

VIABILIDAD DE QUISTES DE *G. LAMBLIA* Y OOQUISTES DE *C. PARVUM* EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CONVENCIONAL

Ana Paola Balderrama*, Luciano Castro*, Pablo Gortáres*, Fernando Lares*, José de Jesús Balderas* y Cristóbal Chaidez*

*Instituto Tecnológico de Sonora (Cd. Obregón, Sonora, México), **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Culiacán Sinaloa, México)
E-mail: payologi@msn.com



Introducción

G. lamblia y *C. parvum* son parásitos protozoarios muy distantes en su relación, sin embargo, son biológica, epidemiológica y zoonóticamente similares (1). *G. lamblia* se encuentra en el agua y el medio ambiente en su etapa del quiste (2) y *C. parvum* se encuentra en forma de ooquiste (3). Tanto quistes como ooquistes son las formas infecciosas y pueden ser ingeridos en agua o alimentos contaminados o directamente por contacto fecal-oral (4). La transmisión es sostenida en humanos y animales (5). Las dosis infecciosas mínimas para ambos parásitos

son muy bajas. El consumo de 10 quistes u ooquistes puede causar infección (6, 7, 8). Los padecimientos que se originan por la ingestión de estos parásitos son por lo regular relacionados a cuadros diarreicos. *G. lamblia* y *C. parvum* pueden permanecer viables de 15 días a dos meses en agua, de 15 días a un mes en el suelo y de 2 a 10 días en hortalizas (9). En México, no hay una ley que exija la evaluación microbiológica del agua en relación con el riesgo para la salud producida por protozoarios patógenos. La Norma oficial mexicana NOM-003-ECOL-1997 establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios públicos. Esta norma incluye el seguimiento de DBO, huevos de helmintos, coliformes fecales, grasa y aceites y SST (10). Un monitoreo de *G. lamblia* y *C. parvum* consiste en la detección, cuantificación y determinación de la viabilidad de los parásitos patógenos en el agua. Uno de los métodos admitidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) es la ICR para protozoarios. Este método se basa en la flotación, purificación y elución de las muestras que luego se filtran a través de una membrana que se tiñe con anticuerpos monoclonales fluorescentes para su posterior cuantificación en un microscopio de epifluorescencia (11). La viabilidad de los quistes se puede evaluar mediante tinción vital y contraste de fases. La tinción vital se basa en la absorción de fluorocromos específicos (PI o DAPI), por los quistes y ooquistes (12).

La presencia de quistes y ooquistes en los efluentes finales de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) representa un riesgo para los programas de reutilización de agua. No es posible evaluar estadísticamente el riesgo de contraer una infección transmitida por *G. lamblia* y *C. parvum* debido a la falta de información acerca de la viabilidad de quistes y ooquistes (13). En 2003, en Ciudad Obregón, Sonora, se informó la presencia de ooquistes viables en el agua potable en el 69% de las muestras analizadas (14). El proceso en la PTAR del sur de Ciudad Obregón, consiste en un pretratamiento, seguido por lagunas aerobias, facultativas y de sedimentación, para terminar en un proceso de desinfección con cloro (15). La importancia de realizar una investigación que evalúe la viabilidad de quistes de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* en la PTAR sur de Cd. Obregón Sonora, es revelar en qué proceso o etapa del tratamiento se disminuye la viabilidad de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, que influya en la posterior implementación de nuevos tratamientos que logren minimizar o descartar la presencia de parásitos patógenos.

Materiales y Métodos

Las muestras fueron recolectadas en la PTAR sur de Cd. Obregón, en el período de agosto 2008-febrero 2009. El muestreo se realizó para la cuantificación de los quistes de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. En junio se llevaron a cabo las pruebas de viabilidad para los parásitos.

Elución, flotación, purificación y tinción de inmunofluorescencia. Estos pasos se realizaron siguiendo el protocolo previsto en el Manual de Laboratorio ICR para microbiología en el Método Protozoarios para los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* (16) con ciertas modificaciones como las siguientes: El filtrado no era necesario. Las muestras se midieron en una cantidad de 500 ml. Para las pruebas de viabilidad se hicieron varias modificaciones. El tiempo de centrifugación se disminuyó de 2800 a 2000 rpm durante 10 minutos, se descartó la resuspensión en formalina (no se almacenó). Para la prueba de inmunofluorescencia se utilizó el kit de Aqua Glo TM G/C que incluye anticuerpo, control positivo y solución de montaje (17).

Tinción vital (Seguida por la tinción de inmunofluorescencia). Los reactivos para la prueba de viabilidad se prepararon de acuerdo a las especificaciones en el Método 1623: *Cryptosporidium* y *Giardia* en el agua por filtración, separación inmunomagnética y prueba de inmunofluorescencia (18).

Examen microscópico. Las membranas fueron examinadas bajo un microscopio Carl Zeiss Axiolab de epifluorescencia. Se buscó fluorescencia de color verde manzana en objetos esféricos de 4 a 6 micras para los ooquistes y de forma ovalada de 5 a 10 micras para los quistes. El cálculo de los quistes y los ooquistes se llevó mediante la fórmula contenida en el método ICR. La presencia de los protozoarios se reportó en número de organismos por cada 100 litros (19). Para la determinación de la viabilidad mediante contraste de fases se utilizó un microscopio Leica DME con un conjunto de filtros + DAPI FITC. Se empleó el objetivo 400 X. Los objetos que se observaron tuvieron las siguientes características: a) tinción interna azul (sin distinción del núcleo), con un halo verde, b) Observación de núcleos cielo azul. Un resultado positivo para viabilidad fue cuando se mostró una inmunofluorescencia no atípica (b). Los resultados se reportan en el número de microorganismos viables por cada 100 L.

Eficiencia de recuperación. Para realizar la eficiencia se utilizó una concentración stock de quistes y ooquistes/mL (se utilizó el control positivo del kit). Los quistes y ooquistes en el stock fueron contabilizados utilizando una cámara de Neubauer. Para el cálculo se implementó la siguiente fórmula:

$$\text{No. De (oo) quistes/ mL} = (\text{No. De (oo) quistes contados/No. de mm}^2 \text{ contados}) * (10/1 \text{ mm})^*$$

$$(\text{Factor de dilución}/1) * (1000 \text{ mm}^3/1)$$

Se preparó una concentración para obtener de 30-300 (oo) quistes por muestra y se inocularon en 100 L de agua pura, la cual se procesó de acuerdo al método ICR anteriormente descrito. Se corrió a la par una muestra compuesta de agua tratada (todo se realizó por triplicado). El porcentaje de recuperación (%R) se calculó de la siguiente manera:

$$\%R = (\text{No. (oo) quistes muestra inoculada}) - (\text{No. de (oo) quistes en muestra ambiental}) / (\text{No. (oo) quistes inoculados}) * 100$$

Análisis de datos. Los resultados fueron obtenidos por análisis de frecuencia, y análisis de varianza utilizando el software profesional Statgraphic Plus 4.0. La eliminación de quistes y ooquistes fueron obtenidos por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ remoción} = [\text{Parásitos de agua cruda}] - [\text{parásitos de agua tratada}] / \text{parásitos de agua cruda} * 100.$$

Resultados

Se detectaron quistes de *Giardia lamblia* en 51/51 (100%) de las muestras analizadas. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se encontraron en 42/51 (82%). Los porcentajes de recuperación fueron de 88% para *G. lamblia* y 33 % para *C. parvum*. La Tabla 1 muestra las concentraciones mínimas y máximas en el afluente y el efluente de la PTAR.

Tabla 1. Concentraciones máximas y mínimas de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* por cada 100 L al inicio y final del proceso de tratamiento.

Concentración (100/L)		
Etapas de Tratamiento	Quistes de <i>G. lamblia</i>	Ooquistes de <i>C. parvum</i>

	max	min	max	min
Influyente	130,000	15,000	57,500	4,000
Efluente	37,500	2,500	7,500	1,250

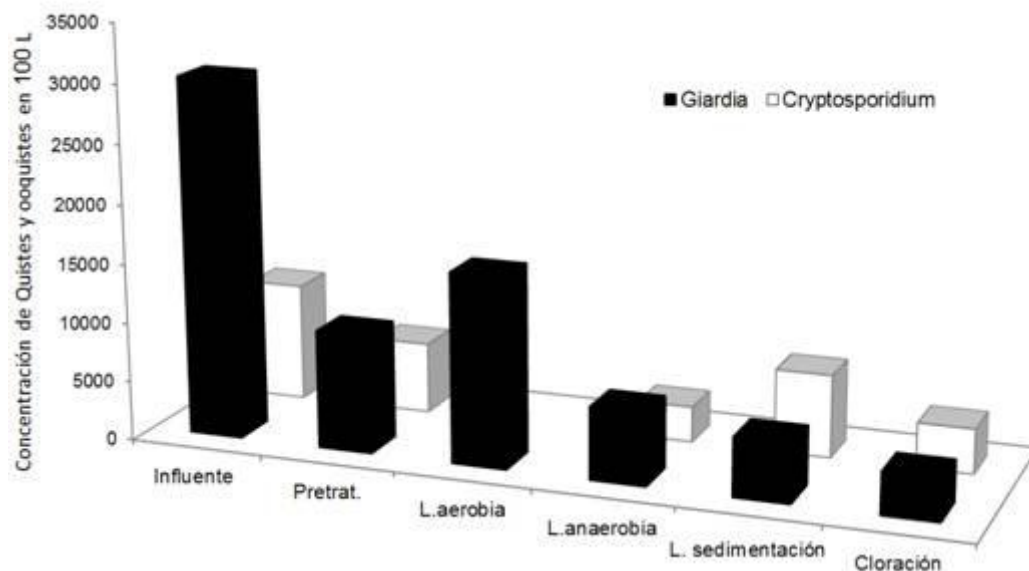
El porcentaje de remoción total de quistes y ooquistes desde el influente a los efluentes fue de 76.87% (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de remoción desde el influente al efluente en cada uno de los meses de muestreo.

	Porcentajes de Remoción del influente- efluente							
	Ago.	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Jun.
Quistes de <i>G. lamblia</i>	73	70	86	81	89	59	78	82
Ooquistes de <i>C. parvum</i>	33	88	95	94	92	96	67	47

Se encontraron en promedio 36 quistes/L y 38 ooquistes/L viables en los efluentes de la planta de tratamiento (Figura 1). Para ambos parásitos el proceso de tratamiento y los meses tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las concentraciones a un nivel de confianza del 95%. Según las pruebas de rangos múltiples tanto para los quistes de *G. lamblia* como para los ooquistes de *C. parvum* encontrados existe una diferencia de concentración significativa ($p < 0.05$) entre el influente y los procesos de tratamiento de la PTAR sur de Cd. Obregón.

Figura 1. Concentraciones de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* viables por cada 100 L de agua.



Discusión

Este estudio estima la concentración y la viabilidad de quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum*. El número de quistes de *G. lamblia* es superior a los ooquistes de *C. parvum* a una proporción 3:1. Se encontraron quistes de *G. lamblia* en el 100% de las muestras y de *C. parvum* en el 82%. Datos similares se registraron en muestras de agua superficial en Sinaloa, México donde se obtuvo que los quistes de *G. lamblia* estuvieron presentes en 25/50 de las muestras (50%), mientras que los ooquistes de *C. parvum* en 21/50 muestras (42%) (20). Este resultado también es comparable al encontrado en cuatro plantas de tratamiento en Italia donde los quistes de *G. lamblia* fueron ubicuos, mientras que los ooquistes de *C. parvum* se encontraron menos extendidos (21). Estos patógenos están presentes en las aguas residuales tratadas de Ciudad Obregón Sonora, durante los

meses del año incluidos en el muestreo demostrando la resistencia de estos parásitos a los agentes medioambientales. En otras investigaciones como la cuantificación de los quistes de *G. lamblia* y *C. parvum* en el agua superficial del Valle de Culiacán, se encontraron que en canales de aguas agrícolas el 100% de las muestras reportaron quistes y ooquistes (22). En esta investigación se encontró que las concentraciones de quistes y ooquistes de los parásitos son más altas en otoño que en otras estaciones con una significancia de ($p < 0,05$). En otoño las temperaturas en la región oscilan en un rango de 9 a 23 °C. La sobrevivencia de los quistes en el medio ambiente depende de la temperatura. A 10 °C pueden sobrevivir 77 días, a 20 °C reduce la viabilidad hasta 3 días (23). Un patrón estacional similar fue reportado en el norte de España, donde las muestras positivas de *Cryptosporidium* fueron más frecuentes durante el otoño (10 a 17 °C) (24). Otra explicación es que el proceso anaeróbico es extremadamente dependiente de la temperatura, por debajo de 17 °C es prácticamente nulo, pero por encima de 22 °C, la eliminación de patógenos es muy rápida (25), por lo que se atribuye mayor eliminación en temporadas donde la temperatura ambiental es mayor. Las concentraciones de *C. parvum* se pueden comparar con los datos obtenidos en California EE.UU. en dos de las siete muestras tomadas de cinco efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas residuales se obtuvieron un rango de 20,300 a 30,800 ooquistes /100 L (26). En cuatro plantas de tratamiento secundario en Suecia, se encontró que los quistes de *G. lamblia* estuvieron presentes en cada muestra tomada en el influente en concentraciones de 1,000 a 100,000 quistes /L, (27), mientras que los ooquistes de *C. parvum* estuvieron presentes en 5 de 19 muestras a un promedio de 2.000 ooquistes /100 L. Las remociones de los parásitos mostradas en la tabla 2 en la PTAR sur muestran que la planta funciona a porcentajes de remoción dentro del rango de los sistemas convencionales de tratamiento donde la remoción de quistes y ooquistes es del 25% al 86% (28). En la PTAR sur de Ciudad Obregón, en la laguna aerobia, el agua permanece un día, en la laguna facultativa medio día y en la laguna de sedimentación otro día, dando un período de retención acumulado de 60 horas. Es posible que los períodos de retención no sean suficientes para la completa eliminación de quistes y ooquistes en investigaciones anteriores se informó de que en dos sistemas de lagunas de estabilización con períodos de retención acumulada de 25,3 días y 40 días de la remoción de quistes estaban entre 99,1 y 99,7% respectivamente (29). Otras investigaciones han reportado que para los ooquistes de *C. parvum* se indican porcentajes de remoción entre el influente y efluente de 90,06% (30), y para los quistes de *G. lamblia* del 92,25% (31). Estos porcentajes son más altos que el promedio obtenido en esta investigación. En plantas de tratamiento terciario se han presentado datos que indican que el número de quistes de *G. lamblia* viables representa una proporción relativamente pequeña del total de los quistes detectados por el procedimiento de inmunofluorescencia (32). Sin embargo teniendo en cuenta que tanto *G. lamblia* como para *C. parvum* la dosis infecciosa mínima es muy baja, el porcentaje de quistes y ooquistes viables resultantes es suficiente para sospechar un riesgo de salud. En la investigación de sobrevivencia de los ooquistes de *C. parvum* y los quistes de *G. lamblia* durante el invierno en el río Oslo, se encontró que los ooquistes permanecen viables hasta 144 días y los quistes hasta 39 días (33), Los ooquistes son más resistentes que los quistes. Se observó una disminución de la concentración y la viabilidad tanto para los quistes como para los ooquistes después de la etapa de pretratamiento mecánico, sin embargo, en el próximo paso aumenta de nuevo (figura 1). La adsorción de los ooquistes y quistes en los sólidos sedimentables es el mecanismo de remoción más importante de estos protozoos en los sistemas de tratamiento (34). En los resultados en esta investigación los quistes y ooquistes viables en el agua tratada son aproximados a las dosis infecciosas mínimas. En una investigación anterior en Ciudad Obregón, Sonora, de 32 muestras de agua potable analizadas se encontraron ooquistes de *C. parvum* en 69%. El 15,62% de las muestras tenían 10 o más ooquistes viables (35). Los ooquistes de *Cryptosporidium* tienen una resistencia suficiente a desinfectantes como el cloro y puede sobrevivir en el tratamiento del agua y muchos sistemas de distribución (36), las presiones ambientales afectan la degradación, muerte e infectividad de los quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum*. En conclusión las etapas del proceso de tratamiento de la PTAR de Ciudad Obregón, Sonora afectan de forma significativa ($p < 0,05$) tanto en la incidencia y viabilidad a los quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes *Cryptosporidium parvum*. En los meses otoñales estos patógenos aumentan en número. La concentración total de los quistes de *Giardia lamblia* se encuentran en una proporción 3:1 con los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en cada una de las etapas de la PTAR sur de Ciudad Obregón, Sonora. Los quistes de *Giardia lamblia* se encuentran viables en un 39% después de que el proceso de tratamiento y los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en el 71%. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son más resistentes al proceso de tratamiento. En los diferentes meses de muestreo la incidencia de los quistes de *Giardia lamblia* se ve afectada de manera significativa ($p < 0,05$).

Agradecimientos

Damos las gracias a Célida Martínez y el personal del laboratorio de Microbiología del CIAD por su ayuda en el análisis de viabilidad de las muestras.

Resumen

Los quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* causan enfermedades intestinales en animales y seres humanos a través del consumo de agua y alimentos contaminados. Los quistes y ooquistes son resistentes a los sistemas de cloración convencional. La dosis infecciosa mínima es de aproximadamente 10 quistes/ooquistes ingeridos. Para la cuantificación de los quistes y ooquistes se utilizó el método ICR. La determinación de la viabilidad se realizó mediante tinción vital y contraste de fases. Después del proceso de tratamiento en la PTAR los quistes de *Giardia lamblia* se encuentran viables en un 39% y los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en el 71%. La concentración de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* aumenta en otoño. Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$), en la incidencia de quistes de *Giardia lamblia* durante la investigación.

Palabras clave: Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, agua, alimentos, contaminación

Abstract

Giardia lamblia cysts and *Cryptosporidium parvum* oocyst come to cause intestinal diseases through the consumption of contaminated food and water by humans and animals. Cysts and oocysts are resistant to normal chlorination systems. The minimum infectious doses are approximately 10 cysts / oocysts ingested. The ICR method was used for quantification of cysts and oocysts. The determination of viability was performed by vital staining. *Giardia lamblia* cysts were found in greater numbers than *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Giardia lamblia* cysts were viable at 39% after the treatment process and *Cryptosporidium parvum* oocysts at 71%. The incidence of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* is higher in autumn. During the investigation the *Giardia lamblia* cysts incidence were significantly affected ($p < 0.05$).

Key words: Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, water, food, pollution

Referencias

1. Olson M. 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Emerging zoonoses. *Veterinary* 33(6): 24-27
2. Mahin T. and O. Pancormo. 1999. Waterborne Pathogens. *Water Environ. Technol.* 11 (4):51-55.
3. Park C. and P. Huck. 2003. A Conceptual Model for *Cryptosporidium* Transport in Watersheds. *Water Qual. Res.* 38(1): 77-113
4. Ochiai Y., C. Takada and M. Hosaka. 2005 Detection and Discrimination of *C. parvum* and *C. hominis* in Water Samples by Immunomagnetic Separation-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2):898-903.
5. Caccio S., M. Giacomo, F. Aulicino and E. Pozio. 2003. *Giardia* Cysts in Wastewater Treatment Plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6): 3393-3398
6. Mahin T. and O. Pancormo., *Op.cit.*
7. Ochiai Y., *et al, Op. Cit.*
8. Soto B. M., C. Chaidez, P. Gortáres, W. Rubio, C. Martínez, P. Meza y N. Castro. 2004. Incidencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en Agua de Irrigación del Valle de Culiacán, Sinaloa.. Memoria en extenso. Trabajo No. 13. XIV Congreso Nacional. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.
9. Shaber N.A., T.R. Slifko and M. Wanielista. 2008. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and Metals in Florida Stormwater Ponds and Assessment as Alternative Water Supplies for Irrigation. <http://www.stormwater.ucf.edu/conferences/9thstormwatercd/documents/OccurrenceofCrypto.pdf>
10. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. (Publicada en el D.O.F. de fecha 21 de septiembre de 1998)

11. Waterborne™, Inc. 2007. A100FLK. Aqua-Glo G/C Direct Comprehensive Kit Fluorescein-labeled Monoclonal Antibody Reagent for Simultaneous Direct Immunofluorescence Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples *Aqua-Glo G/C is EPA - approved for use in Methods 1622 and 1623.* (Ver:<http://www.waterborneinc.com/documents/A100FLK.pdf>)
12. García A., W. Yanko, G. Batzer and G. Widmer. 2002 *Giardia* Cysts in Tertiary- Treated Wastewater Effluents: Are They Infective? *Water Environ Res.* 74(6):541-544.
13. *Idem.*
14. Díaz M., E. Leyva, V. Mata y H. González. 2003. Incidencia y Viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de Cd. Obregón, Sonora, México. *Int. Contam. Ambient.* 19 (2): 67-72
15. OOMAPASC. 2003. Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales.
16. EPA. 1996. ICR Microbial Laboratory Manual. ICR Protozoan method for detecting *Giardia* cyst and oocyst. <http://www.epa.gov/nerlcwww/icrmicro.pdf>
17. Waterborne™, Inc. *Op.cit.*
18. EPA. 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. (Ver: <http://www.epa.gov/nerlcwww/1623de05.pdf>).
19. EPA. 1996. *Op. Cit.*
20. Chaidez C. 2004. Incidencia de protozoarios en agua de uso agrícola y su relación con la presencia de *Clostridium perfringens*. <http://www.ciad.edu.mx/salima/display1.asp?func=display&resid=289&tree=565>
21. Caccio S., *et al, Op cit.*
22. Soto B. M., *et al, Op cit.*
23. Solarte Y., M. Peña y C. Madera. 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb. Méd.* 37 (1): 74-82.
24. Carmena D., X. Aguinagalde, C. Zigorraga, J.C Fernández-Crespo and A. Ocio . 2006. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Appl. Microbiol.* 102(3): 619-629.
25. Piédrola G. 2000. Medicina preventiva y salud pública. En: Aguas residuales. Editorial Mason S.A. Barcelona, España. pp. 327
26. Tsuchihashi R., J. Loge and L. Darby. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* in Secondary Effluents Using a Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction Assay. *Water Environ Res.* 75 (4): 292-299
27. Ottoson J., A. Hansen, T. Westrell, K. Johansen, H. Norder and A. Stenström . 2006. Removal of Noro and Enteroviruses, *Giardia* Cysts, *Cryptosporidium* Oocysts and Fecal Indicators at four Secondary Wastewater Treatment Plants in Sweden. *Water Environ. Res.* 8: 828-34
28. Solarte Y., *et al, Op. cit.*
29. Grimason, A. M., H. V Smith, J. F. W Parker, Z Bukhari, A. T.; Campbell and L. J. Robertson, 1994. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium spp* oocysts in water samples. *Water Res.* 28(3): 733-736.

30. Alarcón M.A., Beltrán M., Cárdenas M.L., Campos M.C. 2005. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardiaspp.* y aguas potables y residuales en la cuenca alta del Río Bogotá. *Biomédica*. 25(3): 353-65

31. Botero L., I. Arnedo, M. Bracho y O. Díaz 2006. Determinación de la presencia de parásitos y bacteriófagos en un sistema de tratamiento de aguas residuales (Ver:http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/uruguay30/VE04179_Botero.pdf)

32. García A., *et al*, *Op. Cit*

33. Robertson L.J. and B.K. Gjerde 2006. Fate of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in the Norwegian Aquatic Environment over winter. *Microbial Ecol.* 52: 597–602.

34. Solarte Y., *et al*, *Op. cit.*

35. Díaz M., *et al*, *Op.cit.*

36. Ochiai Y., *et al*, *Op. Cit.*