

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL ADN DE ESCHERICHIA COLI POR UV-C EN DESINFECCIÓN DE AGUA.

Cristiani Mariana

*Becarias Doctorales del CONICET. Estudiantes del Doctorado en Ciencias Biológicas
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química INTEC-UNL-CONICET*

Área: Ingeniería

Sub-Área: Ambiental

Grupo: Y

Palabras claves: Desinfección de agua, UV-C, PCR

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de la humanidad en pleno siglo XXI es el acceso al agua potable y a medios adecuados de saneamiento. El consumo de agua contaminada sirve como vehículo de transmisión de innumerables enfermedades causadas por microorganismos patógenos.

Los métodos convencionales de desinfección, tales como la cloración, a pesar de su eficacia, pueden reaccionar con la materia orgánica natural para formar una amplia gama de subproductos de desinfección, muchos de los cuales han sido identificados como cancerígenos y mutagénicos (Woo et al., 2002).

La radiación UV está incluida como una técnica avanzada de desinfección del agua que evita los efectos secundarios de la cloración convencional. La eficacia de la radiación UV-C (253,7 nm, germicida), para la inactivación de un amplio rango de bacterias, virus y parásitos es debido a que afecta directamente el material genético ADN y ARN (Tarrán, 2002). A pesar que el efecto la radiación UV sobre el ADN de las bacterias es bien conocido, son muy escasos los trabajos que realicen un seguimiento del proceso de desinfección mediante la progresión del daño causado, que es la propuesta de este trabajo.

Para el análisis del daño directo hacia el ADN se utiliza ampliamente la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite amplificar el número de copias del segmento de ADN de interés. Una variante de la PCR clásica conocida como ERIC-PCR genera ADN fingerprints (huellas dactiloscópicas de ADN) que permite la discriminación entre cepas bacterianas. Los elementos ERIC son secuencias de DNA extragénicas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las enterobacterias; constan de 126 pb, con un repetido invertido central conservado (Tobes et al., 2006). En esta técnica se emplean iniciadores que reconocen las secuencias conservadas ERIC, y las regiones amplificadas corresponden a los segmentos que separan dichas secuencias. Así, el polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias ERIC dentro del genoma.

En el presente trabajo evaluamos la utilidad del ERIC-PCR para analizar la inactivación de microorganismos por la radiación UV-C.

Proyecto: CAI+D 2011 PI 501 2011 01 00205 LI – Descontaminación Química y Biológica de Aire y Agua empleando Procesos Avanzados de Oxidación.

Directora: Dra. Marisol Labas. **Co-Director:** Dr. Rodolfo Brandi. (Directores de las becarias)

Coautores: Romero Gabriela G., Flores Marina, Fabián Tedeschi, Fabián Zalazar, Rodolfo Brandi, Marisol Labas.

MATERIALES Y METODOS

Dispositivo Experimental

Los ensayos experimentales se realizan en un reactor batch, anular, mezcla perfecta El reactor está compuesto por un tanque reservorio de acrílico de 2000 cm³ de volumen con camisa refrigerante. Con un radio interno de 3,7 cm y un radio externo de 7,5 cm. La temperatura se mantuvo constante a 20°C utilizando un baño termostático (HAAKE). El reactor posee un sistema de agitación orbital mecánico. Además cuenta con dos entradas adicionales por donde se realizan la toma de muestras y la medición de temperatura. Las conexiones entre los elementos del sistema están hechas con mangueras de silicona. Durante las corridas experimentales el dispositivo fue irradiado con una lámpara tubular Philips TUV (15 W), baja presión de vapor de mercurio (emisión a 253,7nm) que se encuentra en el espacio anular del reactor, separada del líquido por un tubo concéntrico de cuarzo.

Corrida Experimental

Se acondicionó el dispositivo experimental (lavado y desinfección). Se tomó 2 ml del cultivo con *Escherichia coli* que fue desarrollado durante 24h a 37°C en caldo nutritivo (Biokar diagnostics). Esto se colocó dentro del reactor en 1998 ml de solución fisiológica estéril (Roux Ocefa) (dilución 1/1000). A continuación se comenzó con la agitación del dispositivo y se encendió luego, la lámpara UV. Se inició la toma de muestra cada dos segundos durante 24 segundos y después se tomaron muestras a los 30, 40 y 60 segundos. Con las muestras obtenidas se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada (Biokar diagnostics) que se sembraron en superficie de placas de agar EMB (Biokar diagnostics) e incubaron por 24 h a 37°C. Tras este tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias desarrolladas.

Reacción de ERIC-PCR

Extracción de ADN

Para este análisis se seleccionaron las muestras a tiempo 0, 12, 18, 24, 30, 40 y 60 segundos. Se tomó 1,5 ml de cada una de ellas, los cuales fueron centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento agregando nuevamente 1,5 ml de cada muestra. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se colocaron 100 µl de agua destilada estéril en cada tubo. Por último las muestras se incubaron en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos.

Preparación de la Mix-PCR

En tubos de 200 µl se colocó: 9 µl de agua libre de nucleasas (MiliQ Promega Biodynamics); 12,5 µl de GoTaq Green MMix (Promega Biodynamics), concentración final 1X; 1 µl Mix Primers (Forward/ Reverse) (Figura 1), concentración final 0,4 µM; 2,5 µl de la muestra de ADN. Completando un volumen final de reacción de 25 µl.

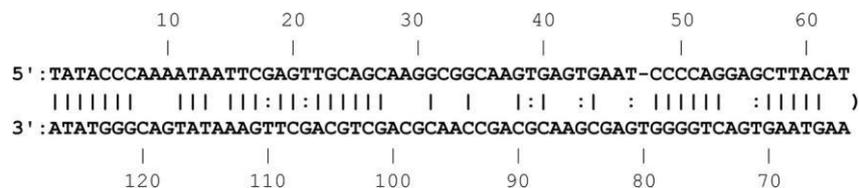


Figura 1. Secuencia de Primers ERIC-PCR (Wilson L.A. y Sharp P.M., 2006).

Programa de PCR

Las experiencias se realizaron en un termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), con un ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C; seguido de 28 ciclos con las siguientes variaciones de temperatura: 30 segundos a 90 °C, 1 minuto a 40°C, 8 minutos a 65°C. Por último un ciclo de elongación de 16 minutos a 65°C (Versalovic et al. 1991).

Electroforesis

Los productos formados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, teñidos con Bromuro de Etidio y documentados por fotografía en un transiluminador bajo iluminación con luz UV.

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* ($\log (C/C_0)$) versus el tiempo en segundos (s). En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos.

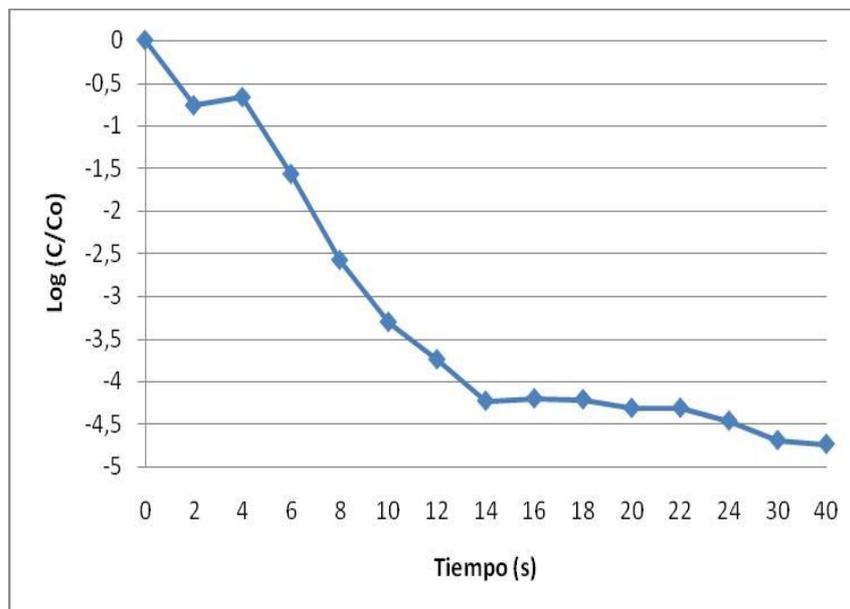


Figura 2. Inactivación de *E.coli* con luz UV-C.

En la gráfica se puede observar una típica curva de inactivación, ya que presenta 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 (radiación UV) es gradual.

Iniciando en el tiempo cero con un recuento de $3,5 \times 10^7$ UFC/ml, podemos notar un descenso de más de 4 unidades logarítmicas (99,99% de inactivación) a los 14 segundos, con un recuento de $2,05 \times 10^3$ UFC/ml.

En la Figura 3 se muestran los resultados de la electroforesis, donde se observa en el gel de agarosa los perfiles de bandas de las muestras trabajadas.

En el gel podemos observar en primer lugar como la intensidad de las bandas disminuyen a medida que el tiempo transcurre.

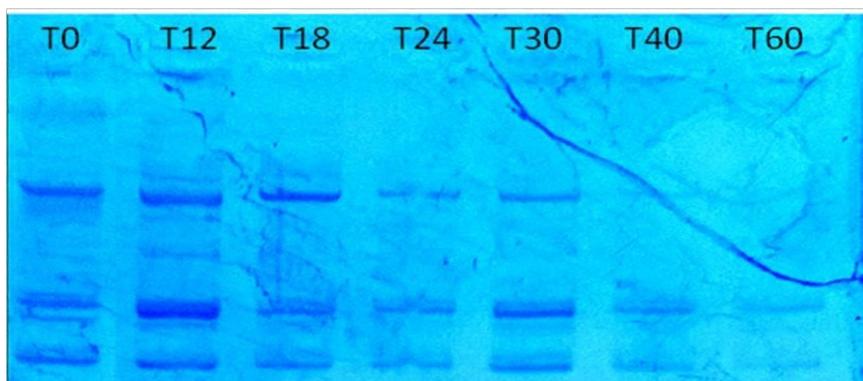


Figura 3. Gel de agarosa 1,5 %, ERIC-PCR.
Referencias: tiempo 0, 12, 18, 24, 30, 40, 60 segundos.

Por otra parte se visualiza que las bandas de mayor peso molecular van desapareciendo con el tiempo. A los 12 segundos (T12) se observa una banda que no se encuentra al tiempo 0, ni en los tiempos subsiguientes.

CONCLUSIONES

Este trabajo deja claro que el método de desinfección con luz UV-C es altamente eficiente contra *Escherichia coli*, ya que en el transcurso de solo 14 segundos se obtuvo una disminución de la concentración de microorganismos del 99,99%.

La técnica utilizada para evidenciar el daño producido al ADN por la luz UV es apropiado ya que muestra, en esta instancia en forma cualitativa, los cambios graduales en esta molécula ante el ataque del agente físico empleado.

Se manifiesta el daño al ADN en las bandas de mayor peso molecular que van desapareciendo quedando como resultado solo las bandas con menor peso (muestras a los 40 y 60 segundos).

La banda extra que aparece a los 12 segundos podría deberse a un estadio intermedio en el proceso de deterioro del ADN.

Estos resultados demuestran que la técnica de PCR escogida es la adecuada y son alentadores para mejorar aún más la técnica, agregando un proceso de purificación del ADN, para así poder obtener resultados más rigurosos y poder cuantificar por densitometría de las bandas el daño progresivo al ADN.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Tarrán, E. P., 2002. Desinfección por luz ultravioleta. *Revista Agua Latinoamérica*, 2, 28-35.

Tobes R, Pareja E, 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*; 7: 62.

Versalovic, J., Koeuth, T., y Lupski, R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24) 6823-6831.

Wilson, L. A., y Sharp, P. M., 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular biology and evolution*, 23(6), 1156-1168.

Woo, Y.T., Lai, D., McLain, J.M., Manibusan, M.K., Dellarco, V. 2002. Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products *Environmental Health Perspectives* 110: 75-87.