

Evaluation of waste stabilization ponds for the reduction of *Giardia* cysts

Walter Quintero Betancourt, Cleomary Oliveros Oliveros,
Zorayda Medina de Salcedo and Ligia Botero de Ledesma

Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Apartado Postal 526
Telefax: 58-61-428184. email: lbotero@luz.ve

Abstract

Giardia cyst concentration was studied at the different lagoons of a system located at the Center for Water Research at La Universidad del Zulia. The calcium carbonate flocculation protocol was applied together with an immunofluorescent analysis procedure for recovery and detection of cysts, respectively. Samples were taken at the following sites: raw sewage (Site 1), facultative pond effluent (Site 2), maturation pond effluent (Site 3) and polishing pond effluent (Site 4). The following mean values of cysts and percentage of positive samples were obtained: Site 1: 561 (100%), Site 2: 72 (100%), Site 3: 16 (80%) and Site 4: 5 (60%). The results obtained during this investigation indicate that even though *Giardia* cysts were removed, there are still values four times higher than those reported in the United States for well established waste stabilization pond systems whose effluents are used for irrigation.

Key words: *Giardia* cysts, stabilization ponds, domestic wastewater, reuse.

Evaluación del uso de lagunas de estabilización para la remoción de quistes de *Giardia*

Resumen

La concentración de quistes de *Giardia* fue estudiada en un sistema de lagunas de estabilización del Centro de Investigaciones del Agua de La Universidad del Zulia. El método de floculación con carbonato de calcio y el procedimiento de detección con anticuerpos fluorescentes fueron aplicados en esta investigación para la recuperación y cuantificación de los quistes. Las muestras fueron captadas en los siguientes sitios: agua cruda (Sitio 1), efluente de la laguna facultativa (Sitio 2), efluente de la laguna de maduración (Sitio 3) y efluente de la laguna de pulimento (Sitio 4). Los siguientes valores promedios de quistes y porcentajes de muestras positivas fueron obtenidos: Sitio 1: 561 (100%), Sitio 2: 72 (100%), Sitio 3: 16 (80%) y Sitio 4: 5 (60%). Los resultados obtenidos en esta investigación indican que si bien hay remoción de quistes de *Giardia* en el sistema, su concentración en el efluente está cuatro veces por encima de lo permitido en la normativa de los Estados Unidos de América donde esta bien implementado el tratamiento de aguas de desecho con lagunas de estabilización y su reutilización en la irrigación

Palabras clave: Quistes de *Giardia*, lagunas de estabilización, aguas de desecho, reutilización.

Introducción

El tratamiento de aguas de desecho doméstico a través de sistemas de lagunas de estabilización es particularmente adecuado para las regio-

nes de clima cálido de países en desarrollo debido a los bajos costos implicados en su construcción, operación y mantenimiento [1, 2, 3]. Este tratamiento, contribuye a disminuir las descargas contaminantes a los cuerpos de agua que luego

puedan ser empleados para usos recreativos, permitiendo que los efluentes de estos sistemas de tratamiento sean reutilizados en la irrigación [1, 3, 4-7]. Sin embargo, la reutilización incontrolada de aguas de desecho en la agricultura, puede generar riesgos a la salud pública debido a la presencia de microorganismos patógenos intestinales que aparecen asociados con las excretas humanas [3, 4, 6, 8, 9].

Giardia es el parásito protozoario entérico más frecuentemente encontrado en las heces de los individuos de las comunidades urbanas y suburbanas de la ciudad de Maracaibo, con prevalencias que oscilan entre 15% y 43% [10, 11]. Asimismo, estudios previos llevados a cabo en el sistema de lagunas de estabilización de La Universidad del Zulia han demostrado que el protozoario *Giardia* es el parásito más comúnmente encontrado en las aguas crudas que entran al sistema [12]. Este protozoario infecta el intestino delgado del hombre y los animales domésticos produciendo la enfermedad gastrointestinal denominada giardiasis [13]. El riesgo principal de contraer la giardiasis esta influenciado por los niveles de quistes presentes en las aguas de desecho y la inactivación de estos a través de los sistemas de tratamiento [1, 4, 9, 13, 15, 16]. Este último aspecto es muy importante, ya que entre uno y diez quistes ingeridos pueden iniciar la infección [13]. Además, el estadio de quiste le confiere al protozoario *Giardia* mayor supervivencia en las aguas de desecho y mayor capacidad de flotación, lo cual dificulta la remoción eficiente de este patógeno por los procesos de tratamiento que dependen de la sedimentación [17].

La disminución de la presencia de quistes de protozoarios en el sistema de lagunas de estabilización del Centro de Investigaciones del Agua

(CIA) de La Universidad del Zulia (LUZ), no había sido anteriormente estudiada. Este sistema de lagunas fue diseñado para llevar a cabo proyectos de investigación con miras a optimizar el proceso de depuración de las aguas de desecho para ser reutilizadas en la irrigación [18].

Los objetivos principales de esta investigación fueron:

1. Estandarizar una técnica sencilla, eficiente y sensible para el estudio de protozoarios entéricos en aguas que van a ser reutilizadas,
2. Determinar la presencia y remoción de quistes de *Giardia* en un sistema de lagunas de estabilización.

Materiales y Métodos

Sitio de muestreo

El estudio se llevo a cabo en el sistema piloto de lagunas de estabilización del Centro de Investigaciones del Agua de La Universidad del Zulia el cual esta ubicado al Norte de la ciudad Universitaria de LUZ. Este sistema consta de nueve lagunas colocadas en serie y en paralelo con una secuencia de tres facultativas y seis de maduración distribuidas en tres sistemas denominados A, B y C [18]. El sistema A, en el cual se llevó a cabo la investigación consta de tres lagunas: facultativa (primaria), maduración (secundaria) y pulimento (terciaria). Los tiempos de retención de diseño fueron de 10 días para la laguna facultativa, 5 días para la de maduración y 5 días para la de pulimento. Una representación esquemática del sistema de lagunas y los sitios de muestreo se describen en la Figura 1.

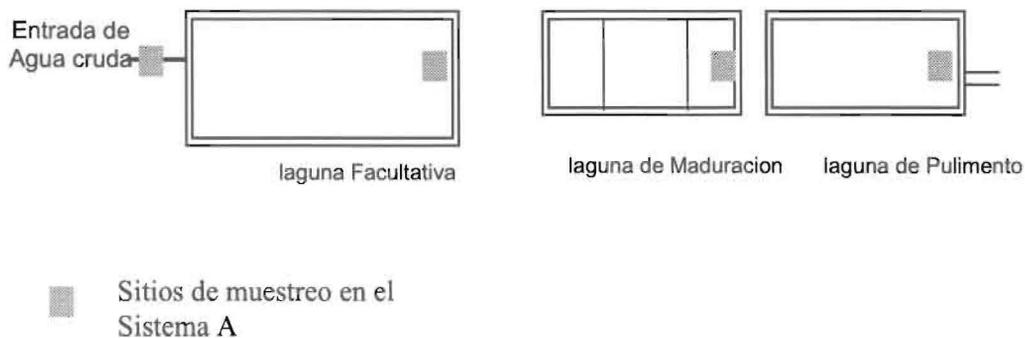


Figura 1. Representación esquemática de las lagunas de estabilización del Sistema A.

Pruebas de eficiencia

En la etapa inicial del estudio se procesaron muestras de agua captadas a la entrada del sistema las cuales fueron esterilizadas y sembradas con una concentración de 8×10^4 quistes de *Giardia* para determinar la eficiencia de recuperación del método de floculación a ser empleado en este estudio.

Procesamiento de las muestras

Se captaron muestras de agua de cuatro litros en recipientes de vidrio desinfectados. Estas muestras, al igual que los controles sembrados para determinar la eficiencia de recuperación, fueron procesados siguiendo el método de floculación con carbonato de calcio descrito por Vesey *et al* [19]. El paso final de concentración se realizó mediante tres centrifugaciones a $1500 \times g$ por 10 minutos y el sedimento resultante se preservó en solución de formaldehído al 10%, a 4°C . Alicuotas de 5 mL de este sedimento se sometieron a flotación en solución de sacarosa (G.E. 1,15), recuperando el sobrenadante, el cual se lavó mediante centrifugación ($1500 \times g$ 10 minutos) para eliminar el exceso de sacarosa.

Visualización y enumeración de los quistes de *Giardia*

La visualización y enumeración de los quistes de *Giardia* se llevó a cabo mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta [20] empleando un adaptador UV con fibra óptica para microscopía de epifluorescencia (QBC Paralens, Becton Dickinson), siguiendo los procedimientos y criterios de identificación descritos por Rose *et al*. [20]. Se utilizó un anticuerpo monoclonal primario an-

ti-*Giardia* (HYDROFLUOR™-Combo, ENSYS, Inc) y un anticuerpo policlonal secundario IgA, IgG, IgM marcado con isotiocianato de fluoresceína (Kirkegard & Perry Laboratories, Inc). Para la tinción, las muestras concentradas y flotadas en volúmenes entre 2,5 mL y 5 mL se filtraron a través de membranas de nitrato de celulosa (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA) de 13 mm de diámetro y $5 \mu\text{m}$ del tamaño del poro contenidas en portafiltras de policarbonato (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA). La superficie de cada membrana fue observada a una magnificación de 600 X ubicando aquellas estructuras de forma oval de color verde manzana brillante, características de los quistes de *Giardia*, luego de la observación de controles positivos. Estos últimos fueron procesados junto con controles negativos durante los ensayos de detección para determinar en cada caso el buen funcionamiento de los anticuerpos y la esterilidad de los materiales y soluciones utilizadas.

Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en los experimentos de eficiencia de recuperación de quistes de *Giardia* en muestras sembradas.

La Tabla 2 muestra los porcentajes de muestras positivas, la concentración de quistes de *Giardia* detectados en los diferentes sitios de muestreo y sus porcentajes de reducción. En las aguas crudas y en la laguna facultativa todas las muestras procesadas fueron positivas (100%). En los efluentes de las lagunas de maduración y de pulimento los porcentajes de positividad fueron de 80% y 60% respectivamente.

Tabla 1
Experimentos de recuperación de quistes de *Giardia* en muestras sembradas

Experimento	Nº de quistes recuperados	Flotación	Porcentaje de recuperación
1	7.5×10^4	No	87
2	5.3×10^4	No	63
3	6.0×10^4	No	70
4	4.1×10^4	Si	49
5	4.3×10^4	Si	50

*Concentración de quistes sembrados 8×10^4 .

Tabla 2
Concentración de quistes de *Giardia* y su reducción en los diferentes sitios de muestreo

Número de muestra	Sitios de Muestreo			
	Agua cruda	Efluente: laguna facultativa	Efluente: laguna de maduración	Efluente: laguna de pulimento
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	ND
6	+	+	ND	ND
7	+	NR	NR	NR
8	+	NR	NR	NR
% de detección	100%	100%	80%	60%
Promedio de concentración de quistes	(97 a 1060) 561	(60 a 180) 72	(<1 a 57) 16	(<1 a 15) 5
% de reducción	NA	87%	96%	99.8%

ND: no detectable. NA: no aplicable. NR: no realizado.

Como puede observarse en la Tabla 2, la concentración de quistes de *Giardia* y los porcentajes de muestras positivas en cada sitio disminuyeron a través de las unidades del sistema de tratamiento conformado por las tres lagunas (facultativa, maduración y pulimento). Esta tendencia se mantuvo durante todos los muestreos. Los porcentajes de muestras positivas siempre fueron más altos, como se esperaba, en los sitios de muestreo al inicio del sistema, es decir en las aguas crudas que entran a las lagunas y en la laguna facultativa. En las aguas crudas la concentración de quistes detectados osciló entre 1060 y 97 con un promedio de 561, mientras que en el efluente de la laguna facultativa la concentración de quistes detectados estuvo entre 180 y 60 con un promedio de 72. En el efluente de la laguna de maduración y en el de la laguna de pulimento, la concentración de quistes osciló entre 57 y <1 y 15 y <1, con valores promedios de 16 y 5, respectivamente.

Discusión de Resultados

Los resultados de las pruebas de eficiencia en las cuales no se utilizó el procedimiento de flo-

tación (Tabla 1) son similares a los reportados por Vesey *et al.* [19] y Shepherd y Wyn-Jones [21], quienes a partir de diferentes muestras de agua sembradas y procesadas utilizando el método de floculación con carbonato de calcio obtuvieron porcentajes promedios de recuperación que oscilaron entre 72% y 73.6% para quistes de *Giardia* [19] y entre 69% y 79% para ooquistes de *Cryptosporidium* [21]. Esto demuestra que con el método de floculación se pueden recuperar eficientemente, tanto quistes de *Giardia* como ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras ambientales. Esto es importante ya que se ha normalizado una técnica que es eficiente, sencilla (ya que emplea equipo básico) y relativamente económica para la recuperación de quistes de protozoarios en aguas, lo cual la hace aplicable para un programa de muestreo a gran escala de protozoarios entéricos en aguas.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta investigación, el paso de flotación puede ser responsable de la pérdida de quistes. Cuando la muestra no fue flotada, el porcentaje de recuperación estuvo entre 63% y 87% y se redujo en un 49%-50% cuando se empleó este paso (Tabla 1). Sin embargo, la flotación es necesaria para elimi-

nar las interferencias que afectan la visualización, ocasionadas por los materiales orgánicos presentes en las muestras ambientales [20, 22, 23]. Es necesario trabajar más en este sentido, con el fin de mejorar la técnica y evitar la pérdida de quistes que se presenta durante este paso.

La técnica de inmunofluorescencia empleada en este trabajo para la cuantificación de los quistes de *Giardia* permitió detectar concentraciones que son imposibles de observar cuando se emplean otras técnicas. Esto es debido, como se ha podido demostrar [20], a que los anticuerpos fluorescentes dirigidos contra los antígenos de superficie específicos de cada protozooario, permiten diferenciarlos de otros microorganismos presentes en las muestras ambientales haciendo más sensible el procedimiento de detección.

La presencia constante de quistes de *Giardia* en las aguas negras que entran al sistema de lagunas ha sido anteriormente reportado por otros estudios [12]. Estos resultados permiten corroborar lo reportado por otros investigadores quienes señalan que los procesos de tratamiento primario remueven una pequeña proporción de quistes de protozoarios, debido principalmente a la baja velocidad de sedimentación de estas estructuras parasitarias ($< 0,1 \text{ m h}^{-1}$) que está muy relacionada con su tamaño pequeño y su baja densidad [17].

En relación con la disminución de los quistes de *Giardia* se obtuvo un porcentaje promedio de reducción de 99,8%. De acuerdo con estos resultados, el tiempo de retención total de 20 días en el sistema de lagunas (tiempo de retención de diseño), no es suficiente para la remoción de todos los microorganismos patógenos que están presentes en el agua cruda. Sin embargo, estos datos deberán ser evaluados en un futuro tomando en cuenta el tiempo de retención real del sistema, ya que para el momento del muestreo no se habían realizado los estudios que permitieran conocerlos. Es claro que hay reducción del número de quistes y la presencia de estos en los efluentes finales merece especial atención, sobre todo cuando se trata de aguas que van a ser reutilizadas en la irrigación.

En el estado de Arizona en Estados Unidos y en otros Estados de ese país se ha establecido como normativa la presencia de < 1 quiste de

Giardia por 40 litros de muestra para las aguas de desecho tratadas que van a ser utilizadas en la irrigación no restringida [14, 15]. Esto es debido a que se ha podido demostrar que los parámetros bacteriológicos empleados para evaluar la calidad de estas aguas, no son buenos indicadores de la remoción de parásitos, además de que los efluentes de los sistemas de tratamiento de aguas de desecho con lagunas de estabilización, han resultado ser poco eficientes en la remoción de todos los microorganismos patógenos [8, 14, 15, 17]. Si se toma en cuenta la presencia de un promedio de 5,0 quistes de *Giardia* por 4 L de muestra procesados, que se obtuvo en esta investigación, se observa que este valor está ubicado cuatro veces por encima del valor permitido por ellos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no contempla en las guías de calidad microbiológica para la reutilización de aguas de desecho en la irrigación no restringida, el estudio de protozoarios intestinales, pero sí establece la presencia de ≤ 1 huevo de nemátodo intestinal por 100 mililitros de muestra [4]. La supervivencia de quistes de protozoarios en el ambiente, en comparación con la de los huevos de helmintos, es relativamente más corta y ambos presentan dosis infecciosas más bajas que las de las bacterias coliformes y son más resistentes que éstas a los procesos de tratamiento de aguas. Esto último señala el potencial que pueden tener los parásitos para transmitir enfermedades a través de las aguas de desecho reutilizadas en la irrigación [4, 5, 21].

Estudios realizados en otros sistemas de tratamiento diferentes a los sistemas de lagunas han demostrado que los huevos de nemátodos intestinales no son indicadores confiables de la remoción de quistes de protozoarios de las aguas de desecho [24], lo cual estaría indicando la necesidad de realizar estudios sobre detección de quistes de *Giardia*. La OMS también recomienda que cada país adapte su propia normativa de acuerdo con los factores ambientales, socioculturales y epidemiológicos de sus comunidades [4]. Por esto este trabajo sobre evaluación de la presencia y concentración de quistes de *Giardia* en un sistema de lagunas de estabilización es importante, ya que permitió obtener información sobre la eficiencia de remoción de este patógeno

intestinal en los sistemas de tratamiento de aguas de desecho locales, y que, como se mencionó anteriormente, este protozoario es muy frecuente en nuestras comunidades. Es también importante mencionar que el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS) en Lima, Perú ha llevado a cabo estudios sobre los riesgos de reutilización de aguas de desecho en la agricultura y recomienda profundizar las investigaciones sobre la presencia de quistes de *Giardia* y *Entamoeba* en las aguas de desecho reutilizadas, sobre todo en países donde las protozoosis intestinales son endémicas [25].

La información obtenida en esta investigación puede ser usada para decidir si es necesario implementar tratamientos alternativos o más extensos para obtener efluentes de mejor calidad para la irrigación y la descarga a los cuerpos de agua naturales, y aporta datos valiosos para establecer guías y normas para la reutilización de aguas negras. Adicionalmente, sería muy útil evaluar la viabilidad y virulencia de los quistes de *Giardia* presentes en el efluente, cuya significancia es crítica para determinar su patogenicidad y el nivel apropiado de tratamiento.

Conclusiones

Los resultados de esta investigación permitieron demostrar la utilidad de las técnicas empleadas para la cuantificación del protozoario *Giardia* en las aguas de desecho.

Las concentraciones de quistes de *Giardia* presentes en el efluente del sistema A de lagunas de estabilización, son cuatro veces mayores que las reportadas en países donde se aplican normas de calidad parasitológica del agua que va ser reutilizada.

El sistema de lagunas de estabilización permitió remover quistes de *Giardia* en un 99,8%. Sin embargo, los quistes de *Giardia* pudieron ser detectados en los efluentes de este sistema. Esto puede representar problemas de salud pública tomando en cuenta las bajas dosis infecciosas que son requeridas para producir enfermedades gastrointestinales.

Debido a la importancia que representa en la actualidad la reutilización de aguas de desecho, es necesario implementar tratamientos adi-

cionales que aseguren la remoción eficiente de todos los microorganismos patógenos.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigaciones del Agua de la Facultad de Ingeniería de La Universidad del Zulia por facilitar sus instalaciones para la realización de los muestreos. Igualmente agradecemos a la Fundación Polar y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Bartone, C y Arlosoroff, S.: 1987.: "Irrigation reuse of pond effluents in developing countries". Wat. Sci. Tech. Vol.19, (1987) 287-289.
2. Sáenz, R.: "Lagunas de estabilización en el trópico: Promoción del reuso sanitario de las aguas". Bol. of Sanit. Panam. Vol. 116, (1994) 189-197.
3. Shuval, H., Yekutieli P. and Fattal B.: "An epidemiological model of the potential health risk associated with various pathogens in wastewater irrigation". Wat. Sci. Tech. Vol 18, (1986) 191-198.
4. Hespanhol I. and Prost M.: "WHO guidelines and National Standards for reuse and water quality". Wat. Res. Vol 28, (1994) 119-124.
5. Shelef, G., Guanico M. y Kinski M.: "Reuse of stabilization pond effluents for agricultural irrigation in Israel". Wat. Sci. Tech. Vol 19, (1987) 209-305.
6. Shuval, H.: "The development of health guidelines for wastewater reclamation". Wat. Sci. Tech. Vol 24, (1991) 149-155.
7. Smith, R. and Walker M.: "Water reclamation and reuse". Research Journal Wat. Poll. Cont. Fed., Vol. 63, (1991) 428-431.
8. Monte, H. and Sousa M.: "Effects on crops of irrigation with facultative pond effluent". Wat. Sci. Tech. Vol. 26, (1992) 1603-1607.
9. Rose, J.: Microbial aspects of wastewater reuse for irrigation. CRC. Critical Reviews in

- Environmental Control. Vol. 16, (1985) 231-256.
10. Chacín-Bonilla, L., Mejía M., Cano G., Guanipa N., Esteves J. y Bonilla E.: "*Cryptosporidium* infection in a suburban community in Maracaibo, Venezuela". Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 49, (1993) 63-67.
 11. Chourio-Lozano, G., Rincón W., Castellano M., Luzardo T. y Meleán C.: "Prevalencia parasitaria en una comunidad suburbana del Distrito Maracaibo, Estado Zulia". Kasmera. Vol. 16, (1988) 30-50.
 12. Botero, L., Quintero W., Medina Z. y Oliveros C.: "Quistes de *Giardia* en aguas negras" Kasmera. Vol 24, (1996) 83-91.
 13. Thompson, R., Reynoldson J. y Mendis H.: "*Giardia* and Giardiasis". Adv. Parasitol. Vol. 32, (1993) 72-133.
 14. Naranjo, J., DeLeon R., Gerba Ch. y Rose J.: "Monitoring for viruses and parasites in reclaimed water". The Bench Sheet Vol. 11, (1989) 8-11.
 15. Rose, J. and Gerba Ch.: "Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida, USA". Wat. Sci. Tech. Vol. 23, (1991) 2091-2098.
 16. Sykora, J., Sober Ch., Jakubowski W., Casson L., Gavaghan P., Shapiro M. y Schott J.: "Distribution of *Giardia* cysts in wastewater". Wat. Sci. Tech. Vol. 24, (1991) 187-192.
 17. Pacniker, P. and Krishnamoorthi K.: "Parasite egg and cyst reduction in oxidation ditches and aerated lagoons". Process Research Journal Wat. Poll. Cont. Fed. Vol. 53, (1981) 1413-1419.
 18. Bracho, A.: "Diseño de lagunas piloto de estabilización para el tratamiento de aguas servidas y su utilización con fines de riego". Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Tesis de Grado. 1986.
 19. Vesey, G., Slade J., Byrne M., Shepherd K. and Fricker C.: "A new method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water". J. Appl. Bacteriol. Vol. 75, (1993) 82-85.
 20. Rose, J., Landeen L., Riley K. and Gerba Ch.: "Evaluation of immunofluorescence technique for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts from environmental samples". Appl. Environ. Microbiol Vol 61, (1989) 1714-1719.
 21. Shepherd, K and Wyn-Jones A.: "An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water". Appl. Environ. Microbiol. Vol 62, (1996) 1317-1352.
 22. LEChevalier, M., Thomas M., Burns M. y Lee R.: "Comparison of the Zinc Sulfate and Immunofluorescence techniques for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium*". Journal Am. Wat. Works. Assoc. (1990) 75-82.
 23. LEChevalier, M., Norton W., Siegel J. and Abbaszadegan M.: "Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61, (1995) 690-697.
 24. Gambrill, M., Mara D. and Silva S.: "Physicochemical treatment of tropical wastewaters: production of microbiologically safe effluents for unrestricted crop irrigation". Wat. Sci. Tech. Vol. 26, (1992) 1449-1458.
 25. Arauzo, M.: Evaluación de riesgos para la salud por el uso de aguas residuales en Agricultura. Metodología para el Análisis microbiológico de aguas residuales y productos agrícolas. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria, (1993).

Recibido el 6 de Octubre de 1997
En forma revisada el 23 de Enero de 1998