

Ensayos para la detección y cuantificación de quistes de *Giardia* sp. en aguas residuales en Maracaibo, Venezuela

*Silvana Pertuz**, *Nairoby Jiménez**, *Ismenia Araujo*, *Jenny de La Rotta*,
Lenín Herrera, *Patricia Molleda* y *Gladys Toro*

Laboratorio de Investigación Biotecnológica sobre Microbiología del Petróleo
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado postal 526
Maracaibo, Venezuela

Recibido: 18-07-97 Aceptado: 30-09-98

Resumen

Estudios previos muestran que la floculación presenta altos porcentajes de recuperación de quistes de *Giardia* sp. desde aguas residuales. El objetivo de esta investigación fue detectar y cuantificar quistes de *Giardia* sp. en aguas residuales. Las muestras de aguas residuales fueron floculadas, según la técnica de Ho y col. (1995). El "pellet" fue clarificado con sulfato de cinc, sacarosa o formol etil-acetato/sacarosa. Los quistes recuperados fueron identificados y cuantificados sobre membrana según Spaulding y col. (1983). La detección y cuantificación de *Giardia* sp. fue posible por la técnica de floculación y clarificación por formol-etil acetato/sacarosa y microscopía sobre membrana, en un porcentaje de recuperación del 57,13% y un rango de 1.5×10^4 y $8,2 \times 10^4$ quistes/L. Las otras dos técnicas de clarificación probadas fueron menos eficientes con porcentajes de recuperación por debajo del 50%.

Palabras clave: Aguas residuales; clarificación; cuantificación; floculación; *Giardia*.

Assays for detection and quantification of *Giardia* sp. cysts in wastewater ponds in Maracaibo, Venezuela

Abstract

Previous studies show that the flocculation has high percentages of recovered *Giardia* sp. cysts from wastewater other techniques like filtration had been less efficient. The objective of this research was to detect and to numerated *Giardia* sp. cysts from wastewater. The wastewater samples were flocculated, following the Ho et al. (1995) technique. The pellet was clarified using zinc sulfate, sucrose or formaldehyde-ethyl acetate/sucrose. The recovered cysts were identified and quantified on membrane following the Spaulding *et al.* (1983) technique. The *Giardia* sp. cysts detection and quantification was possible by formol-ethyl acetate/sucrose and microscopic on membrane technique with an recovered of 57% and average 1.5×10^4 y 8.2×10^4 cysts/L. Recovered others techniques not much efficient.

Key words: Clarification; flocculation; *Giardia*; quantification; wastewater.

* Autores para la correspondencia. Email: spertuz@solidos.ciens.luz.ve ó jimenez@solidos.ciens.luz.ve.

Introducción

Giardia sp. ha sido relacionada con brotes diarreicos de origen hídrico en varios países de América y Europa. Muchos brotes se relacionan con la contaminación de las cuencas que abastecen de agua a las poblaciones con descargas residuales (1-3). En América Latina la incidencia del parásito es muy alta, sin embargo, las autoridades sanitarias no reportan giardiasis de origen hídrico (4). En Maracaibo (Venezuela) la giardiasis presenta una prevalencia del 18% al 22% en poblaciones urbanas (5,6). La dispersión de este parásito ocurre a través de descargas residuales a las principales fuentes de agua de consumo humano (7,8). La importancia de conocer la distribución y concentración de los quistes de *Giardia* sp. en el medio acuático, radica en aplicar medidas correctivas que protejan la salud de las poblaciones que hacen uso de estos reservorios (8). En la ciudad de Maracaibo, las principales fuentes de agua están contaminadas con desechos residuales demostrado por la determinación de colifagos y virus entericos propiciando la dispersión de enfermedades diarreicas, como la giardiasis (9). Es apremiante determinar la prevalencia de *Giardia* en aguas residuales, como factor de mayor diseminación de la giardiasis a nuestra población. En Estados Unidos de América y en Europa han sido propuestas varias técnicas para la recuperación de quistes en el ambiente acuático (10-13), basadas todas en la concentración, clarificación y detección de los quistes recuperados de las aguas (14). La filtración a través de cartuchos de polipropileno, junto a la flotación percoll-sacarosa y la cuantificación sobre membrana de triacetato de celulosa, teñidas mediante inmunofluorescencia ha sido la metodología de mayor aceptación para la detección de *Giardia* sp. en el ambiente acuático (7, 14, 15). No obstante, esta metodología ha sido de difícil empleo en Venezuela y otros países latinoamericanos por su alto costo. Recientemente, Botero y col. (16) utilizaron la técnica de floculación con carbonato de calcio pro-

puesta por Vessey y col. (12), junto a la clarificación por flotación con sacarosa seguida de cuantificación en hematocitómetro, obteniendo altos porcentajes de eficiencia en la recuperación de quistes de aguas residuales. Sin embargo, la técnica no permite observar con buen detalle morfológico los quistes, además que presenta interferencia con otras partículas. Los objetivos de esta investigación fueron 1) probar técnicas de clarificación con sulfato de cinc, sacarosa y etil-acetato-flotación con sacarosa para determinar la de mayor eficiencia y 2) establecer una metodología que permita identificar morfológicamente los quistes de *Giardia*, facilitando su cuantificación y que a la vez sea sencilla y económica para ejecutar análisis de aguas residuales.

Material y Métodos

Las muestras de aguas residuales en un volumen de un litro, fueron colectadas de la laguna facultativa del Sistema Piloto de Lagunas de Oxidación de la Universidad del Zulia, localizada a 10° 41' 12" latitud norte y 71° 38' 05" longitud oeste, Maracaibo, Venezuela. Las muestras fueron tomadas al azar en un número de 3, siguiendo este patrón: se tomó cada muestra por triplicado y de cada una se tomaron 3 submuestras. Las mismas fueron procesadas siguiendo el método de concentración por floculación propuesto por Ho y col. (13). Para ello, a cada muestra de agua le fue agregado 10 ml de CaCl₂ (1 M), 10 ml de NaHCO₃ (1 M), ajustándose el pH a 10:00 con NaOH y dejándose en reposo por 24 h a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue dividido en tres porciones. Cada porción fue sometida a un paso de clarificación. Las clarificaciones probadas fueron: Flotación con Sulfato de Cinc según, APHA (14); Flotación con Sacarosa, según AWWA (15) y Sedimentación con Formol-Etil Acetato y Flotación con Sacarosa, según McNabb y col. (17) modificadas para muestras ambientales, como sigue: el pellet floculado fue lavado tres veces con PBS - Tween 80 y luego resuspendido en una solución de

formol salino y etil acetato para ser recuperado por flotación con sacarosa. Los quistes de *Giardia* sp. recuperados fueron identificados y luego cuantificados por membrana siguiendo la técnica de Spaulding y col. (18), modificada parcialmente al utilizar una batería de alcoholes decrecientes (10% al 90%).

Al mismo tiempo, se prepararon controles positivos a partir de muestras de heces de pacientes con giardiasis. Estas muestras fueron procesadas según la técnica de Allen y Ridley (19) con 0,1 ml de este "Stock" se cuantificaron en la cámara de conteo celular. Estos fueron sembrados en un volumen adecuado para lograr la concentración de quistes/L.

Resultados y Discusión

Los quistes de *Giardia* se recuperaron de los controles positivos floculados según la técnica de Ho y col. (13). En aguas residuales se detectaron quistes en un 77.7% de las muestras. Resultados similares han sido reportados por Ho y col. (13), corroborando la eficiencia de la técnica en la recuperación de quistes de aguas residuales y controles.

Recuperación de quistes *Giardia* de controles positivos

La recuperación de estas estructuras fue alta al clarificar las muestras con formol etil acetato combinado con sacarosa, lográndose obtener un porcentaje promedio

del 57.13% en los controles positivos, con un rango de 15,29% a 82% (Tabla 1). Los contajes de *Giardia* oscilaron entre $1,5 \times 10^4$ a $8,2 \times 10^4$ quistes/L (Tabla 1). Ho y col. (13), muestran este rango de recuperación de quistes en controles.

Con la técnica de clarificación utilizando Sacarosa se recuperaron quistes de *Giardia* en un rango de 2,3 a 4,7 % (Tabla 1) en controles positivos. La clarificación con sulfato de cinc fue menos eficiente que la clarificación con Sacarosa (Tabla 1). Ambas técnicas presentaron un rango de detección que oscila de $1,1 \times 10^3$ a $4,7 \times 10^3$ quistes/L (Tabla 1). Una baja recuperación de quistes de *Giardia* de controles positivos tratados por clarificación con sulfato de cinc ha sido reportada por Le Chevallier y col. (21). En este caso, ocurren distorsiones en la estructura del quiste impidiendo la identificación de los mismos (15, 21).

En contraste, en otros estudios la flotación con sacarosa ha mostrado altos porcentajes de recuperación de quistes de *Giardia* utilizando muestras de agua contaminada (16, 22). La pérdida de quistes observada (Tabla 1) se debe a que no hay separación completa de los detritos ocasionado por una mala homogenización de la muestra, lo que no ofrece un buen contraste y dificulta la visualización de los mismos (21).

Otras investigaciones reportan que la flotación con cualquiera de estas sustancias causa la pérdida de más de la mitad de los

Tabla 1

Eficiencia de recuperación de quistes de *Giardia* en controles positivos sembrados con $8,5 \times 10^5$ quistes/L por la técnica de floculación, clarificación y microfiltración por membrana

Controles	Etil Acetato/Sacarosa ^a	% R ^b	Sacarosa	% R	ZnSO ₄	% R
I	$7,4 \times 10^4$	74,1	$3,5 \times 10^3$	4,70	$1,1 \times 10^3$	1,1
II	$8,2 \times 10^4$	82	$4,7 \times 10^3$	3,5	$1,1 \times 10^3$	1,1
III	$1,5 \times 10^4$	15,29	$2,3 \times 10^3$	2,3	$2,5 \times 10^3$	2,3

^aContajes expresados en quistes de *Giardia*/L de muestra para cada técnica. ^b% R: porcentajes de quistes recuperados.

Tabla 2
Cuantificación de quistes de *Giardia* en aguas residuales
por la técnica de floculación/clarificación/microfiltración por membrana

Muestra	Etil Acetato formol/Sacarosa ^a	Sacarosa	ZnSO ₄
I	2,0 x 10 ³	6,7 x 10 ³	1,2 x 10 ³
II	3,0 x 10 ³	0,8 x 10 ³	0,5 x 10 ³
III	1,0 x 10 ³	0	0

^aContajes expresados en quistes de *Giardia*/L de muestra para cada técnica.

Tabla 3
Análisis Estadístico de los ensayos con diferentes sustancias clarificantes

T*	M	MIN	MAX	SD	VE	CHI	S ¹
ESA	5,7 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	3,6 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ¹⁰	p ≥ 0,001
SC	1,5 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,5 x 10 ³	8,0 x 10 ²	5,6 x 10 ⁴	9,2 x 10 ⁹	p ≥ 0,001
S	3,5 x 10 ³	2,3 x 10 ³	4,7 x 10 ³	1,2 x 10 ³	2,8 x 10 ⁴	9,8 x 10 ⁹	p ≥ 0,001

*T: Técnicas. EAS: Etil acetato-sacarosa. SC: Sulfato de cinc. S: sacarosa. M: media. MIN: Mínimo. MAX: Máximo. SD: Desviación Standard. VE: Valor esperado. CHI: prueba chi. S¹: significancia.

quistes, lo cual disminuye aún más la posibilidad de detección (21, 22).

Según el análisis estadístico (Tabla 3) no existen diferencias significativas entre las técnicas probadas, por lo que se pudiera aplicar cualquiera de ellas sólo que como se observa en las Tablas 1 y 2, la técnica de clarificación con etil acetato y sacarosa fue la que mostró mayor porcentaje de recuperación de quistes. No obstante, aunque las otras técnicas también presentaron resultados aceptables de recuperación de quistes es recomendable el uso de la combinación de sedimentación con flotación para lograr una mayor separación de los quistes de la materia orgánica ayudando de esta manera a una mejor y más fácil identificación de los quistes en el agua.

Recuperación de quistes *Giardia* de aguas residuales

La detección de los quistes de *Giardia* en aguas residuales fue posible mediante el uso de la técnica de concentración por flocu-

lación, clarificación con etil acetato y sacarosa y la microfiltración por membrana que ofreció un rango de detección de 1 x 10³ a 3 x 10³ quistes/L (Tabla 2). Ho y col. (13) muestran resultados similares para contajes obtenidos de aguas residuales. La floculación combinada con la sacarosa y la microfiltración por membrana fue más eficiente que las otras dos técnicas para la detección de quistes de *Giardia*, pero no arrojó contajes uniformes, éstos estuvieron en un rango de 0 a 6,7 x 10³ quistes/L (Tabla 2). Contrariamente a lo hallado en este estudio, Botero y col. (16) encontraron porcentajes de recuperación mucho más altos.

Clarificando por flotación con Sulfato de Cinc, se obtuvo un rango de detección de quistes de 0 a 1,2 x 10³ por litro (Tabla 2). Le Chevallier y col. (21), encontraron resultados similares. La fijación y coloración de quistes en la membrana sirvió como lo expone Spauding y col. (18) para aumentar la visualización y facilitar los contajes.

Al igual que en los controles positivos la recuperación de quistes de *Giardia* de aguas negras fue mejor al emplear la combinación de clarificación por flotación con sedimentación para la reconcentración de quistes, aunque estadísticamente no hay diferencias significativas ($p \geq 0.001$) se recomienda usar la combinación de sedimentación con etil acetato y flotación con sacarosa o sulfato de cinc para lograr que se despeguen los quistes de los grumos de materia orgánica que se forman en las piscinas de estabilización y que evidentemente no permiten lograr contajes más cercanos a la realidad.

Conclusión

La técnica probada que engloba el paso de floculación junto a la clarificación con formol-etil acetato y sacarosa y microfiltración por membrana, se puede catalogar como una técnica que además de permitir el estudio de la calidad del agua tratada desde el punto de vista de la detección de *Giardia* sp., es económica y puede ser ejecutada de una forma sencilla en un día.

Agradecimientos

Al Convenio LUZ-FUNDACION POLAR y al personal del Centro de Investigación del Agua (CIA) por su apoyo económico y logístico, sin el cual no hubiese sido posible este estudio. Al personal del Laboratorio de Investigación Biotecnológica sobre Microbiología del Petróleo por su apoyo moral y logístico.

Referencias Bibliográficas

1. CRAUN G. *Journal AWWA* 80: 40-52, 1988.
2. HERWALD B., CRAUN G., STOKES S., JURANEK D. *Journal AWWA* 84: 129-135, 1992.
3. WALLIS, P.M. *Giardia from molecules to disease*, R. Thompson, J. Reynoldson y A. Lymbery (Eds), CAB International, Cambridge (Great Britain), pp. 99-122, 1993.
4. CHACÍN-BONILLA L. Comunicación Personal.
5. RIVERO Z. Comunicación Personal.
6. CHACÍN-BONILLA L., DE YOUNG M., CANO G., GUANIPA N., ESTEVEZ J., BONILLA E. *Am J Trop Med Hyg* 49: 63-67, 1993.
7. ROSE J., GERBA CH., JAKUBOWSKI W., SYKORA J., SORBER CH. *Environ Sci Tech* 25: 1393-1400, 1991.
8. SYKORA J., SORBER CH., JAKUBOWSKI W., CASSON L., GAVAGHAN D., SHAPIRO M., SCHOTT M. *Wat Sci Tech* 24: 187-192, 1991.
9. BOTERO L., ESTRADA P., HERRERA L. Estudio de colifagos en las lagunas de Estabilización de la Universidad del Zulia. *VII Congreso Venezolano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Puerto La Cruz (Venezuela), pp. 1-11, 1993.
10. JARNEY C., BAILEY I., HOWQUAVE A. The enhancement of *Cryptosporidium* and *Giardia* detection and quantification in turbid water. *Health Related water Microbiology*. Mallorca (Spain), pp. 132, 1996.
11. KAMARIS P., SEITZ. Methodology and detection *Cryptosporidium* and *Giardia* from water samples. *Health Related water Microbiology*. Mallorca (Spain), pp. 119, 1996.
12. VESSEY G., SLADE J., BYRNE M., SHEPHERD K., FRICKER C. *J appl Bacteriol* 75: 82-85, 1993.
13. HO B., TAM T., HUTTON P., YAM W. *Wat Sci Tech* 31:431-434, 1995.
14. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standart Methods for the examination of water and wastewater*, APHA, AWWA, WPCT, Washington (USA), 1992.
15. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. *Giardia lamblia in water supplies, detection, ocurrence and removal.*, AWWA, Washigton (USA), pp. 1-50, 1985.

16. BOTERO L., QUINTERO W., MEDINA Z., OLIVEROS C. *Kasmera* 24: 83-91, 1996.
17. McNABB S., HENSEL D., WELCH D., HEJBETH H., MCKEE G., ISTRE G. *Journal Clinical Microbiology* 22: 587-589, 1985.
18. SPAULDING J., PACHA R., CLARK G. *Journal Clinical Microbiology* 18: 713-715, 1983.
19. ALLEN A., RIDLEY D. *J Clin Path* 23: 545-546, 1970.
20. MELVIN D., BROOK M. *Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parásitos intestinales*. Nueva Editorial Interamericana, México, 198 p, 1971.
21. Le CHEVALLIER M., TROCK T., BURNS M., LEE R. *Journal AWWA* 82: 75-82, 1990.
22. GILMOUR R., SMITH H., SMITH P., MORRIS G., GIRDWOOD W. *Wat Sci Tech* 24: 179-182, 1991.