



ESTUDIO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUAS UTILIZANDO AGENTES OXIDANTES EN COMBINACIÓN CON RADIACIÓN UV BASADO EN EL ANÁLISIS DEL DAÑO CELULAR CON TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Mariana Cristiani

Doctorado en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Marisol Labas; co-director: Dr. Rodolfo Brandi

Lugar de realización: Laboratorio de Desinfección de agua y aire por procesos avanzados de oxidación, INTEC (UNL-CONICET).

Fecha de la defensa: 10 de marzo de 2020.

mari_cristiani@live.com.ar

Resumen

La desinfección de aguas es un tema primordial para preservar la salud y el bienestar de los seres vivos. Desde hace años, la ciencia está abocada a la aplicación de tecnologías alternativas para evitar el uso del cloro por la conocida formación de subproductos tóxicos que afectan tanto a humanos como animales. Los procesos avanzados de oxidación (PAOs) son métodos alternativos de desinfección, tales como la aplicación de radiación UVC, el uso de ácido peracético (APA), y la combinación de ambos agentes. Se ha probado que estos métodos son altamente eficientes para realizar la desinfección de agua y que además carecen de la formación de subproductos de desinfección perjudiciales para la salud.

En los últimos años la aplicación y comprensión de estas nuevas tecnologías se vio acompañado por la necesidad de obtener un análisis más profundo y complejo del proceso de desinfección que se está llevando a cabo. Este nuevo enfoque pretende no sólo quedarse con el análisis estándar del recuento de microorganismos cultivables en placa para el estudio de la cinética del proceso, sino ir más allá y estudiar los puntos de ataque de cada uno de los desinfectantes dentro de la célula microbiana.

En este marco es donde se encuentra situado este trabajo de tesis: la búsqueda de técnicas de biología molecular que nos permitan determinar el daño molecular producido por los agentes empleados en la desinfección. De esta forma es posible elaborar un seguimiento del proceso mucho más eficiente y específico para cada agente utilizado en la desinfección. Para poder llevar a cabo este objetivo, se tomó la técnica de biología molecular de amplificación en cadena de la polimerasa utilizando el primer específico que amplifica las regiones Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias (ERIC-PCR por sus siglas en inglés) para analizar el daño producido hacia la molécula de ADN.

El desarrollo experimental del presente trabajo fue realizado en un reactor discontinuo anular con una lámpara UV germicida en el centro. Los ensayos fueron realizados sobre tres procesos de desinfección

distintos: (i) Radiación UVC, utilizando tres intensidades de radiación diferentes; (ii) Acido Peracético (APA) como agente desinfectante a distintas concentraciones; y (iii) la combinación APA/UV, donde se aplicó la máxima radiación incidente junto con cuatro concentraciones de ácido. Los microorganismos que se utilizaron fueron *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cuando se trabajó con radiación UVC (sola o en combinación con APA), los microorganismos fueron añadidos al reactor con la lámpara apagada, luego del tiempo de homogenización, se tomó la muestra a tiempo cero y se procedió a encender la lámpara para obtener muestras a distintos tiempos de exposición. Para los ensayos con APA solo, se procedió de forma similar manteniendo la lámpara UV apagada durante toda la corrida. Posteriormente, las muestras fueron sembradas en medios de cultivo sólidos (EMB y Cetrimide) para determinar la concentración de microorganismos viables. De cada muestra fue realizada una extracción de ADN para la evaluación mediante ERIC-PCR. Cuando se utilizó el APA solo, se usó la técnica de SDS-PAGE para determinar cambios en las proteínas celulares.

Todos los procesos de desinfección ensayados (UVC, APA y APA/UV) resultaron altamente efectivos, con un requerimiento de tiempo de contacto corto para lograr un 99.99% de inactivación o desinfección. Se desarrolló una metodología de trabajo utilizando la técnica ERIC-PCR que mostró con éxito ser una herramienta adecuada y funcional para detectar, estimar y monitorear el daño del ADN producido por la radiación UVC. Se ha definido un índice de daño al ADN (IDADN), el cual fue correlacionado con el índice de inactivación (IINAC) demostrando una fuerte relación lineal entre ambos. Esta relación lineal fue consistente en todos los ensayos donde se trabajó con radiación UVC. De aquí, fue definido un factor de proporcionalidad que permite intercambiar un índice por otro. Esto es novedoso y de importante aplicación práctica, ya que se puede hacer el seguimiento del proceso de desinfección tanto por el recuento microbiano en placa como por la amplificación del ADN mediante ERIC-PCR para los ensayos donde se usó UV sola.

Durante el proceso de desinfección utilizando APA solo, no se produjeron cambios en el patrón de banda del ADN durante el proceso de desinfección. En este caso se utilizó la técnica de SDS-PAGE que arrojó la presencia de daño en ciertos péptidos presentes en la parte superior e inferior del gel de poliacrilamida.

Para los ensayos donde se usó APA/UV y *E. coli* se obtuvo una eficiencia global mayor que cuando fueron utilizados cada uno de estos agentes desinfectantes por separado. Además, se pudo desarrollar un simple modelo cinético para representar lo que sucede durante el proceso de desinfección. Se calcularon parámetros que permitieron determinar cómo afecta al proceso global la concentración de APA adicionada al sistema y de esta forma nos permitió cuantificar el sinergismo observado entre los dos agentes desinfectantes empleados. También se pudo cuantificar cómo el APA presente en la solución de trabajo influye en forma negativa en el daño al ADN producido por UVC cuando se usa APA/UV, en contraste con el uso de UV sola.

Para el caso de *P. aeruginosa*, el agregado de APA hizo que el efecto predominante sea el de ataque por radicales libres formados durante el proceso de oxidación avanzado, ya que el daño detectado en el ADN prácticamente fue despreciable. Asimismo, mediante el cálculo de parámetros cinéticos, pudo determinarse la ausencia a nivel global de un efecto sinérgico.

Finalmente, es posible afirmar que en esta tesis se logró desarrollar metodologías para cuantificar el daño a nivel molecular utilizando una técnica de biología molecular (ERIC-PCR) durante los procesos de desinfección realizados. La metodología propuesta, mediante el cálculo de distintos parámetros, proporciona la información suficiente para poder plantear modelados cinéticos simplificados que permiten determinar lo que sucede durante los procesos de desinfección a nivel de target molecular específico.

Abstract

KINETIC STUDY ON THE APPLICATION OF OXIDIZING AGENTS AND UV RADIATION FOR WATER DISINFECTION BASED ON THE ANALYSIS OF CELLULAR DAMAGE USING MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

In this doctorate thesis we evaluated the combined and individual application of APA and UV as efficient and sustainable tools for water disinfection. Disinfection essays on water contaminated with *E. coli* and *P. aeruginosa* were performed in a laboratory-scale reactor and the viability of these microorganisms was controlled by seeding on selective and differential agar media. We used ERIC-PCR to analyze the modifications present in the bacterial DNA, which constitutes a novel application of this technique. We were able to quantify the damage on the bacterial DNA and to directly correlate DNA damage with the bacterial death. Consequently, we developed a quantitative description that details both the changes occurring at a global level (inactivation of the populations of microorganisms) and at the DNA level (assessed by PCR), when two disinfectants with different molecular targets are used