

Acción de distintos coagulantes para la eliminación de *Cryptosporidium* spp. en el proceso de potabilización del agua

B. ABRAMOVICH¹*, M.C. LURA², E. CARRERA³, M.I. GILLI¹, M.A. HAYE¹, S. VAIRA³

¹ Sección Aguas, ² Cátedra de Microbiología General, ³ Departamento de Matemática. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Paraje El Pozo, C.C. 242, 3000 Santa Fe, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: blerman@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN

Cryptosporidium es uno de los microorganismos de mayor interés desde el punto de vista de la Salud Pública y constituye un problema prioritario para las plantas y organismos reguladores de agua. Debido a su pequeño tamaño y a su resistencia a la cloración, la eliminación por el proceso de potabilización es una tarea compleja. En este trabajo se analizó la efectividad de distintos coagulantes utilizados comúnmente en tal proceso para lograr la remoción de los ooquistes. Se trabajó con la prueba de jarras (Jar Test). Se halló que: 1) Los coagulantes con agregado de polímeros coadyuvantes producen remociones de ooquistes superiores a 2 log. 2) Un valor bajo de turbiedad no asegura una remoción óptima de los parásitos. 3) La adición de polielectrolitos al cloruro férrico disminuye la variabilidad tanto en la turbiedad final como en la eliminación de *Cryptosporidium*.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, agua, potabilización, coagulantes

SUMMARY

The action of different coagulants to remove *Cryptosporidium* during the process of water treatment. *Cryptosporidium* is one of the microorganisms of main concern from the point of view of Public Health, being a priority problem for water treatment plants and water regulatory institutions. Due to its small size and resistance to chlorination, *Cryptosporidium* removal during the process of drinking water treatment is a hard task. The effectiveness of different coagulants commonly used in the process of removal of oocysts was analyzed. The technique used was the Jar Test. It was found that: 1) coagulants with the addition of polymeric coadjuvants produce over 2 logs of oocyst removal; 2) a low value in turbidity does not necessarily mean optimal parasite removal, and 3) the addition of polyelectrolites to ferric chloride diminishes variability, both in final turbidity and *Cryptosporidium* removal.

Key words: *Cryptosporidium*, water, drinking water treatment, coagulants

INTRODUCCIÓN

En Argentina, las infecciones intestinales producidas por protozoos se consideran una afección endémica con altos índices de prevalencia (6). La OMS aconseja realizar estudios para determinar la importancia relativa de las distintas vías de transmisión (28) siendo reconocidas, siguiendo la ruta fecal oral, el agua, los alimentos y el contacto persona a persona. Las materias fecales humanas y/o de animales son las fuentes habituales de contaminación (23).

La importancia de la vía hídrica ha sido documentada fehacientemente a través de numerosos trabajos que estudiaron brotes de diarrea aguda causados por *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* (2, 22, 31). Los quistes y ooquistes de estos protozoos tienen características que les permiten transformarse en importantes agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por el agua: son estables en el medio ambiente, efectivos aún en bajas dosis infecciosas y no son destruidos por el cloro en las concentraciones usadas para la potabilización del agua de bebida (9, 23).

Por razones históricas, durante muchos años, los criterios de calidad del agua para diversos fines, así como los tratamientos de potabilización, fueron orientados a detectar y eliminar bacterias patógenas (1). En la actualidad se ha demostrado que la ausencia de indicadores bacterianos de contaminación es insuficiente para garantizar que no existe riesgo de infección por organismos resistentes. Se han descrito brotes de

criptosporidiosis de origen hídrico, aún cuando los parámetros de control de calidad no infringían las reglamentaciones para agua de bebida (18, 24).

Publicaciones recientes coinciden en afirmar que *Cryptosporidium* constituye un gran riesgo para la salud pública, debido a que se han detectado ooquistes en el 3,8 al 40% de aguas tratadas (19). En la ciudad de Santa Fe (Argentina) estudios recientes, efectuados en fuentes de agua superficial, determinaron que el 92% de las muestras analizadas estaban contaminadas con ooquistes (3, 11).

En pacientes inmunodeprimidos los síntomas de esta coccidiosis pueden conformar cuadros muy severos y ser, en algunos casos, la causa de su muerte. En la población inmunocompetente la enfermedad se manifiesta como un proceso diarreico de 1-2 semanas de duración, benigno y autolimitado (2).

Es por estas razones que la remoción de este microorganismo constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento aún en países de avanzada tecnología ya que, si sobrepasa las barreras de coagulación y filtración, la desinfección es poco efectiva para eliminarlo.

Tratamiento del Agua

La operación de potabilización del agua comprende una serie de procesos cuya finalidad es transformar la materia prima inicial (agua cruda) en un producto final (agua potable) que esté de acuerdo con las características impuestas por las normas vigentes (27).

En el caso de las aguas superficiales, el tratamiento más usual es el llamado «convencional» que comprende las etapas de: coagulación, floculación, decantación, filtración y desinfección.

Dado que, como ya se señalara, la desinfección en las dosis habituales no es suficiente para eliminar los enteroparásitos y en especial los ooquistes de *Cryptosporidium*, adquieren especial significado las etapas previas, que proporcionan la denominada «barrera múltiple» (29) a fin de impedir que estos microorganismos lleguen al agua de bebida. La coagulación y filtración (remoción fisicoquímica) constituyen, por lo tanto, operaciones críticas para lograr la eliminación de los mismos (20). Shaw y col. (32) afirman que, en el caso de este protozoo coccidio, su remoción por filtración, sin el tratamiento químico previo de coagulación, es dificultosa debido a la repulsión electrostática generada entre los ooquistes y la superficie del medio filtrante.

En las plantas de tratamiento convencional de potabilización, las sales de aluminio y de hierro constituyen los coagulantes más utilizados, siendo el sulfato de aluminio o alúmina el más común de ellos (15); sin embargo, debido a las ventajas que ofrece, el cloruro férrico se está utilizando cada vez con mayor asiduidad (16).

Otros productos cuyo uso se está generalizando son el polihidroxiclорuro de aluminio (PACl) (15) y los coadyuvantes de coagulación tales como polielectrolitos catiónicos y la poliacrilamida (26).

Un método práctico para hallar las dosis requeridas de los coagulantes y de otros factores que afectan el proceso de coagulación (pH, alcalinidad, temperatura) es a través del ensayo a escala de laboratorio denominado prueba de jarras (Jar Test) ya que los resultados que se obtienen pueden ser trasladados a las operaciones de planta (7, 14). Este proceso se considera más eficiente cuando se logra una menor turbiedad, ya que ésta es el parámetro de medición habitual del mismo (21).

En un trabajo previo, Abramovich y col. (4) evaluaron, a través del ensayo de jarras, la acción del sulfato de aluminio y del polielectrolito catiónico en la remoción de enteroparásitos, obteniendo resultados promisorios.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar el efecto de diferentes coagulantes, empleados habitualmente en plantas de tratamiento, para la eliminación de *Cryptosporidium* del agua de bebida; b) determinar la variación en la turbiedad cuando se utilizan distintos coagulantes y c) correlacionar los valores finales de turbiedad obtenidos, con la remoción porcentual de este protozoo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de agua

Se utilizaron muestras de agua cruda, de origen superficial, obtenida de la fuente de provisión de la ciudad de Santa Fe.

A cada una de las muestras, se le determinaron los parámetros fisicoquímicos de calidad, de acuerdo a las normas recomendadas por Standard Methods (5): Alcalinidad (Método de titulación potenciométrica); Aluminio (Método de Eriocromo cianina R); Hierro (Método de la fenantrolina); pH (Método potenciométrico) y Turbiedad (Método nefelométrico).

Suspensión de ooquistes de *Cryptosporidium*

Se obtuvieron de un pool de materia fecal de humanos infectados, previamente inactivados con solución de formol 5% (33) por razones de bioseguridad. Para su extracción, la materia fecal se filtró a través de gasa doble, se centrifugó durante 5

minutos a 3000 rpm y el sedimento se concentró utilizando el Método de Sheather (17). Se prepararon suspensiones de 10^5 - 10^6 ooquistes/ml.

Coagulantes y polímeros

Se utilizaron como coagulantes: sulfato de aluminio (7,58% de Al_2O_3), polihidroxiclorigenato de aluminio -PACl (18% de Al_2O_3) y cloruro férrico (42%). Los coadyuvantes de coagulación empleados fueron el polielectrolito catiónico: poliamina cuaternaria (producto de la polimerización de epíclorhidrina y 1,3 dicloro 2 propanol) y el polímero no iónico: poliacrilamida.

Prueba de Jarras

Determinación de la dosis óptima de coagulante

Se utilizó un equipo compuesto por seis vasos de acrílico, cada uno de los cuales tenía 2 litros de capacidad.

Para evaluar la dosis óptima de cada uno de los coagulantes a utilizar, se agregaron al agua cruda contenida en los vasos, volúmenes variables del coagulante en estudio, de manera de obtener concentraciones finales de 40- 90 mg/l en el caso de la alúmina, 25- 85 mg/l para PACl y 20- 40 mg/l cuando se trabajó con cloruro férrico.

El tiempo de mezcla rápida fue de 3 minutos a 140 rpm y el de floculación fue de 15 minutos a 40 rpm; la sedimentación se llevó a cabo durante 15 minutos.

A continuación se determinaron las turbiedades logradas. Se consideró como dosis óptima la menor concentración del coagulante necesaria para obtener la turbiedad más baja.

*Efecto de los distintos coagulantes en la remoción de *Cryptosporidium**

Una vez hallada la dosis óptima de coagulante, se emplearon tres vasos del equipo de jarras, a los que se denominó 1, 2 y 3, utilizando el siguiente esquema de trabajo:

Vaso 1: se colocó agua cruda con la dosis óptima del coagulante en estudio. Este fue el vaso control.

Vaso 2: se colocó agua cruda con el inóculo de *Cryptosporidium*.

Vaso 3: se colocó agua cruda con el inóculo de *Cryptosporidium* y con la dosis óptima de coagulante.

Para cada coagulante los experimentos se repitieron con 5 muestras diferentes de agua. Los ensayos realizados fueron:

Ensayo I (n=5): Se utilizó alúmina, añadiéndose poliamina cuaternaria (0,5 mg/l) al minuto de iniciada la mezcla rápida.

Ensayo II (n=5): Se llevaron a cabo utilizando PACl y, como coadyuvante de floculación, poliacrilamida (0,02 mg/l). Este polímero se agregó 20 segundos antes del inicio de la floculación.

Ensayo III (n=5): En estas pruebas se utilizó cloruro férrico en una dilución 1:400.

Ensayo IV (n=5): Se empleó cloruro férrico agregando, además, poliamina cuaternaria (0,5 mg/l) al minuto de iniciada la mezcla rápida.

Medición de las concentraciones de ooquistes en las jarras

Los niveles de siembra para estos estudios estuvieron dentro del orden de 10^5 - 10^6 ooquistes/l. Esta concentración permitió evaluar la reducción de los mismos luego de aplicar el tratamiento de coagulación y sedimentación. En todas las experiencias (n= 20) y luego de la sedimentación, se filtró una alícuota del líquido sobrenadante de las jarras 2 y 3 a través de filtros de acetato de celulosa de 13 mm de diámetro y 1,2 mm de porosidad nominal.

Para los recuentos se empleó la técnica de Inmunofluorescencia directa aplicando anticuerpos monoclonales (Merifluor, Meridian Diagnostics) (3), habiéndose utilizado un microscopio de epifluorescencia Olympus BH-2 provisto de lámpara de mercurio. Los ooquistes fueron identificados por su tamaño, forma y fluorescencia. Debido a que los mismos se obtuvieron de heces humanas, la investigación de su estructura interna fue omitida. Una vez efectuado el recuento y teniendo en cuenta el volumen procesado, se calculó su concentración (ooquistes/l de agua); la remoción lograda se obtuvo de la diferencia entre los recuentos de las jarras 2 y 3.

Análisis Estadístico

Para realizar el procesamiento de los datos se utilizó el software SPSS versión 10.0. Todas las comparaciones se realizaron adoptando un nivel de significancia del 5% ($\alpha= 0,05$). Se hallaron los estadísticos descriptivos media, mediana, coeficiente de variación (CV) y coeficiente de variación robusta (rango intercuartílico/mediana) para efectuar comparaciones entre las variables (13, 35).

Se realizaron comparaciones de la remoción porcentual de *Cryptosporidium* y de turbiedad final entre dos o más ensayos mediante la aplicación de técnicas no paramétricas o a libre distribución como los test de Mann Whitney y Kruskal Wallis. La relación entre turbiedad final y remoción se analizó mediante el gráfico de dispersión y el coeficiente de correlación de Spearman (12).

RESULTADOS

Los valores de pH (promedio: 6,91; desviación estándar: 0,34) y alcalinidad (> 25 mg/l) del agua cruda estuvieron dentro de los apropiados para una correcta coagulación (21, 30) y las concentraciones residuales de aluminio y hierro no superaron los valores recomendados por las normas de calidad de agua de consumo (<0,2 mg/l y < 0,3 mg/l respectivamente) (27).

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de la remoción de *Cryptosporidium* en los diferentes ensayos, así como los valores de turbiedad final.

Se observa la mayor eliminación porcentual media, con el menor CV asociado, cuando se trabajó con PACl y poliacrilamida. La menor remoción, inferior a 2 log, así como la mayor variabilidad (expresada a través del

CV de 1,81%) se produjo en el ensayo con cloruro férrico (ensayo III) (Cuadro 1). El agregado de la poliamina cuaternaria a este coagulante produjo una mayor remoción promedio de ooquistes, y si bien no fue estadísticamente significativa ($p=0,190$), permitió obtener una menor variabilidad ($p=0,04$) (Figura 1).

Comparadas las turbiedades finales de los cuatro ensayos se hallaron diferencias estadísticas altamente significativas entre ellas: $p=0,007$ (Figura 2), siendo la de mayor valor la correspondiente al ensayo I. En cuanto a las turbiedades finales obtenidas en los ensayos III y IV, no se hallaron diferencias significativas entre las mismas ($x_{-III}=1,66$ UNT y $x_{-IV}=1,43$ UNT, $p=0,310$), sin embargo, los coeficientes de variación robusta calculados descendieron de 60% a 16,4%.

La correlación entre los valores finales de turbiedad y remoción de ooquistes, para todos los ensayos, no arrojaron resultados estadísticamente significativos ($p=0,569$) corroborados en el análisis del diagrama de dispersión (Figura 3).

DISCUSIÓN

Cryptosporidium es uno de los microorganismos de interés desde el punto de vista de la Salud Pública y constituye un problema prioritario para las plantas y organismos reguladores de agua. Como ya se hiciera referencia, su eliminación es una tarea compleja debido a su pequeño tamaño y la resistencia a la cloración (25). Mediante este estudio se analizó la efectividad de distintos coagulantes para lograr la remoción de los ooquistes, durante el proceso de coagulación, así como su relación con las turbiedades finales.

En los ensayos con alúmina y PACI, se procedió al agregado de polímeros orgánicos ya que sin estos las turbiedades logradas, luego de la coagulación, fueron en algunos casos superiores a 4-5 UNT, según lo demostrado por Abramovich y col. (4).

Las turbiedades finales logradas con el cloruro férrico con y sin el agregado de polímero, fueron muy satisfactorias (promedio cercano a 1,5 UNT). Este fue el motivo por el cual se decidió trabajar, en el caso de este coagulante, con ambos procedimientos para la remoción de ooquistes. Por otra parte, los resultados de los coeficientes de variación obtenidos demostraron que cuando se utilizó el cloruro férrico con el polímero, disminuyó más efectivamente la turbiedad. En este último caso se detectó, además, un mayor promedio y una menor variabilidad en la eliminación de ooquistes. El agregado de polielectrolito mejoró la calidad del flóculo facilitando la retención de los parásitos en su estructura, lo que conduciría a una mayor confiabilidad en su remoción. Estos hallazgos serían coincidentes con los de Briley y col. (8) quienes comprobaron que la adición de un floculante aniónico optimiza la remoción de algas, al aumentar la resistencia del flóculo. Además Bustamante y col. (10) sugieren que el mecanismo de remoción de ooquistes por coagulación con cloruro férrico es por incorporación del parásito al flóculo y no por acción electrostática, de ahí la influencia de la calidad física del mismo para su retención. Abramovich y col (4) arribaron a conclusiones similares en el caso del empleo de PACI con y sin agregado de polielectrolitos para la eliminación de *G. lamblia* en aguas, ya que el agregado de poliácridamida favorecía este mecanismo, con un CV asociado sumamente bajo (0,11%).

En todos los casos en los que se empleó coagulante con polímeros coadyuvantes (Ensayos I, II y IV) se lograron remociones de ooquistes superiores a 2 log con bajos coeficientes de variación ($<0,5\%$). Teniendo en cuenta que, según Smith y col. (33), se pueden obtener valores cercanos a 1 log en aguas crudas que han sido coaguladas y floculadas eficientemente, los resultados hallados en estas experiencias se consideraron satisfactorios.

La falta de correlación entre eliminación de ooquistes y turbiedad final, coincide con lo hallado por States y col (34) quienes afirman que la turbiedad no siempre es un indicador confiable de la remoción de *Cryptosporidium* ya que, aún cuando altos niveles de turbiedad pueden ser un indicio del pasaje de ooquistes, valores bajos no proveen absoluta confianza sobre la eliminación de los mismos. En este estudio se obtuvieron turbiedades óptimas tanto cuando se utilizó el cloruro férrico como único coagulante como cuando se lo aplicó con el agregado de polímero. Sin embargo la remoción de ooquistes, en el último caso, resultó mucho más satisfactoria con una menor variabilidad dada por su CV asociado notoriamente inferior, hecho que disminuye la posibilidad de pasaje de ooquistes al agua de bebida. Estos altos porcentajes de eliminación de *Cryptosporidium*, que indican una disminución notoria de la carga de ooquistes, contribuirían al éxito en el proceso de potabilización, considerando que la filtración, etapa posterior a la descrita en este trabajo, complementa el efecto de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abramovich B, Carrera E, Lurá MC, Haye MA, Zamar L, Gilli MI, Bot B (1997) Transmisión hídrica de giardiasis en áreas endémicas de parasitosis intestinales. Rev. Bioq. y Cs. Biol. UNL (FABICIB). 1: 9-15.
2. Abramovich BL, Lurá MC, Gilli MI, Haye M (1999) *Cryptosporidium* y agua. Rev. Arg. Microbiol. 31:97-105.
3. Abramovich B, Gilli MI, Haye MA, Carrera E, Lurá MC, Nepote A, Gómez P, Vaira S, Contini L (2001) *Giardia* y *Cryptosporidium* en aguas superficiales. Rev. Arg. Microbiol. 33: 167-176.
4. Abramovich BL, Carrera E, Lurá MC, Gilli MI, Haye MA, Vaira S, Zerbatto M (2002) Remoción de enteroparásitos en agua por coagulación, floculación y sedimentación. Rev. Ing. Sanit. y Amb. (AIDIS). 62: 55-62.
5. APHA, AWWA, WEF (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC. Estados Unidos.
6. Basualdo JA, Coto CE, de Torres RA (1996) Microbiología Biomédica. Editorial Atlante. Buenos Aires, p. 915-921.
7. Bell-Ajy K, Abbaszadegan M, Ibrahim E, Verges D, LeChevallier M (2000) Conventional and optimized coagulation for removal. J. AWWA. 92: 44-58.
8. Briley DS, Knappe DRU (2002) Optimizing ferric sulfate coagulation of algae with streaming current measurements. J. AWWA. 94: 80-89.
9. Brion GM, Neelakantan TR, Lingireddy S (2001) Using neural networks to predict peak *Cryptosporidium* concentrations. J. AWWA. 92: 99-105.
10. Bustamante HA, Raj Shanker S, Pashley RM, Karaman ME (2001) Interaction between *Cryptosporidium* oocysts and water treatment coagulants. Wat. Res. 35: 3179- 3189.
11. Carrera E, Vaira S, Abramovich B, Wals F, Contini L (2003) Modelando la detección de niveles altos de *Cryptosporidium* en fuentes de agua. Rev. Bioq. y Cs. Biol. UNL (FABICIB). 7: 101-108.
12. Conover W J (1998). Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons (Ed). New York.
13. De Groot M (1988). Probabilidad y Estadística. Addison Wesley Iberoamericana (Ed). Buenos Aires.
14. Drikas M, Chow Ch, House J, Burch M (2001) Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. J. AWWA. 93: 100-111.
15. Exall KN, Vanloon GW (2000) Using coagulants to remove organic matter. J. AWWA. 92: 93-102.
16. Gámez AA (2002) Cloruro férrico, un coagulante de alta performance. Rev. Ing. Sanit. y Ámb. (AIDIS). 64: 23-27 .
17. García, LS; Brukner, DA (1997) Diagnostic Medical Parasitology. ASM Press. Washington DC.
18. Geldrich EE (1997) La amenaza mundial de los agentes patógenos transmitidos por el agua. Rev. Ing. Sanit. y Amb. (AIDIS). 30: 44-50.
19. Gofti- Laroche L, Demanse D, Joret JC, Zmirou D (2003). Health risks and parasitological quality of water. J. AWWA 95: 162-172.
20. Huck PM, Coffey BM, Emelko MB, Maurizio DD, Slawson RM, Anderson WB, Melia ChR (2002) Effects of filter operation on *Cryptosporidium* removal. J. AWWA. 94: 97-111.
21. Kawamura, S (1996) Optimización de los procesos básicos del tratamiento de agua. Rev. Ing. Sanit. Amb. (AIDIS) 27: 44-57
22. Kramer MH, Quade G, Hartemann P, Exner M (2001) Waterborne disease in Europe- 1986-96. J. AWWA. 93: 48-53.
23. Lurá MC, Beltramino D, Abramovich B, Carrera E, Haye, MA, Contini L (2000) El agua subterránea como agente transmisor de protozoos intestinales. Arch. Arg. Ped. 98: 18-26.
24. Mac Kenzie JJ, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Rose JB (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Eng. J. Med., 331: 161-167.
25. Mackey ED, Hargy TM, Wright HB, Malley JP, Cushing RS (2002) Comparing *Cryptosporidium* and MS2 bioassays-implications for UV reactor validation. J. AWWA. 94: 62-69.
26. Metcalf & Eddy (1995). Ingeniería de aguas residuales . Tratamiento, vertido y reutilización. Mc Graw- Hill Ed. Madrid.
27. Organización Mundial de la Salud (1995) Guías para la calidad del agua potable. Alsograf Ed. España.
28. Organización Panamericana de la Salud (1994) Enfermedades transmitidas por el agua. Simposio regional sobre calidad del agua. Buenos Aires, p. 3.
29. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (1996). La calidad del agua potable en América Latina. ILSI Press. Washington, DC, p. 1-6.
30. Phipps & Bird (2001) The Jar test. Documento electrónico. Accesible por Internet. www.phippsbird.com/jartest.html.
31. Rose JB, Daeschner S, Easterling DR, Curiero FC, Lele S, Patz JA (2000) Climate and waterborne disease outbreaks. J. AWWA. 92: 77-87.
32. Shaw K, Walker S, Koopman B (2000) Improving filtration of *Cryptosporidium*. J. AWWA. 92: 103-111.
33. Smith HV, Robertson LJ, Ongerth JE (1995) Cryptosporidiosis and giardiasis: the impact of waterborne transmission. J Water SRT- Aqua. 44: 258- 274.
34. States S, Tomko R, Scheuring M, Casson L (2002) Enhanced coagulation and removal of *Cryptosporidium*. J. AWWA. 94: 67- 77.
35. Tukey J (1976) Exploratory data analysis. Addison Wesley Publishing Company. Massachusetts