



ESTUDIO DEL DAÑO PRODUCIDO EN EL ADN Y PROTEÍNAS DE *ESCHERICHIA COLI* POR DESINFECCIÓN MEDIANTE RADIACION UV-C y APA.

Cristiani Mariana

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química INTEC-UNL-CONICET.

Directora: Labas Marisol

Codirector: Brandi Rodolfo

Área: Ingeniería Ambiental

INTRODUCCIÓN

El consumo de agua contaminada produce innumerables enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Los métodos convencionales de desinfección de aguas, tales como la cloración, a pesar de su eficacia, pueden reaccionar con la materia orgánica natural (NOM) (Liang y Singer, 2003) para formar una amplia gama de subproductos de desinfección (DBP), muchos de los cuales han sido identificados como cancerígenos y mutagénicos (Woo y col., 2002).

En los procesos de desinfección de agua, la utilización de la radiación UV-C y agentes oxidantes como el ácido peracético (APA), son tecnologías muy atractivas por carecer de los efectos secundarios que produce la cloración convencional (Flores y col., 2014). Es sabido que la radiación UV-C afecta el material genético de las células (ADN y ARN) pero también se ha sugerido que produce fotólisis directa de grupos sulfidriilo de las proteínas (Chan y col., 2006). El APA también afecta, por generación de radicales libres altamente oxidantes, los mismos grupos funcionales proteicos provocando así la pérdida de viabilidad de las células tratadas (Deyer y col., y 1998). Para evaluar el daño al ADN, en el presente trabajo se utilizó una variante de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), conocida como ERIC-PCR. Los elementos ERIC son secuencias de DNA extragenéticas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las enterobacterias; constan de 126 pb, con un repetido invertido central conservado (Tobes y col., 2006). Para revelar el daño provocado a proteína se hicieron geles de poliacrilamida desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

OBJETIVOS

- Estudio de procesos de desinfección de aguas para la eliminación de diferentes microorganismos patógenos utilizando agentes oxidantes en combinación con radiación UV.
- Detección y cuantificación de las alteraciones o daños en los componentes biológicos de los patógenos utilizando técnicas de biología molecular

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de inactivación consistieron en colocar un cultivo, de *E. coli* ATCC 8739 dentro de un reactor anular batch (de 2 L y una lámpara UV con emisión a 254 nm, Philips TUV 15W dispuesta en el eje axial) con una concentración aproximada de 10^7 UFC/cm³. Para llevar a cabo los ensayos, se utilizaron tres niveles de radiación incidente sobre la pared interna del reactor, mediante la utilización de mallas de acero inoxidable dispuestas sobre la lámpara auspiciando como filtros de densidad neutra. Se trabajó con la lámpara sin filtro (100% de radiación) que equivale a 10.5 mW/cm², con un filtro con una transmitancia del 40% que

Título del proyecto: DESARROLLO DE NUEVOS DISPOSITIVOS Y NUEVAS ESTRATEGIAS PARA ESTUDIOS CINÉTICOS EN LA DESCONTAMINACIÓN DE AIRE Y AGUA MEDIANTE PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN

Instrumento: CAID

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Dr. Rodolfo J. Brandi



equivale a 4.2 mW/cm^2 y un filtro con una transmitancia de 20% que equivale a 2.1 mW/cm^2 . Los valores de radiación incidente fueron obtenidos mediante la técnica actinométrica de Murov y col. (1993). Para los ensayos con APA se eligieron las concentraciones de trabajo de 4, 8, 12 y 16 ppm. Con las muestras tomadas a distintos tiempos se realizó el recuento de colonias viables en agar eosina azul de metileno (EMB). También a cada tiempo de muestreo se extrajeron y analizaron las proteínas y el ADN de las células mediante la técnica de SDS-PAGE y de ERIC-PCR respectivamente. Los resultados de estas técnicas fueron obtenidos de geles de agarosa y poliácridamida luego de ser sometidos a electroforesis. Sobre las imágenes de todos los geles se hicieron análisis densitométricos de las bandas formadas.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Para el análisis de resultados, se realizó el recuento de las placas de Petri que contenían entre 30-300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y luego se graficó la concentración bacteriana de *E. coli* ($\log (C/Co)$) versus el tiempo en segundos (s). En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos.

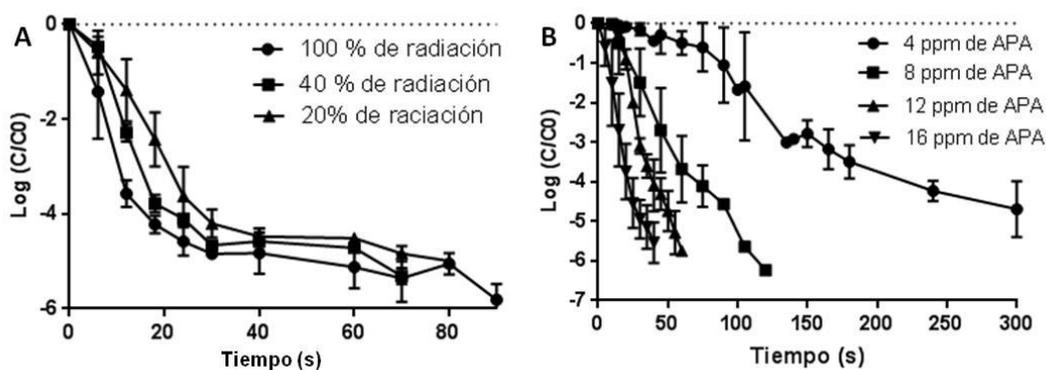


Figura 1. Inactivación de *E. coli* con: **A)** radiación UV-C con las tres intensidades utilizadas y **B)** usando las diferentes concentraciones de APA.

En el gráfico que corresponde a las corridas realizadas con radiación UV en sus distintas intensidades (Figura 1 A), podemos observar que existe muy poca diferencia entre aplicar el 100% de radiación o el 40% ya que en ambos ensayos se obtienen aproximadamente 4 unidades logarítmicas de descenso en 18 y 20 s de exposición respectivamente. Mientras que cuando la radiación incidente fue del 20%, se logró el mismo descenso de unidades logarítmicas a los 30 s. Esta cantidad en la reducción de unidades logarítmicas equivale a un porcentaje de desinfección del 99,99% de *E. coli* en el sistema estudiado.

Respecto a las corridas con APA, se puede observar en la Figura 1 B, como a medida que aumenta la concentración empleada de oxidante aumenta la velocidad de desinfección. Para obtener una reducción de 4 unidades logarítmicas utilizando 4 ppm de APA se debe mantener un tiempo de contacto de 200 s con el oxidante, cuando se usó 8 ppm esto se logró con 90 s de exposición, mientras que para 12 ppm fueron necesarios 40 s y para 16 ppm sólo 20 s.

Se observó una mayor eficiencia por parte de la radiación UV en la desinfección. Las concentraciones de ácido que se asemejan en el tiempo de reacción a la radiación UV son las de 12 y 16 ppm. Con respecto a las curvas de desinfección, para UV se obtuvieron curvas típicas de inactivación, ya que presentan la forma característica de hombro y cola. Esto hace factible pensar que la fase "lag" que se observa en estas curvas no-lineales representa la serie de etapas y condiciones que llevan a la muerte celular. Este tipo de curvas muestra que la acción del agente desinfectante es gradual. En cambio, en el caso del APA, observamos un

comportamiento lineal.

En la Figura 2 se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa, donde se muestran los perfiles de bandas de las muestras analizadas tras la utilización de una lámpara UV germicida con distintos niveles de radiación. Para todas las intensidades de fotones empleadas se observó una modificación del patrón de bandas de la ERIC-PCR. La desaparición de las bandas de mayor peso molecular cuando la radiación fue del 100% se manifestó a los 12 s, mientras que cuando se realizó con 40 y 20 % de radiación, esto sucedió a los 40 y 60 s respectivamente. Cuando la radiación incidente fue del 100 %, se vio que al tiempo final trabajado, 70 s, ya no se resuelve ninguna banda en el gel, lo que no sucede a los tiempos finales de las otras dos condiciones empleadas ya que permanecen las bandas de menor peso molecular. Esto se estudió con más detalle cuando fueron hechas las densitometrías de las bandas en el programa ImageJ/FIJI. En el caso del APA no se observó ninguna alteración del patrón de bandas de la ERIC-PCR para *E. coli* (Figura 2, abajo).

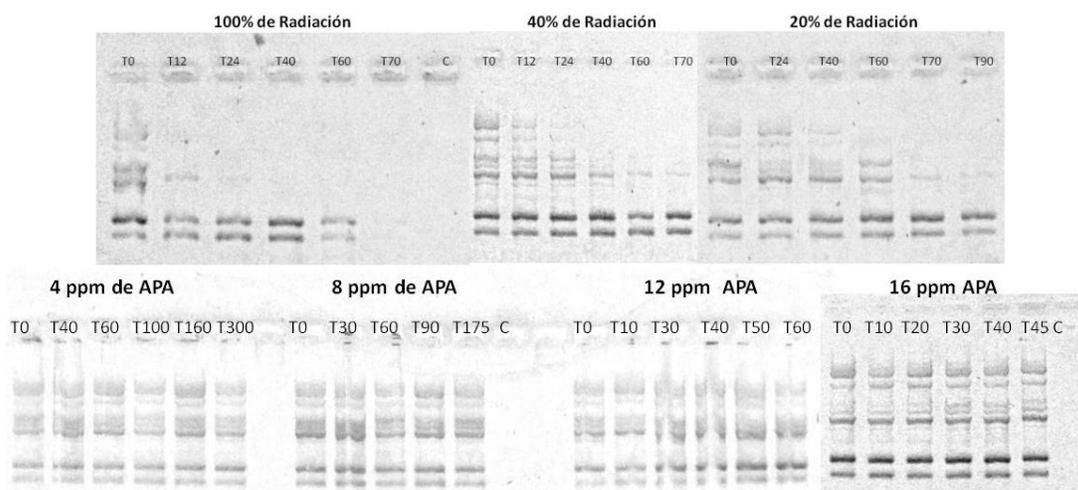


Figura 2. Geles de agarosa al 1,5% con los perfiles de ERIC-PCR para *E. coli* ATCC 8739. Perfiles correspondientes a distintos niveles de intensidad de radiación (arriba) y a las cuatro concentraciones de ácido peracético utilizadas (abajo). T seguida de un número indica la muestra tomada en un determinado tiempo de corrida medido en segundos

Para el estudio de proteína se trabajó con un 100% de radiación, y con la máxima concentración de ácido, 16 ppm. En los geles de poliacrilamida (Figura 3 A y B) pueden observarse posibles alteraciones (desplazamientos de bandas, aparición de nuevas y desaparición de otras, etc) que podrían deberse a la alteración por parte de los agentes desinfectantes utilizados a las proteínas que componen a las células microbianas. Éstas alteraciones o posibles modificaciones de los patrones de proteínas totales se pudieron estudiar en detalle al hacer las densitometrías de los geles con el programa ImageJ/FIJI.

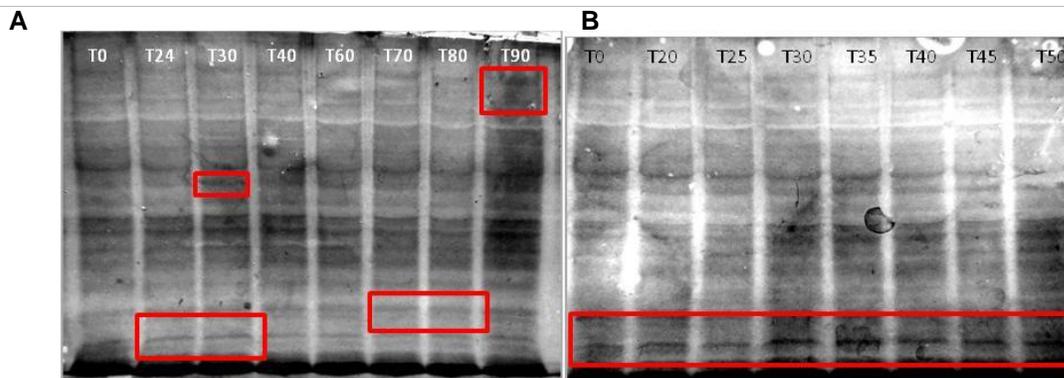


Figura 3. Geles separadores de poliacrilamida al 15 % con tinción de nitrato de plata de *E. coli* tratada con: **A)** radiación UV-C y **B)** 16 ppm de ácido peracético. T seguida de un número indica la muestra tomada en un determinado tiempo de corrida medido en segundos. Los rectángulos rojos indican las posibles zonas del gel con modificaciones en el perfil de proteína.

Por los resultados obtenidos podemos concluir que el método de desinfección con radiación UV-C es altamente eficiente para *E. coli* en agua. La velocidad de inactivación va disminuyendo a media que disminuye el nivel de radiación. Se demostró que la radiación UV causa daño al ADN que se manifiesta como una desaparición de las bandas, al comienzo del proceso, de mayor peso molecular y por último son afectadas las más pequeñas que se pierden totalmente sólo en los tiempos trabajados en las corridas en las que se utilizó 100% de radiación. En el caso del APA también se observa una muy buena efectividad con la cantidad inicial de microorganismos empleada sobre todo con las concentraciones mayores a 8 ppm de ácido. Lo que también se concluye en este caso gracias a la amplificación del ADN por ERIC-PCR, es que al menos con las concentraciones de oxidante empleadas y los tiempos de trabajo utilizado, no se observa ninguna alteración del patrón de bandas en los geles de agarosa. Esto se puede interpretar como una ausencia del daño producido por el ácido hacia el ADN bacteriano o de existir algún tipo de daño no fue posible detectarlo con esta técnica. Con respecto al estudio realizado en proteína se comprobó la presencia de posibles alteraciones producidas por los agentes desinfectantes sobre las proteínas de los microorganismos. Las modificaciones en el ADN como las posibles alteraciones observadas en las proteínas, son alentadoras para profundizar el estudio buscando el daño específico producido en estas biomoléculas y así poder cuantificarlo y llegar a incorporarlo a una cinética de desinfección.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chan, H. L., Gaffney, P. R., Waterfield, M. D., Anderle, H., Matthiessen, H. P., Schwarz, H. P. y Timms, J. F.,** 2006. Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis. *FEBS letters*, 580 (13), 3229-3236.
- Flores, M., Brandi, R., Cassano, A., y Labas, M.,** 2014. Water disinfection with UVC and/or chemical inactivation. Mechanistic differences, implications and consequences. *Advanced Oxidation Technologies. Sustainable solutions for environmental treatments.*
- Denyer, S. P., y Stewart, G. S. A. B.,** 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3-4), 261-268.
- Liang, L., y Singer, P. C.,** 2003. Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. *Environmental Science & Technology*, 37(13), 2920-2928.
- Murov, S. L., Carmichael, I., y Hug, G. L.,** 1993. *Handbook of photochemistry.* CRC Press.
- Tobes R, Pareja E,** 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*; 7: 62.
- Woo, Y.T., Lai, D., McLain, J.M., Manibusan, M.K., Dellarco, V.,** 2002. Use of mechanismbased structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products *Environmental Health Perspectives* 110: 75-87.