailenger. En las muestras con mayor carga de materia orgánica, no es efectiva para la visualización e identificación, ya que no permite emplear objetivos de mayor aumento ni realizar un buen enfoque (véanse las imágenes de la **Figura 6**, en la que se aprecia la diferencia de carga de materia orgánica entre muestras de entrada y salida). Las muestras se visualizaron colocando una alícuota (≈ 100 μL) en un portaobjetos y empleando cubres de 25x60 mm.

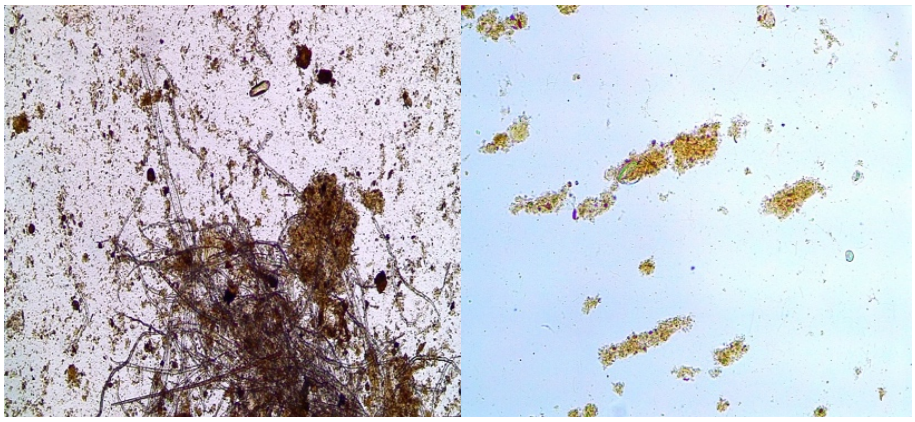


Figura 6: Comparativa visualización al microscopio de una muestra de entrada (izquierda) y una de salida (derecha).

La observación al microscopio se hizo en un microscopio electrónico Leica ICC50VV con obtención de imágenes "in vivo", empleando los objetivos 10x y 40x. Se usó el software Leica Application Suite – LAS EZ (versión 3.4.0) para medir el tamaño de los huevos observados y comprobar que se encontraban dentro del rango esperado para el género y/o especie identificados.

En todos los casos se hicieron lecturas por duplicado, y en algunas de las muestras de entrada se realizaron más de dos lecturas para garantizar una correcta visualización.

3.4. Cálculo y expresión de resultados

Se calculó el número de huevos por litro de muestra de acuerdo a la ecuación descrita en el método Bailenger modificado:

$$N = AX / PV$$

donde:

N = Número de huevos por litro de muestra

A = Número de huevos contados en una lectura o la media del recuento de lecturas

X = Volumen del producto final (mL)

P = Volumen del producto final observado (mL)

V = Volumen de la muestra original (L)

3.5. Criterios de aceptación y rechazo

En todos los casos excepto en uno, las aguas regeneradas analizadas son empleadas para riego. A pesar de encontrarse dentro de diferentes criterios de los recogidos en la norma (1.1, 2.1, 2.2, 2.3 y 4.1), todos comparten el mismo Valor Máximo Admisible (VMA) de 1 huevo/10L (Ver **Tabla 4**). En base a los resultados obtenidos y conociendo el uso previsto, se estableció el cumplimiento de los límites establecidos.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) PARA NEMÁTODOS INTESTINALES
Calidad 1.1: USO URBANO RESIDENCIAL	1 huevo/10L
Calidad 2.1: USO AGRÍCOLA a) Riego de cultivo con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10L
Calidad 2.2: USO AGRÍCOLA a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior. b) Riego de pastos para consumo de	1 huevo/10L *Otros criterios *Taenia saginata y Taenia solium:* 1 huevo/10L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne)

animales productores de leche o carne. **c)** Acuicultura.	
Calidad 2.3: USO AGRÍCOLA a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana. b) Riego de cultivo de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo con del agua regenerada con las producciones. **c)** Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.	1 huevo/10L
Calidad 4.1: USO RECREATIVO **a)** Riego de campos de golf	1 huevo/10L

Tabla 4: Tabla adaptada del R.D. 1620/2007, donde se recogen los criterios de calidad requerida para la reutilización de las aguas residuales según sus usos para el parámetro "*Nematodos intestinales"* **(23)**.

4. RESULTADOS

El resumen de los resultados obtenidos para helmintos intestinales, incluyendo además un apartado en el que se describe la observación e identificación de otros microorganismos (larvas, ácaros, protistas y metazoos) no incluidos en la normativa legal, se presenta en la **Tabla 5** y de forma detallada se describirán a continuación para cada una de las EDAR.

Además de los parásitos objeto de este estudio, el protocolo que se emplea permite la observación de otros microorganismos pertenecientes a diversas categorías taxonómicas. Dentro del grupo de los metazoos, se observaron tanto en las muestras de entrada como de salida, otros nemátodos no parásitos como son larvas de vida libre, y rotíferos. Son también frecuentes los ácaros y gran variedad de protistas. Dentro de este último grupo, se identificaron algunos alveolados, así como ameboides (amebas testáceas). Ver imágenes en el **(Anexo C).**

4.1 Depuradora A

Se analizaron cuatro muestras (dos entradas y dos salidas) recogidas en los meses de febrero y abril. En las muestras de entrada se identificaron 4 huevos de *Ascaris* spp., 2 huevos de Uncinaria y también larvas. En las muestras de salida se detectaron protistas alveolados oligohimenóforos (colonias sésiles) y amebas testáceas.

4.2 Depuradora O

Se analizaron cuatro muestras (dos entradas y dos salidas) pertenecientes a los meses de febrero y mayo. En las muestras de entrada se identificaron 1 huevo de *Ascaris* spp., 1 huevo de *Hymenolepis nana*, 1 huevo de *Trichuris trichiura* y 1 huevo de Uncinaria. También se hallaron ácaros, amebas testáceas y protistas alveolados esticotricos (reptantes). En las muestras de salida se identificaron 2 huevos de *Trichostrongylus* spp. (la presencia de este nemátodo no está contemplada en la legislación actual). También se observó gran presencia de larvas, ácaros, rotíferos, amebas testáceas diversas y protistas alveolados oligohimenóforos (colonias sésiles).

4.3 Depuradora G

Se analizaron cuatro muestras (dos entradas y dos salidas) en los meses de febrero y mayo. En las muestras de entrada únicamente se observó presencia de amebas testáceas, no identificándose ningún parásito de interés ni otros microorganismos en las muestras de salida.

MUESTRA	Resultado nº huevos/litro	Parásitos identificados	Criterios de aceptación	Larvas	Otros micro-organismos
Depuradora A					
Entrada:	31	*Ascaris* spp. Uncinarias	N/A	+	-
Salida:	0	-	Apta	-	Protistas alveolados (Oligohimenóforos) Protistas ameboides (Amebas testáceas)
Depuradora O					
Entrada:	28	*Ascaris* spp. *Trichuris trichiura* *Hymenolepis nana* Uncinarias (?)	N/A	-	Protistas ameboides (Amebas testáceas) Ácaros Protistas alveolados (Espirotricos - Esticotricos)
Salida:	12	*Trichostrongylus* spp.	Apta *Legislación no contempla huevos de *Trichostrongylus* spp.	+	Rotíferos. Protistas ameboides (Amebas testáceas) Ácaros. Protistas alveolados (Oligohimenóforos)
Depuradora G					
Entrada:	0	-	N/A	-	Protistas ameboides (Amebas testáceas)
Salida:	0	-	Apta	-	-
Depuradora C					
Entrada:	0	-	N/A	+	Ácaros
Salida:	0	-	Apta	-	Rotíferos. Protistas alveolados (Espirotricos - Hipotricos)
Depuradora B					
Entrada:	0	-	N/A	-	-
Salida:	0	-	Apta	+	Ácaros

Tabla 5: Resumen resultados obtenidos de todas las muestras. N/A: No aplica; Apta: ≤1 huevo/L; No Apta: >1 huevo/L; +: Presencia; -: Ausencia

4.4 Depuradora C

Se analizaron dos muestras (una entrada y una salida) en los meses de marzo y abril. En la muestra de entrada se observaron ácaros y larvas, y en la muestra de salida se identificaron rotíferos y protistas alveolados hipotricos (reptantes). No se detectaron parásitos de interés.

4.5 Depuradora B

Se analizaron cuatro muestras (una entrada y tres salidas) en los meses de febrero y abril, no detectándose presencia de los parásitos de interés. Esta depuradora tiene 3 puntos diferentes de entrega al usuario con diferentes usos, de ahí que se analizara una única entrada, pero tres de salida. Si se observaron larvas y ácaros en las muestras de salida.

5. DISCUSIÓN

5.1 Eficacia del tratamiento de depuración de las aguas residuales

Los resultados obtenidos para el parámetro de nematodos intestinales en las EDAR analizadas permiten determinar la efectividad de los tratamientos empleados en relación a este parámetro, ya que todas cumplen con los VMA correspondientes. La total ausencia de nematodos intestinales en las salidas de algunas depuradoras concuerda con la baja prevalencia de infecciones humanas por helmintos en Tenerife **(1).** Si bien es cierto que los animales, tanto domésticos, como los empleados en ganadería y los salvajes, pueden presentar tasas más elevadas de parasitosis y estar actuando como reservorios de los parásitos intestinales que pueden ser vehiculizados a través de las aguas depuradas (**11, 18, 24, 28**). Este sería el factor principal de la presencia de formas de dispersión en las aguas residuales y regeneradas en Tenerife.

Cabe mencionar el caso de la presencia de *Trichostrongylus*, observándose en las muestras de salida, pero no de entrada de la Depuradora O, una instalación que recibe tanto aguas urbanas como aguas de uso agrícola y ganadero. Esta diferencia en los resultados podría explicarse, por un lado, por la posibilidad de que ese parásito habitase previamente en los lodos derivados del tratamiento de depuración, pues estudios previos han demostrado su capacidad de supervivencia en fondos ricos en materia orgánica de las estaciones depuradoras **(25, 26)**. Para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar muestras directas de los mismos. Por otro lado, en las depuradoras que reciben mezcla de aguas de origen urbano y agrícola, la carga microbiana y parasitaria es mayor. Es posible que los sistemas de depuración empleados no sean suficientes para la total eliminación de las formas de dispersión parasitarias y que, debido a esa alta carga de materia orgánica, la presencia de este parásito en la entrada pasara inadvertida. Este género no se considera parásito humano habitual, aunque ha habido casos de infecciones humanas en Brasil, Japón o Zimbabue **(2, 21)**.

En relación a las tecnologías empleadas en las plantas depuradoras analizadas, cabe destacar que la Depuradora G, ya tiene un sistema MBR funcional, que se espera implementar en otras instalaciones en un futuro cercano **(8, 13)**. El uso de estos sistemas se traduce en unos efluentes de mucha mejor calidad, en los que no se observaron ni formas de dispersión parasitaria, ni otros microorganismos habituales **(9)**.

5.2 Limitaciones de la técnica de análisis

En cuanto a los resultados para el género *Ascaris* spp. y el grupo de Uncinarias, no fue posible llegar al nivel de especie en la identificación microscópica. Esta

limitación resulta especialmente evidente en las muestras de entrada debido a la alta carga de materia orgánica que presentan, dificultando la correcta visualización al microscopio y, por ende, una identificación fiable. Por estos motivos, sería interesante incluir otras técnicas más específicas y sensibles como la detección mediante biología molecular. Una PCR a tiempo real, para los diferentes géneros incluidos en la norma, nos daría resultados más fiables (que no dependan de la experiencia del observador).

5.3 Identificación de larvas

Tanto en las muestras de aguas residuales brutas como las de los efluentes, es frecuente observar larvas y adultos de nematodos de vida libre que pueden confundirse con formas parasitarias. Existen infinidad de especies diferentes y muchas de ellas aún no se han descrito **(3).** En las muestras de salida de las depuradoras analizadas se observó alta presencia y gran diversidad de larvas, complicando la diferenciación de las formas de vida libre de las parásitas únicamente mediante microscopía óptica. Es cierto que el método empleado sugiere que, a menos que sea posible analizarlas, se ignoren las fases larvarias y adultas ya que, aunque se dé la presencia de formas parasitarias, no se conoce lo suficiente su nivel de supervivencia y viabilidad en estas aguas como para establecer el riesgo que suponen para la salud **(3)**. Aun así, y dado que muchas de las aguas regeneradas se emplean para riego de zonas recreativas, se considera de vital importancia incorporar métodos que permitan diferenciarlas. En el supuesto de que algunas resultaran ser larvas infectivas (filariformes) de especies parásitas, supondría un riesgo para la salud humana a través del contacto con los suelos irrigados con agua contaminada (Véase ciclo biológico de *Strongyloides stercolaris* en **Anexo B**). En el **Anexo D**, se muestran imágenes de larvas rhabditiformes (de vida libre) e infectivas de *Strongyloides stercolaris* y *Ancylostoma duodenale* **(5),** así como otras observadas en las muestras analizadas.

5.4 Utilidad de otros microorganismos como bioindicadores del tratamiento de depuración

Si bien estos microorganismos no eran en inicio objetivo de este estudio, es importante mencionar que muchos de los identificados tienen importancia ecológica, ya que su variabilidad y abundancia están íntimamente relacionadas con la calidad del agua que habitan **(17)**. En el caso de los ácaros, es rara su presencia en fangos activos y son indicadores de depuradoras sin control. Otros nematodos, como las larvas de vida libre, suelen indicar una elevada edad de los fangos. En las muestras analizadas, tanto ácaros como larvas de vida libre se detectaron en las salidas de dos de las plantas más antiguas, B y O. Dentro del grupo de los Metazoos, los Rotíferos suelen encontrarse en sistemas muy estabilizados e indican

eficiencia en la depuración. Resulta lógica su presencia en la salida de la muestra C, tratándose de una planta privada que depura únicamente agua de origen doméstico. En cuanto a los Protistas, se detectaron de forma heterogénea diferentes grupos en las muestras de salida de las plantas A, O y C. Su presencia está relacionada con buenos rendimientos de depuración biológica, lo que indica la efectividad de los procesos depurativos a pesar de la antigüedad de las instalaciones.

6. CONCLUSIONES

1. Los sistemas de depuración de las EDAR analizadas, en cuanto a la eliminación de nematodos intestinales recogidos en la normativa actual, son efectivos.

2. La mejora y modernización de los sistemas de depuración empleados, así como el aumento de instalaciones depuradoras, favorecería la producción de un agua regenerada de mejor calidad que incrementaría los usos posteriores, contribuyendo a un desarrollo hídrico sostenible en la isla de Tenerife.

3. Tras las dificultades experimentadas en la correcta identificación de algunos huevos y larvas, así como la identificación de formas parasitarias no incluidas en la normativa vigente, se considera necesaria una revisión del marco legal actual y de los métodos empleados, de cara a mejorar los controles de calidad de las aguas regeneradas.

4. El estudio de otros grupos de microorganismos (Ácaros, Metazoos y Protistas) como bioindicadores del funcionamiento de las EDAR, constituye un recurso útil para su control.

7.1 ANEXO A: MÉTODO BAILENGER MODIFICADO

FUENTE: *(Ayres, R.M. & Duncan Mara, D. 1997. Analysis of Wastewater for Use in Agriculture A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques. Department of Civil Engineering University of Leeds. Leeds, England)*

Equipo y material fungible

Reactivos

- Solución de sulfato de zinc (33%, densidad relativa 1,18)
- Éter (o acetato etílico)
- Tampón acetoacético (pH 4,5): 15 g de acetato de sodio trihidrato, 3,6 mL de ácido acético glacial, hasta obtener 1 litro con agua destilada
- Solución detergente: 1 mL de Triton X-100 ó de Tween 80, hasta obtener 1 litro con agua del grifo.

Equipo

- Recipientes de plástico abiertos por arriba con capacidad de hasta 10 litros y paredes rectas.
- Mangueras de plástico.
- Centrífuga (capaz de alcanzar hasta 1000 g).
- Tubos de centrífuga de 15, 50 y 50 mL.
- Vórtex (no esencial).
- Microscopio óptico.
- Micropipetas y pipeta automática.
- Material de plástico estéril: puntas para micropipetas automáticas, pipetas Pasteur de plástico.
- Cámara de McMaster.
- Portaobjetos.
- Cubre objetos.
- Balanza (capaz de realizar medidas con una precisión de ± 0,5 gramos).
- Cámara fría, capaz de mantener una temperatura entre 2 - 8ºC.
- Autoclave, capaz de mantener una temperatura de 121(±3) ºC.
- Cabina de extracción de gases.

Guía ilustrada de los diferentes pasos

Para las aguas residuales crudas el método es muy eficiente. Pero para un recuento eficiente de huevos en los efluentes de aguas residuales tratadas debe aumentarse el tamaño de la muestra hasta por lo menos 10 litros, ya que en este caso el número de huevos es muy inferior. Consta de los pasos siguientes:

1. Recójase una muestra de agua residual de volumen conocido *(V* litros), generalmente 1 litro en el caso de las aguas residuales crudas o parcialmente tratadas y 10 litros en el caso de los efluentes finales de aguas tratadas.

2. Déjese que la muestra sedimente durante 1-2 horas, según el tamaño del recipiente. Para la sedimentación se recomienda emplear un recipiente abierto, de paredes rectas, porque ello facilita la eliminacion de la materia sobrenadante y permite una mejor limpieza del recipiente **(Fig. A1).**

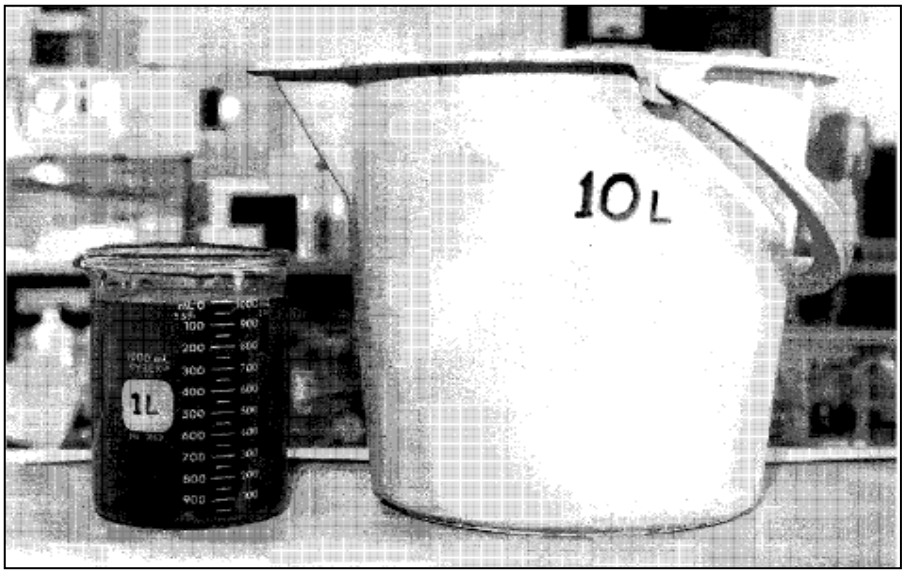


Figura A1: Recipientes de paredes rectas, adecuados para la sedimentación.

3. Elimínese el 90% de la materia sobrenadante utilizando una bomba de succión o un sifón **(Fig. A2)**.

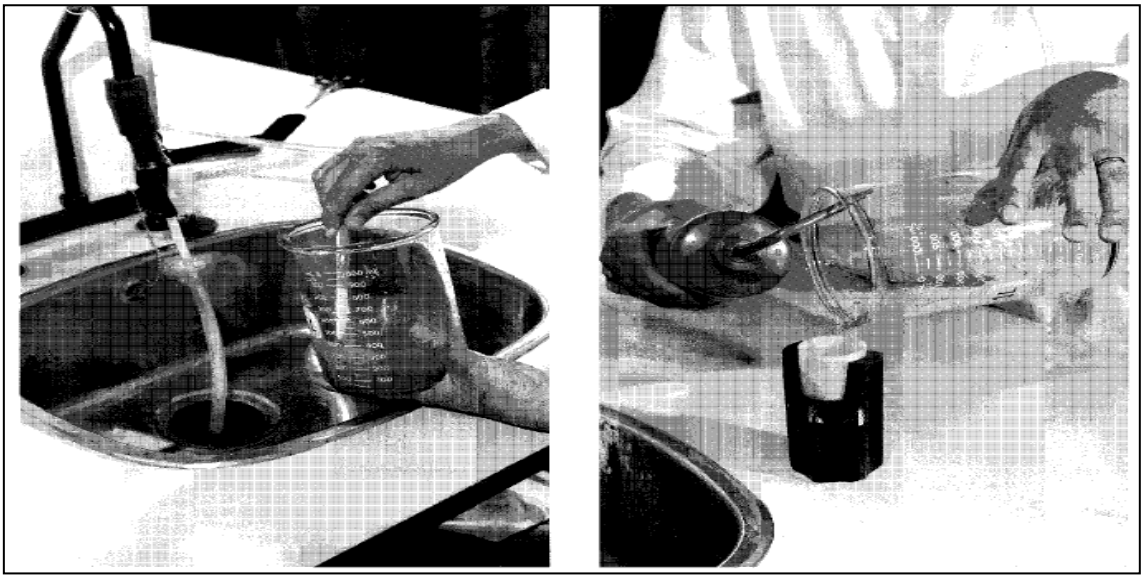


Figura A2 (izquierda): Eliminación de la materia sobrenadante con una bomba de succión.
Figura A3 (derecha): Enjuague de las paredes del recipiente con una solución detergente diluida.

4. Transfiérase cuidadosamente el sedimento a uno o más tubos de centrifugación, según sea el volumen, y centrifúguese a 1000g durante 15 minutos. Recuérdese que hay que enjuagar bien el recipiente con solución detergente y añadir el líquido de enjuague al sedimento **(Fig. A3)**.

5. Elimínese la materia sobrenadante. Si en el paso 4 se ha utilizado más de un tubo de centrifugación, transfiéranse todos los sedimentos a un solo tubo (enjuagando bien con solución detergente para evitar que se pierda sedimento), y vuélvase a centrifugar a 1000g durante 15 minutos.

6. Suspéndase el sedimento en un volumen igual de tampón de acetoacético, pH 4,5 (es decir, si el volumen del sedimento es de 2 mL, añádanse 2 mL de tampón). Si el sedimento es de menos de 2 mL, añádase tampón hasta 4 mL para asegurarse de que, tras la extracción con acetato etílico (pasos 7 y 8) quedará un volumen de tampón suficiente por encima del sedimento para poder verter la capa de acetato etílico sin que se produzca una nueva suspensión del sedimento.

7. Añádanse dos volúmenes de acetato etílico o de éter (es decir, 4 mL en el ejemplo citado) **(Fig. A4),** y mézclese bien la solución en una mezcladora de vórtice. También cabe agitar la muestra a mano. Esta forma de proceder es perfectamente aceptable si no se dispone de una mezcladora mecánica **(Fig. A5)**.

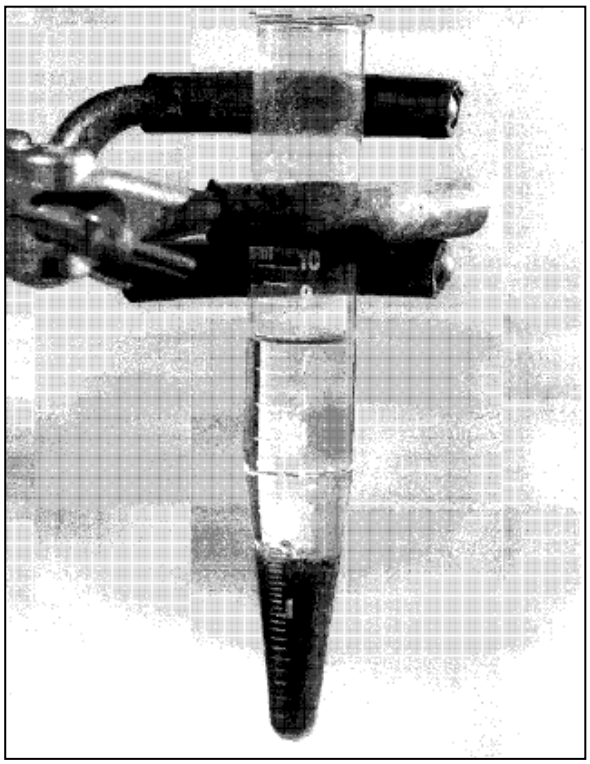


Figura A4: El sedimento, con 1 volumen de tampón y 2 volúmenes de disolvente.

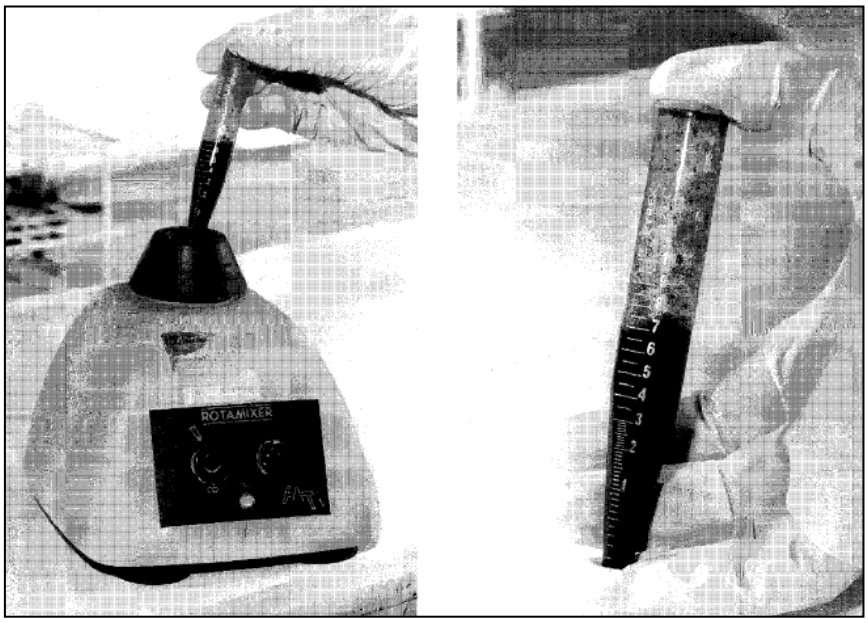


Figura A5: La homogeneización de la muestra puede realizarse sin mezcladora de vórtice (izquierda) o también se puede homogeneizar a mano (derecha).

8. Centrifúguese la muestra a l000g durante 15 minutos. Ahora la muestra se habrá separado en tres fases distintas. Todos los residuos no grasos, más pesados, incluidos los huevos de helminto, las larvas y los protozoos, se encontrarán en la capa inferior. Encima de esta se encontrará el tampón, que deberá ser transparente. Las materias grasas y otras se unen al acetato etílico o el éter y forman un tapón grueso y oscuro en la parte superior de la muestra **(Fig. A6)**.

9. Anótese el volumen del sedimento que contiene los huevos, y retírese el resto del material sobrenadante en un solo movimiento suave **(Fig. A7)**. Puede ser necesario soltar primero el tapón graso pasando una aguja fina alrededor de las paredes del tubo de centrifugación.

10. Vuélvase a suspender el sedimento en cinco volúmenes de solución de sulfato de cine (es decir, si el volumen del sedimento es de 1 mL, añádanse 5 mL de $ZnS0_4$). Anótese el volumen del producto final (X mL). Mézclese bien la muestra, preferiblemente con una mezcladora de vórtice. Téngase en cuenta que para llenar un portaobjetos de McMaster de dos cámaras se necesita un mínimo de 1,5 mL.

11. Retírese rápidamente una parte alícuota con una pipeta de Pasteur y transfiérase a un portaobjetos de McMaster para su examen final**.**

12. Déjese reposar el portaobjetos de McMaster lleno en una superficie plana durante 5 minutos antes de proceder a su examen. De esta manera todos los huevos quedaran flotando en la superficie.

13. Póngase el portaobjetos de McMaster en el microscopio y examínese con un aumento de 10x o 40x. Cuéntense todos los huevos que aparezcan en la parrilla de las

dos cámaras del portaobjetos de McMaster. Para mayor precisión, regístrese el promedio de dos portaobjetos, o, mejor, tres.

14. Calcúlese el número de huevos por litro mediante la ecuación:

$$N = AX/PV$$

en la que:

N = número de huevos por litro de la muestra
A = número de huevos contados en el portaobjetos de McMaster o promedio del recuento en dos o tres portaobjetos
X = volumen del producto final (mL)
P = volumen del portaobjetos de McMaster (mL)
V = volumen de la muestra original (L)

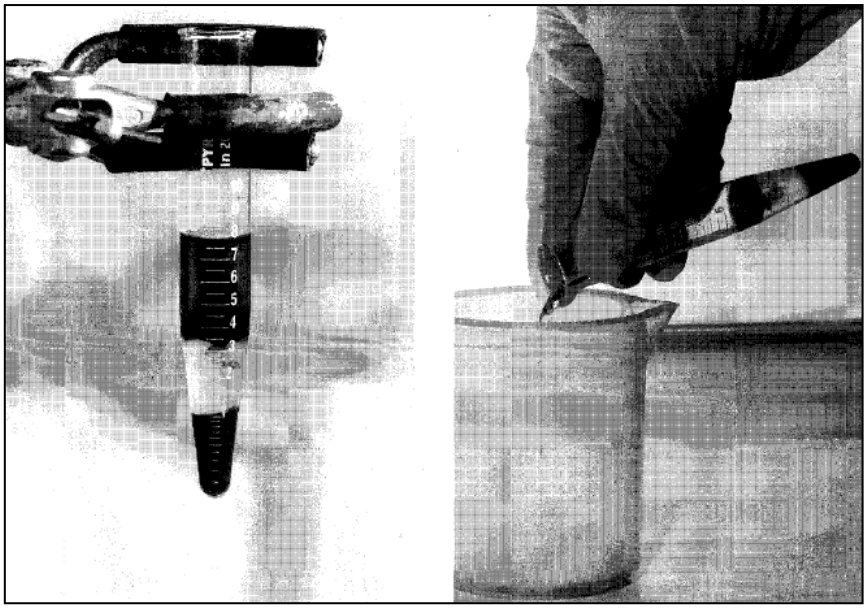


Figura A6 (izquierda): Separación de la muestra en tres fases distintas después de la centrifugación.
Figura A7 (derecha): Se elimina el material sobrenadante para dejar solamente el sedimento.

7.2. ANEXO B: CICLOS BIOLÓGICOS DE HELMINTOS INTESTINALES MÁS FRECUENTEMENTE RELACIONADOS CON AGUAS RESIDUALES

FUENTE: Center for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov)

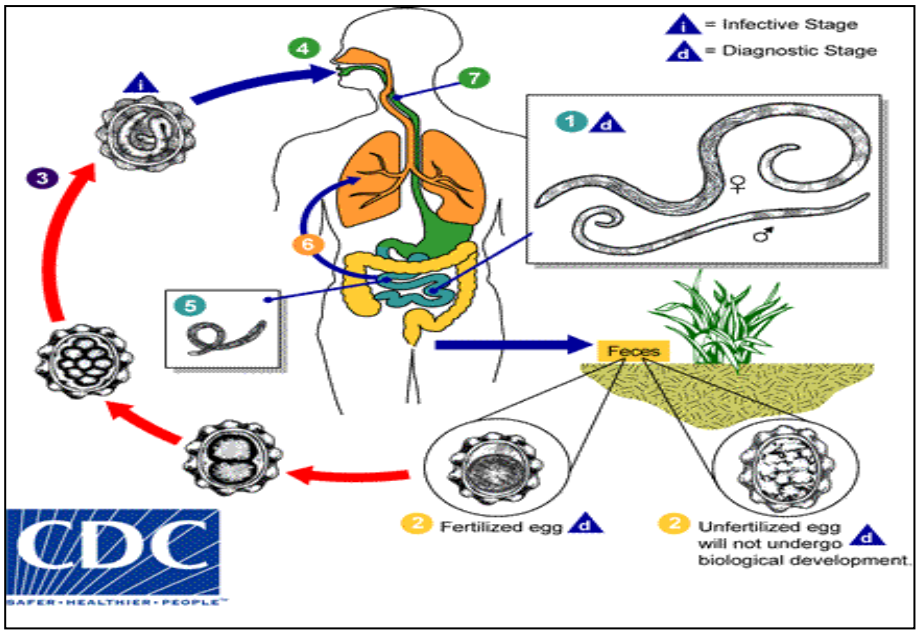


Figura B1: Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*

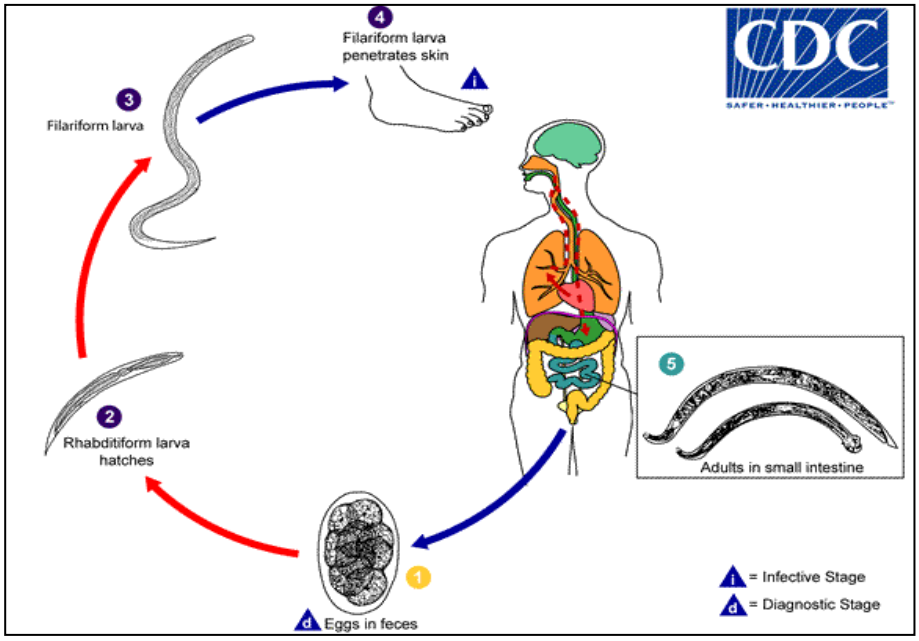


Figura B2: Ciclo biológico de Uncinarias

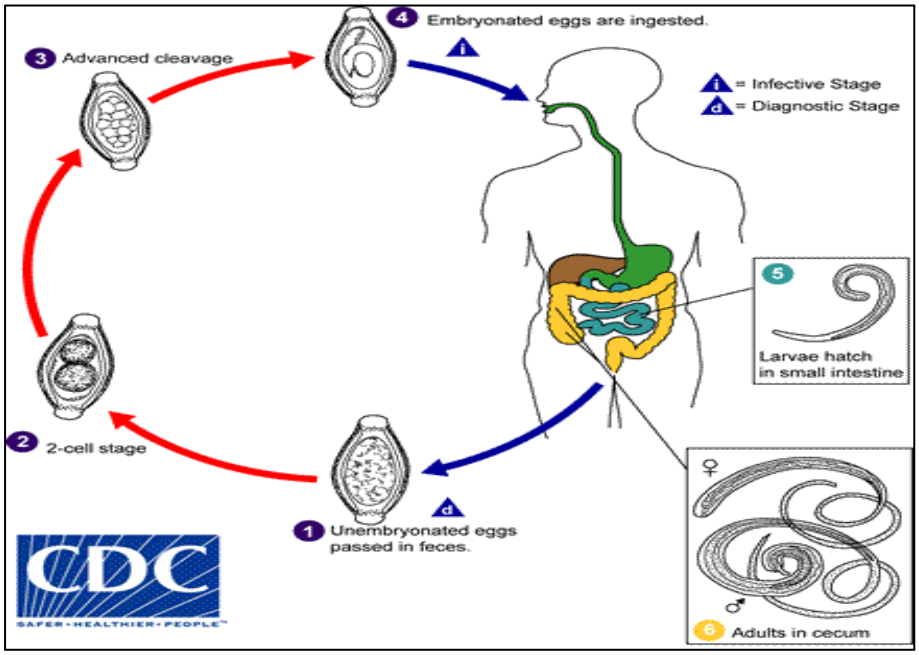


Figura B3: Ciclo biológico de *Trichuris trichiura*

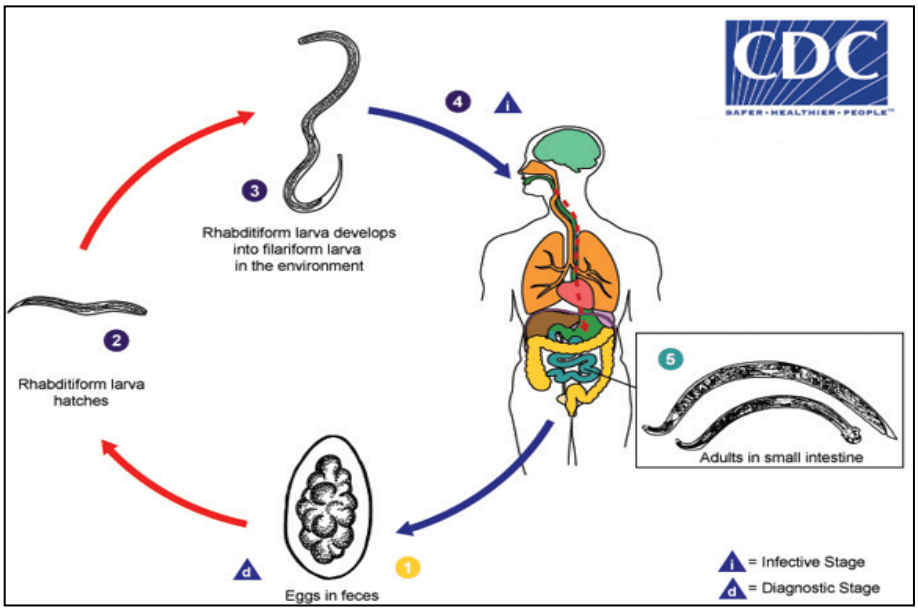


Figura B4: Ciclo biológico de *Trichostrongylus*

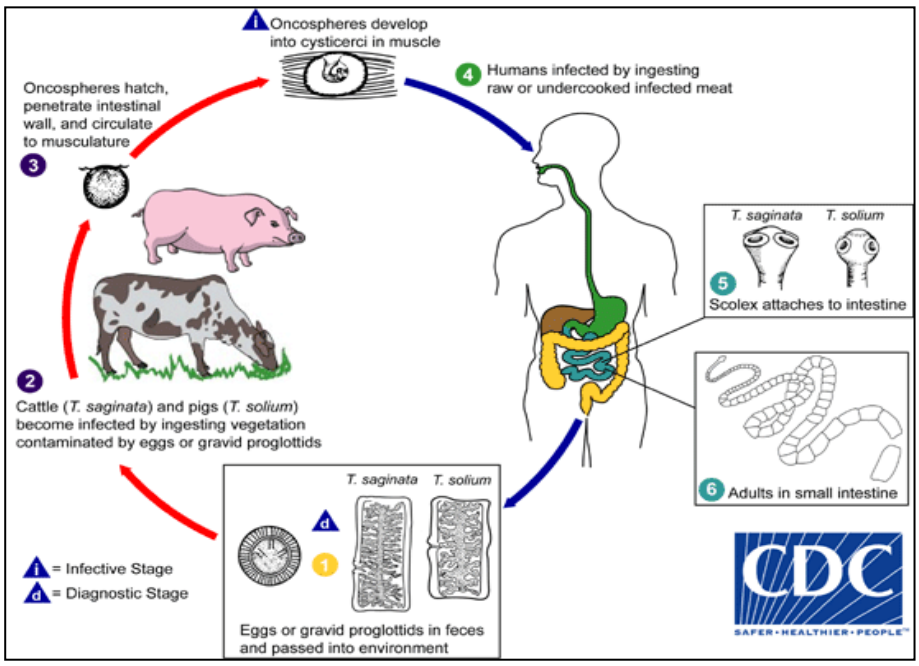


Figura B5: Ciclo biológico de *Taenia* spp.

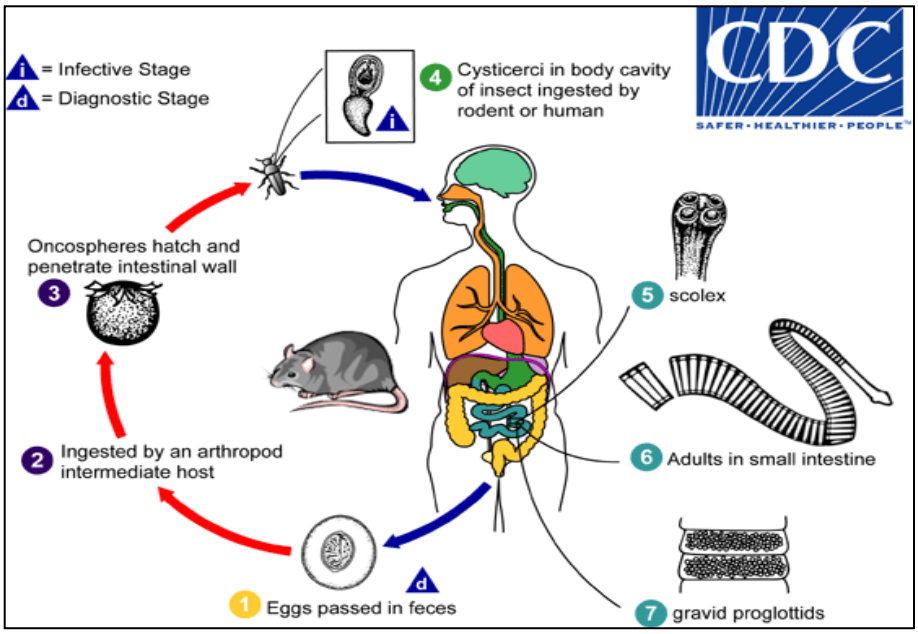


Figura B6: Ciclo biológico de *Hymenolepis diminuta*

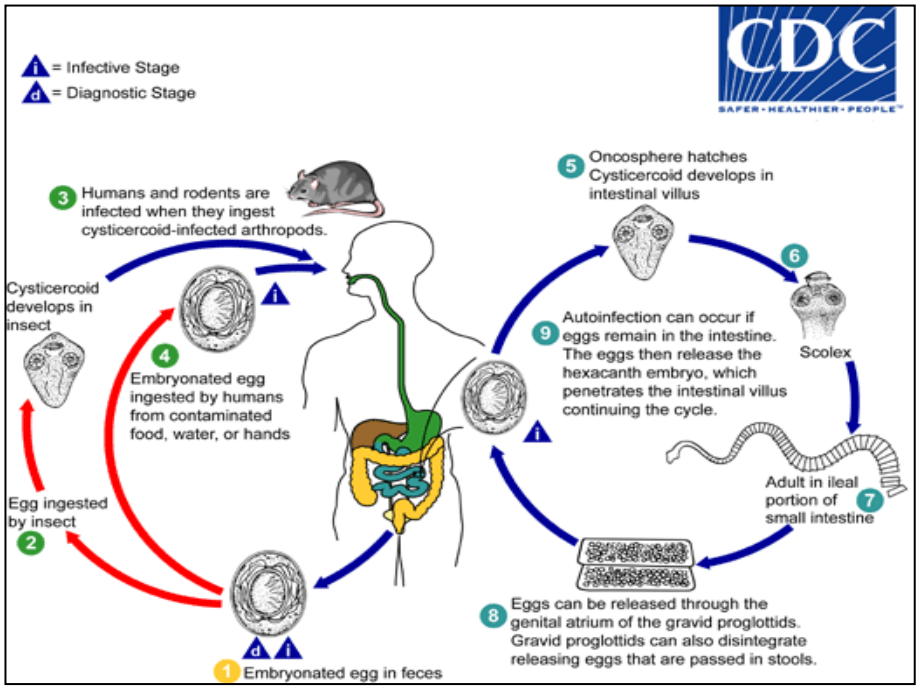


Figura B7: Ciclo biológico de *Hymenolepis nana*

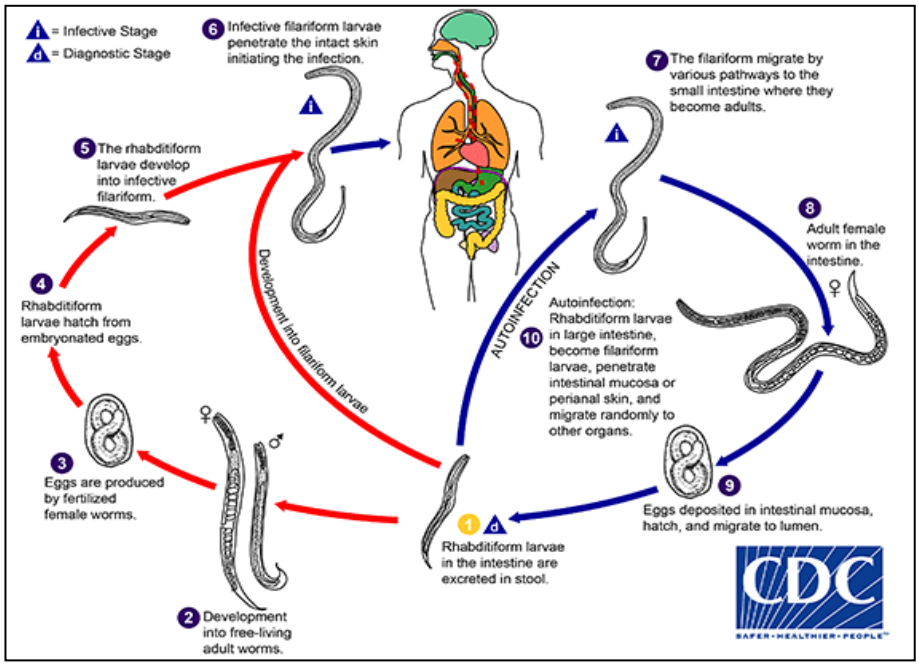


Figura B8: Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*

7.3. ANEXO C: IMÁGENES DE HELMINTOS IDENTIFICADOS EN ESTE ESTUDIO

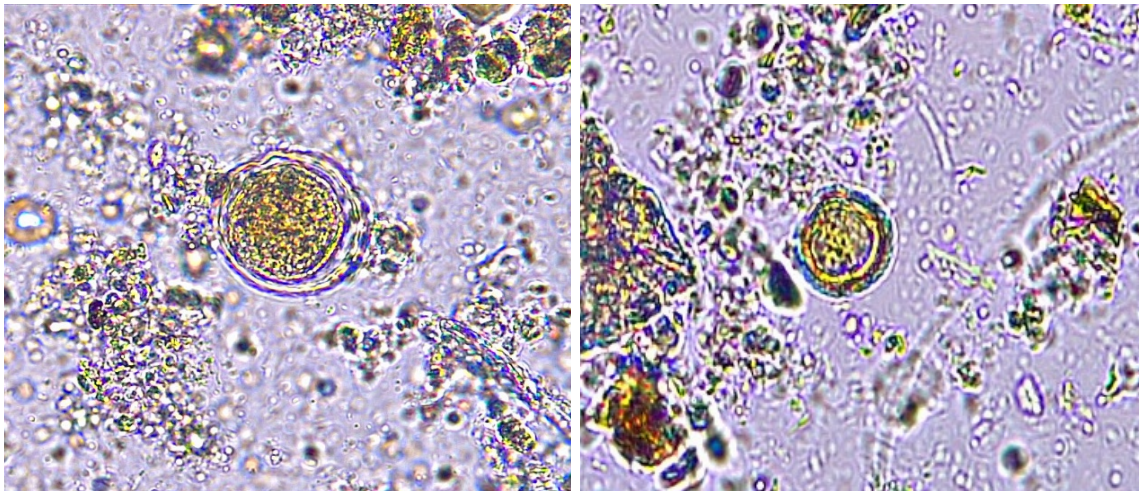


Figura C1: Huevos del género *Ascaris* spp. (x40).

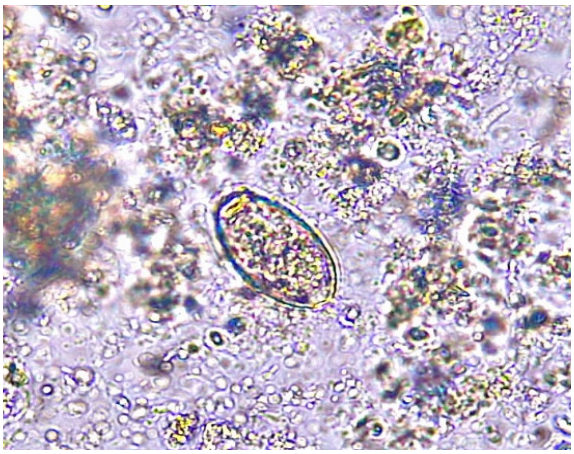


Figura C2: Huevo *Trichuris trichiura* (x40).

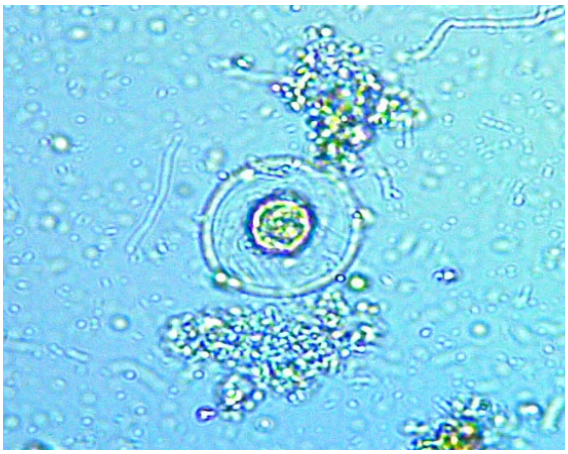


Figura C3: Huevo de *Hymenolepis nana* (x40).

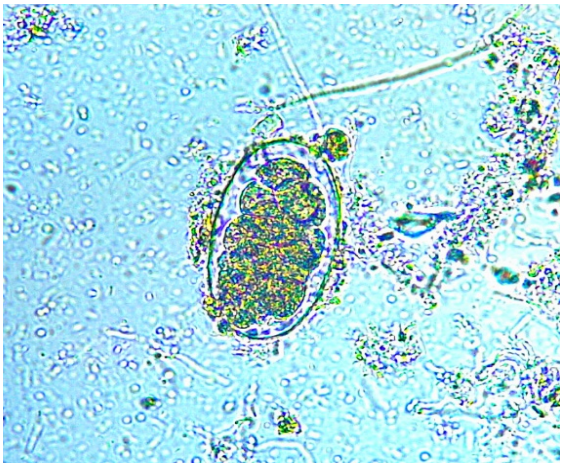


Figura C4: Huevo de Uncinaria (x40).

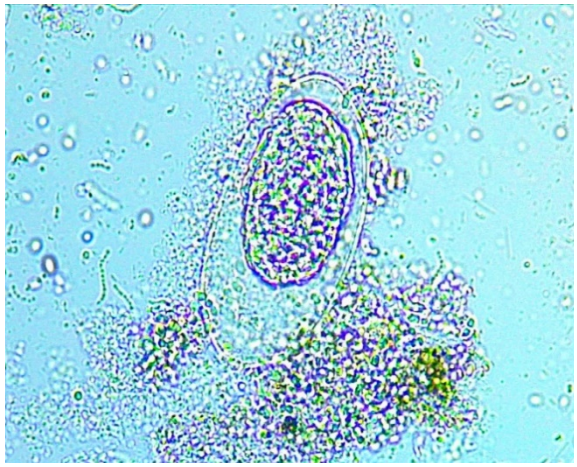


Figura C5: Huevo *Tricostrongylus* spp. (x40).

7.4. <u>ANEXO D:</u> GLOSARIO DE IMÁGENES DE OTROS MICROORGANISMOS

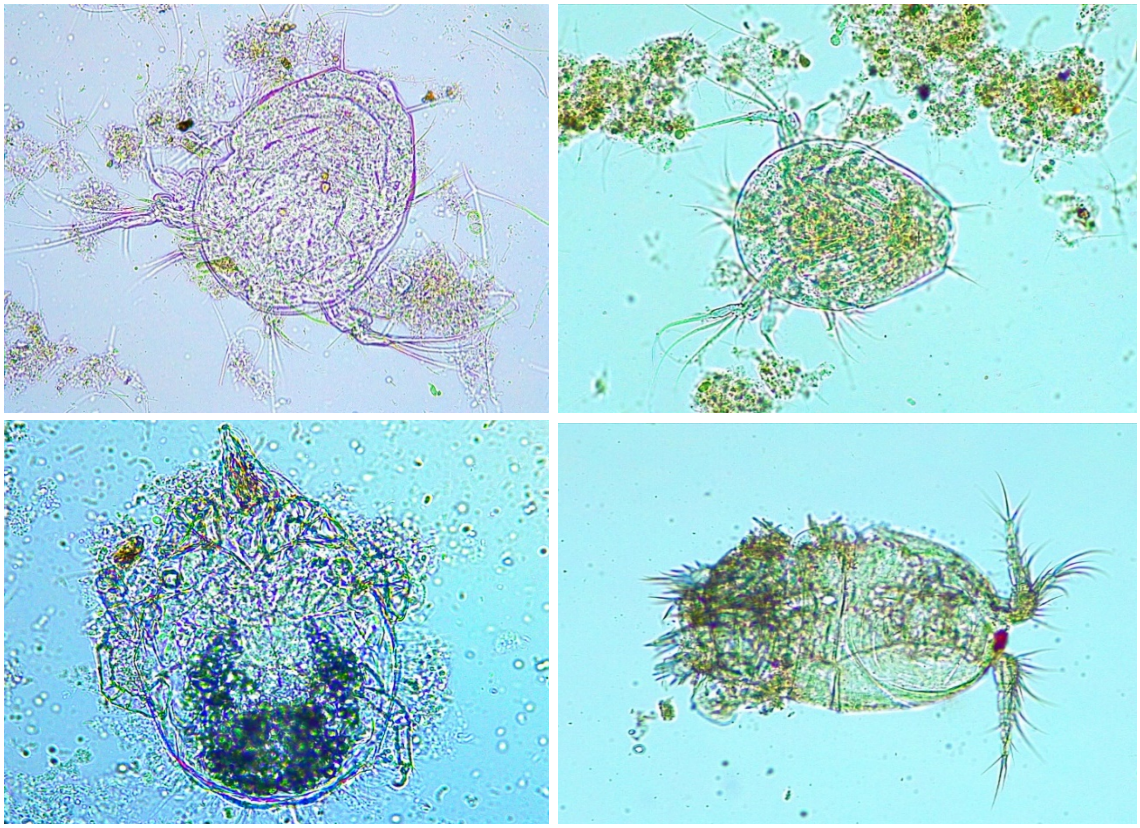


Figura D1: Imágenes de Ácaros (Metazoos) (x40)

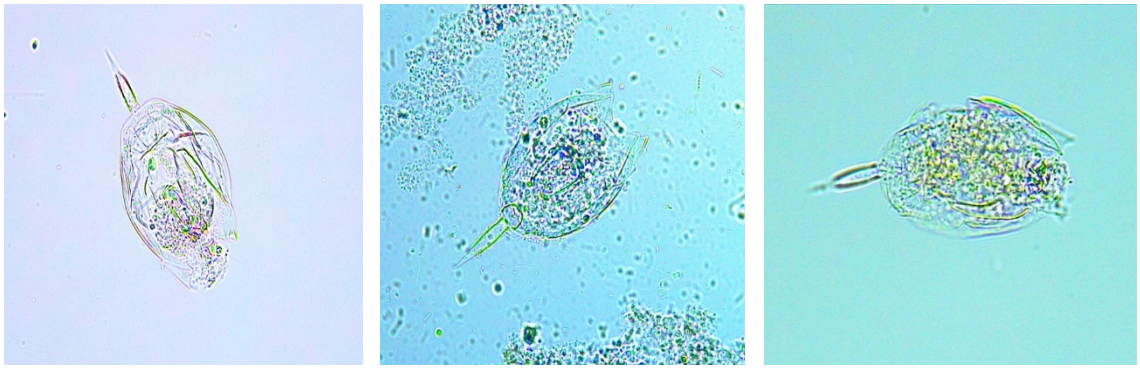


Figura D2: Imágenes de Rotíferos (Metazoo) del género *Lecane* (x40).

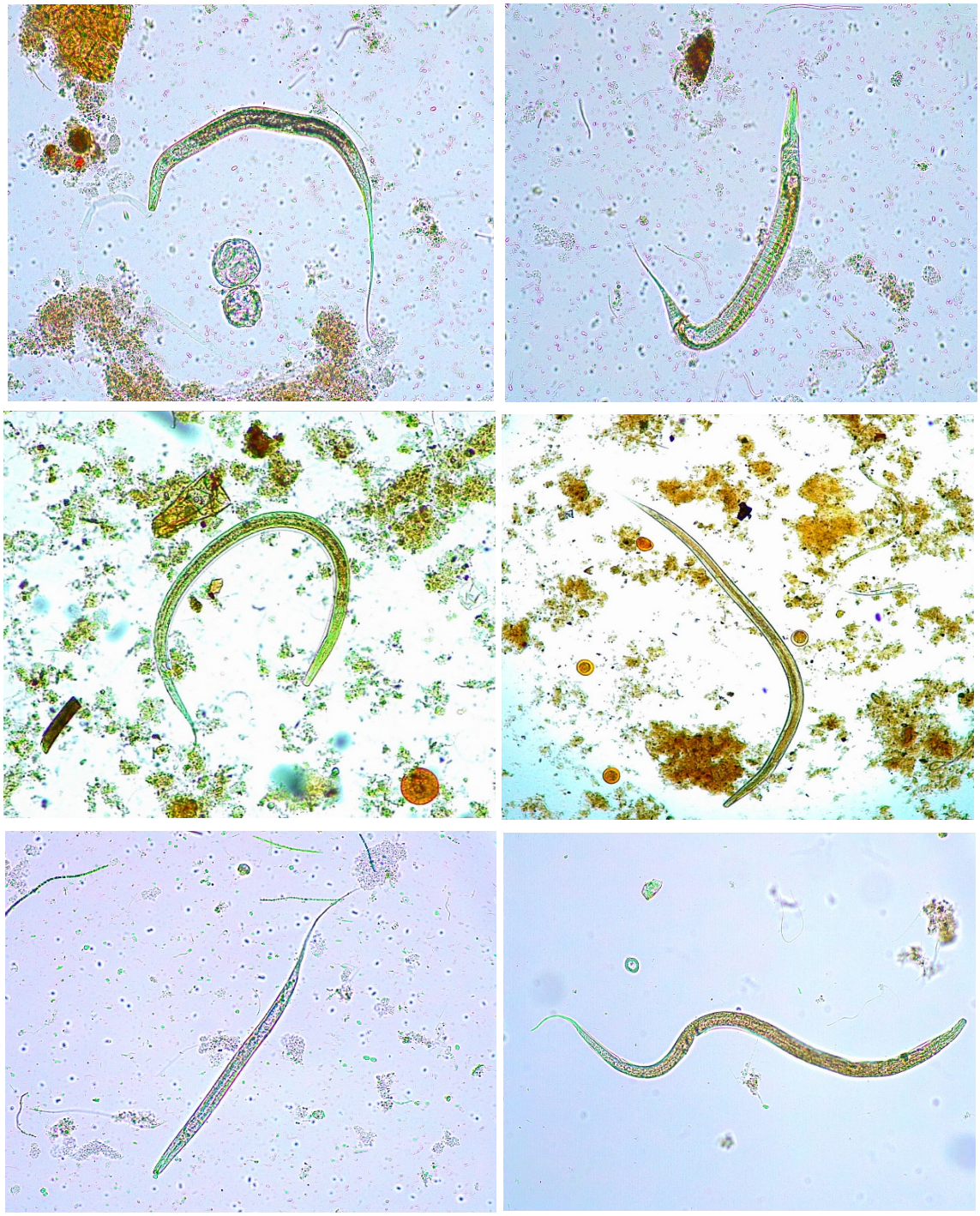


Figura D3: Imágenes de larvas (x20). Véanse también las imágenes de las Figuras D4 y D5 como comparativa de la complicada diferenciación de larvas de vida libre frente a las parásitas.

Figura D4: Imágenes de larva rhabditiforme (de vida libre) (izquierda) y larva filariforme (parásita) (deerecha) de la especie *Ancylostoma duodenale* (Fuente: CDC).

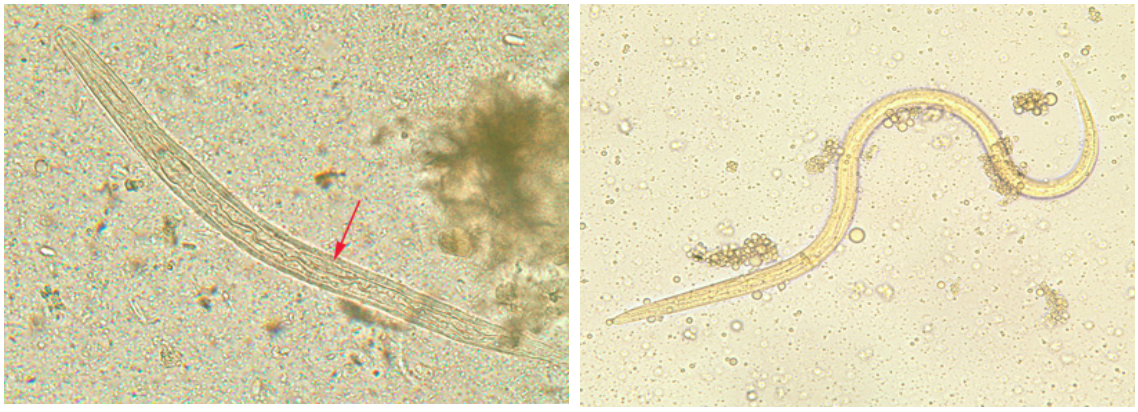


Figura D5: Imágenes de larva rhabditiforme (de vida libre) (izquierda) y larva filariforme (parásita) (derecha) de la especie *Strongyloides stercolaris* (Fuente: CDC).

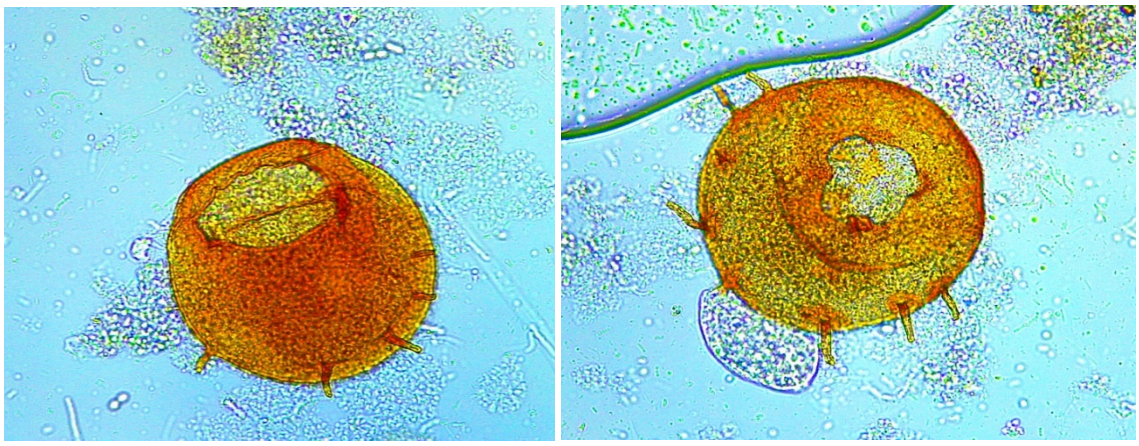


Figura D6: Imágenes de amebas testáceas del género *Centropyxis* (x40).

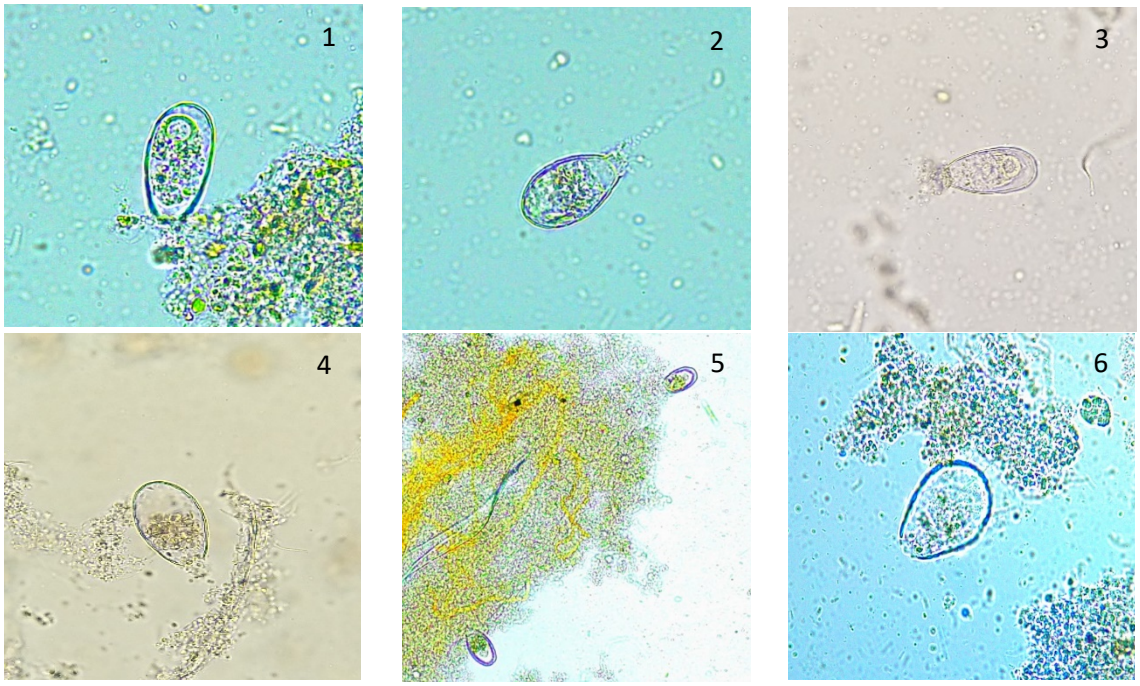


Figura D7: Imágenes de amebas testáceas del género *Hyalosphenia* (2, 4, 5 y 6) y del género *Trinema* (1 y 3) (x40).

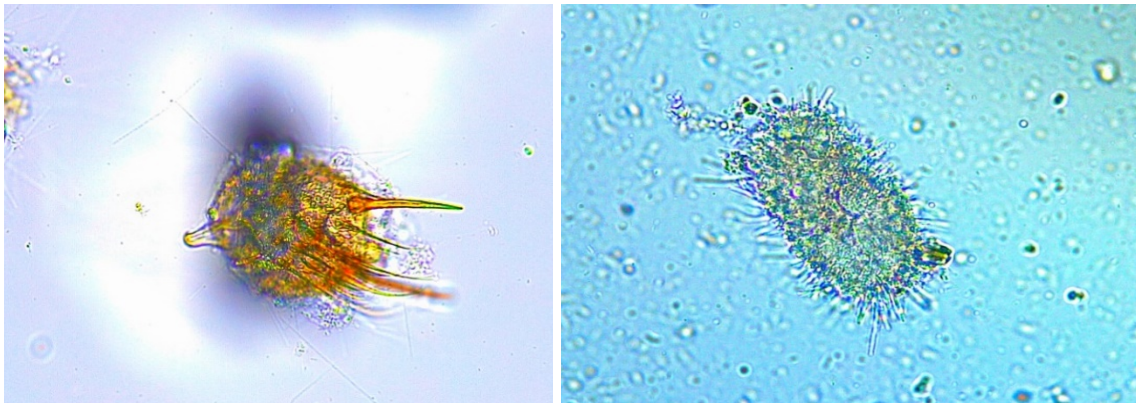


Figura D8: Imágenes de protistas alveolados de tipo Espirotricos: reptante Hipotrico (izquierda) y Esticotrico (derecha) (x40).

Figura D9: Imágenes de protistas alveolados Oligohimenóforos: colonias sésiles (izquierda: x40; derecha: x10).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abreu-Acosta, N. & Vera, L. 2011.** Occurrence and removal of parasites, enteric bacteria and faecal contamination indicators in wastewater natural reclamation systems in Tenerife-Canary Islands, Spain. *Ecological Engineering,* 37: 496-503.

2. **Acha, P.N. & Szyfres, B. 2003.** Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales (Volumen III, Parasitosis, Sección B, 3: 318-320. Publicación Científica y Técnica No.580.Tercera edición Washington, D.C: OPS.

3. **Ayres, R.M. & Duncan Mara, D. 1997.** Analysis of Wastewater for Use in Agriculture A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques. Department of Civil Engineering University of Leeds. Leeds, England.

4. **Ash, L. & Orihel, T. 2010.** Atlas parasitología humana. Ed. Médica Panamericana 5ª Ed.

5. **Center for Diseases Control and Prevention (CDC).** URL: http://www.cdc.gov . Acceso 04/2018 y 05/2018.

6. **Cyclus ID.** URL: http://www.cyclusid.com/tecnologias-aguas-residuales/tipologias . Acceso 05/2018.

7. **Consejería de Educación, Universidades y Biodiversidad – Gobierno de Canarias – SIMAC (Sistema de información medioambiental de Canarias).** URL: http://www.gobcan.es/medioambiente/piac/temas/aguas/medidas-y-factores/contaminacion-y-vertidos/mas-informacion/depuracion-y-reutilizacion/. Acceso 04/2018 y 05/2018.

8. **Delgado, S., Rodríguez-Gómez, L., Vera, L., Díaz, F., Rodríguez, J., Álvarez, M., & Martel, G. 2006.** La reutilización del agua depurada en Canarias. ¿Expansión o estancamiento? *Anuario del Instituto de Estudios Canarios*, 50: 819-828.

9. **Delgado, S., Villaroel, R. & González, E. 2006.** Tratamiento avanzado de las aguas residuales de Santa Cruz de Tenerife: biorreactores de membrana. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios*, 50: 829-842.

10. **Díaz Solano, R. 2017.** Análisis de la comunidad microbiana de un

Biorreactor de Membrana Sumergida (BMS) para depuracion de aguas residuales. Caracterización de la fracción proteica del biofilm asociado a la membrana. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna.

11. **Foronda P, López-González M., Hernández M., Haukisalmi V. & Feliú C., 2011.** Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain). *Parasites & Vectors,* 10.1186/1756-3305-4-185.

12. **Fos, S., Vendrell, E., Minardi, R., Morales, M.M. & Llopis, A. 2000.** Enfermedades parasitarias de origen alimentario más frecuentes en España: incidencia y comparación con las de origen vírico y bacteriano. *Ars Pharmaceutica*, 41: 293-305.

13. **Guerra, S. 2016.** Evaluación de las condiciones óptimas de filtración de suspensiones anaerobias a través de membranas sumergidas de fibra hueca. Trabajo de fin de Grado en Ingeniería Química Industrial. Universidad de La Laguna.

14. **Guía Visual Artrópodos. URL: http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_2.pdf** . Acceso el 04/ 2018.

15. **Instituto Canario de Estadística (ISTAC).** URL: http://www.gobiernodecanarias.org/istac . Acceso el 05/2018.

16. **Isac, L., Rodríguez, E., Salas, L., Fernández, N, Zornoza, A., Madoni, P., Mitchell, E., Narbona, E., Gómez, A., & Suárez, J. 2008.** Atlas de Protistas y Metazoos presentes en el fango activo (Jornada Internacional de Tratamiento y Reutilización de Aguas residuales. Papel de los Protistas. Universidad de Sevilla.

17. **Luna Pabello, V.M. 2006.** Atlas de Ciliados y otros microorganismos frecuentes en sistema de tratamiento aerobio de aguas residuales. Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 970-32-3399-6.

18. **Martín – Alonso A., Foronda P., Quispe-Ricalde M.A., Feliú C. & Valladares B., 2011.** Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rodents from the Canary Islands. 6(11):e27747.

19. **Memoria informativa sobre el Plan Hidrológico de Tenerife. 2015.** Consejo Insular de Aguas de Tenerife. Cabildo de Tenerife.

20. **Molleda, P., Blanco, I., Ansola, G. & De Luis, E. 2008.** Removal of wastewater pathogen indicators in a constructed wetland in Leon, Spain.

Ecological Engineering, 33: 252–257**.**

21. **Paixão, R., Nascimento, J., Figueiredo, J., Alcânta, L.M., Matos, N. & Aquino, M.C. 2013.** Infección humana por *Trichostrongylus* spp. en residentes de zonas urbanas de la ciudad de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista Biomédica*, 33: 439-445.

22. **Peñate, B., Martel, G., Vera, L., Másquez, M., Gutiérrez, J., Moreno, E., del Castillo, G., & Farrujia, I.** El Agua en Canarias (Textos y gráficos extracto del libro "Guía del Agua en la Macaronesia Europea"). Ed: Instituto Tecnológico de Canarias, S.A. (ITC). ISBN: 978-84-690-6404-7.

23. **R. D. 1620/2007, de 7 de diciembre** (BOE núm.294, sábado 8 diciembre 2007 - 50643).

24. **Ruiz A., Foronda P., González J.F., Guedes A., Abreu-Acosta N., Molina J.M. & Valladares B., 2008.** Ocurrence and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain. *Vet Parasitol,* 154(1-2):137-41.

25. **Santos M.C., Martín I. & Trujillo E.M., 2013.** Nematodes as a factor for consideration in the Wastewater treatment and water reuse process. *Journal Desalation and Water Treatment*, Vol. 52 – Issue 25-27, 52:25-27, 4715-4720.

26. **Segunpta, M.E., Andersen, T.J., Dalsgaard, A., Olsen, A. & Thamsborg, S.M. 2012.** Resuspension and settling of helminth eggs in water: interactions with cohesive sediments. *Water research*, 46: 3903-3912.

27. **Toledo, C., De Armas, F., Del Castillo, A., Arévalo, P., Piñero, J.E. & Valladares, B., 1994.** La contaminación parasitaria de parques y jardines como problema de salud pública. Datos de la isla de Tenerife. *Rev. San. Hig. Púb*, 6X: 617-672.

28. **Torres J., Foronda P., Eira C., Miquel J. & Feliú C., 2010.** Trace element concentrations in *Raillietina micracantha* in comparison to its definitive host, the feral pigeon *Columba livia* in Santa Cruz de Tenerife (Canary Archipelago, Spain). *Arch Environ Contam Toxicol,* 58(1):176-82.