

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctora en Ciencias Biológicas

**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**

Director de Tesis: Marisol D. Labas

Co-director de Tesis: Rodolfo J. Brandi

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para  
la Industria Química (UNL-CONICET)

**-2020-**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a los cuales agradezco todo lo que soy y me brindaron durante el tiempo que estuvieron conmigo y lo que continúan enseñándome con su ausencia. A ellos, dedico este trabajo, por su profundo amor y su absoluta certeza de que siempre podría lograr todo lo que me propusiera, su confianza y fe en mi es lo que me impulsó e impulsa hacia adelante. Siempre los mantendré presentes en mi vida a través de su recuerdo.

A mi hermano, por ser mi compañero incondicional y estar a mi lado enfrentando todo juntos.

A mis abuelos, Gloria y Juan, porque tengo mucha suerte de tenerlos y que sean mis segundos padres, por su resiliencia y amor. A mi familia, tíos, primos y amigos (también mi familia, los nuevos y los de antes) por el apoyo y comprensión durante este camino.

A mis directores Marisol Labas y Rodolfo Brandi por brindarme la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo, por recibirme con calidez, brindarme su tiempo de trabajo, soporte profesional, dedicación y apoyo constante durante todo el trabajo de tesis.

A mi compañera y amiga Marina por su ayuda durante todos estos años tanto en lo profesional como en lo personal desde el primer día.

A Fabián Zalazar, Fabián Tedeschi y Pamela Bucci de la Cátedra de Prácticas Profesionales de la carrera de Bioquímica, perteneciente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme un espacio de trabajo siempre muy agradable, soporte profesional y por recibirme con los brazos abiertos desde el primer momento.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme el espacio académico e institucional para poder realizar esta tesis Doctoral.

Al personal del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) y del CCT CONICET Santa Fe.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Litoral (UNL) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el apoyo financiero.

## PUBLICACIONES

- **M. Cristiani, M. J. Flores, R. J. Brandi, F. A. Tedeschi, F. E. Zalazar, M. D. Labas,** (2020). ERIC-PCR technique applied to monitoring and quantification of DNA damage during water disinfection process. *Photochemistry and photobiology*. 202 (2020) 111699. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111699> (publicado-disponible online). (índice de impacto = 4,067; Q1 en subtema de radiación, Simago)

**INDICE**

<b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b> .....	<b><u>2</u></b>
<b><u>PUBLICACIONES</u></b> .....	<b><u>3</u></b>
<b><u>RESUMEN</u></b> .....	<b><u>9</u></b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	<b><u>12</u></b>
<b><u>INTRODUCCION GENERAL</u></b> .....	<b><u>14</u></b>
<b>AGUA Y SOCIEDAD</b> .....	<b>14</b>
<b>MICROBIOLOGIA DEL AGUA</b> .....	<b>14</b>
<b>PROCESO DE POTABILIZACION DEL AGUA DE CONSUMO</b> .....	<b>16</b>
DESINFECCION MEDIANTE CLORACION .....	18
PROCESOS DE DESINFECCION DE AGUA ALTERNATIVOS AL CLORO .....	19
<b>EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PROCESOS DESINFECCION</b> .....	<b>20</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b><u>23</u></b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b><u>CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC</u></b> .....	<b><u>25</u></b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>25</b>
RADIACION ULTRAVIOLETA .....	25
LAMPARA DE BAJA PRESION DE VAPOR DE MERCURIO .....	26
REACCIONES FOTOQUIMICAS.....	29
ACCION MICROBICIDA DE LA LUZ UV .....	29

ESTRUCTURA DE LOSACIDOS NUCLEICOS.....	30
DAÑO FOTOQUIMICO DEL ADN Y ARN .....	31
DETECCION DEL DAÑO POR UVC CON METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	33
TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	35
DISEÑO DE REACTORES FOTOQUIMICOS .....	39
CAMPO DE RADIACION .....	39
DEFINICION DE LA INTENSIDAD DE RADIACION .....	40
LA ECUACION GENERAL DE TRANSPORTE DE FOTONES.....	42
MODELADO DE PROCESOS DE DESINFECCION.....	42
LA CONDICION DE CONTORNO.....	44
EXPRESION DE LA L.V.R.P.A UTILIZANDO UN MODELO DE EMISION.....	47
FACTORES QUE AFECTAN LA DESINFECCION EFICAZ CON UV.....	48
AVANCES EN EL DESARROLLO DE LA TECNOLOGIA UV EN DESINFECCION DE AGUA .....	50
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>51</b>
MICROORGANISMOS.....	51
<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	51
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	56
ACTIVACION DE LOS INOCULOS BACTERIANOS.....	60
REACTIVOS .....	60
DISPOSITIVO EXPERIMENTAL .....	61
CORRIDAS EXPERIMENTALES.....	61
PREPARACION DEL INOCULO INICIAL .....	61
ENSAYOS CON UV .....	62
TOMA DE MUESTRA.....	63
RECuento DE MICROORGANISMOS VIABLES.....	63
MODELADO CINETICO DE REACTORES.....	63
MODELOS CINETICOS DE DESINFECCION .....	63
INDICE DE INACTIVACION (IINAC).....	64
ANALISIS MOLECULAR.....	64

---

REACCION DE ERIC-PCR.....	64
CALCULO DEL INDICE DE DAÑO DEL DNA (IDADN) .....	65
RELACION ENTRE INDICES: SUSCEPTIBILIDAD DEL ADN.....	67
ANALISIS ESTADISTICO .....	67
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>68</b>
INACTIVACION DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	68
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	69
ANALISIS DE RESULTADOS PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	70
CALCULO DEL INDICE DE DAÑO AL ADN (IDADN).....	70
INACTIVACION DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	78
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	79
ANALISIS DE RESULTADOS PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	80
CALCULO DEL INDICE DE DAÑO AL ADN (IDADN).....	80
ANALISIS COMPARATIVO ENTRE <i>ESCHERICHIA. COLI</i> Y <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	87
<b>CONCLUSION PARCIAL .....</b>	<b>90</b>
<b><u>CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO .....</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>92</b>
DESINFECTANTES QUIMICOS.....	92
ACIDO PERACETICO .....	95
QUIMICA Y MECANISMO DE DESINFECCION.....	96
ACCION BIOCIDA DEL APA .....	98
VENTAJAS DE LA UTILIZACION DEL ACIDO PERACETICO COMO DESINFECTANTE .....	100
AVANCES EN EL DESARROLLO DE LA DESINFECCION DE AGUA MEDIANTE ACIDO PERACATICO .....	100
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>102</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>102</b>
MICROORGANISMOS .....	102
REACTIVOS .....	102
DISPOSITIVO EXPERIMENTAL .....	103

ENSAYOS EXPERIMENTALES .....	103
PREPARACION DEL INOCULO.....	103
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE APA COMERCIAL .....	103
PROCEDIMIENTO PARA OBTENER EL TITULO DE LA SOLUCION DE APA COMERCIAL AL 15% .....	104
PREPARACION DE LA SOLUCION DE TRABAJO PARA EL REACTOR.....	106
TOMA DE MUESTRA.....	106
RECuento DE MICROORGANISMOS VIABLES.....	107
INDICE DE INACTIVACION .....	107
ANALISIS MOLECULAR.....	107
ANALISIS DE DAÑO A PROTEINA MEDIANTE SDS-PAGE .....	107
PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA .....	108
ENSAYOS AGUDOS DE TOXICIDAD A 48 HS CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	109
PROCEDIMIENTO .....	109
ANALISIS ESTADISTICOS .....	110
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>110</b>
INACTIVACION DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	110
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	112
ANALISIS DEL DAÑO A PROTEINA EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	113
INACTIVACION DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	114
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	116
RESULTADOS PRUEBAS DE TOXICIDAD CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	118
ANALISIS COMPARATIVO ENTRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> . .....	118
<b>CONCLUSION PARCIAL .....</b>	<b>121</b>
<b><u>CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN</u></b>	
<b><u>COMBINACION CON RADIACION UVC.....</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>123</b>
DESINFECCION DEL AGUA MEDIANTE PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACION.....	123
PROCESOS FOTOQUIMICOS.....	124

---

OXIDACIONES FOTOINICIADAS .....	125
PROCESO APA/UV .....	127
AVANCES EN EL USO DE LA COMBINACION APA/UV .....	128
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>129</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>129</b>
MATERIALES Y DISPOSITIVO UTILIZADOS .....	129
ENSAYOS EXPERIMENTALES Y TECNICAS ANALITICAS .....	130
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>131</b>
INACTIVACION DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	131
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	132
ANALISIS DE RESULTADOS PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	134
INACTIVACION DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	141
ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	143
ANALISIS COMPARATIVO ENTRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	145
<b>CONCLUSION PARCIAL .....</b>	<b>146</b>
<b><u>CONCLUSIONES FINALES</u> .....</b>	<b><u>148</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u>.....</b>	<b><u>151</u></b>



## 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

Water disinfection is a primordial subject for preserving the health and wellness of living beings. For years, science is focused on the application of alternative technologies in order to avoid the use of chlorine due to the well-known formation of toxic byproducts that affect humans and animals. Some alternative disinfection methods are AOPs (advanced oxidation processes) such as UVC radiation application, peracetic acid (PAA) and the combination of both agents. It has been proven that these AOPs technologies are highly efficient for water disinfection and harmful disinfection byproducts are not generated within.

In recent years, the application and understanding of these new technologies were followed by the need to attain a deeper and more complex analysis of the disinfection process being carried out. This new approach pretends not only relying the standard analysis of the plate count of culturable microorganisms in plate but also go further and studying the target points for each disinfectant within the microbial cell.

This is the framework for this thesis: the search of molecular biology techniques that allow us to determinate the molecular damage produced by the employed disinfection agents. This gives us the power to, through them, follow the process in a much more efficient and specific manner for each disinfection agent. In order to achieve this aim, the experimental part of this work was done in an annular batch reactor with a germicide UV lamp along the axis. Essays were carried out using three different disinfection processes: (i) UVC Radiation, with three different radiation intensities; (ii) Peracetic Acid (PAA) as a disinfectant agent in different concentrations; and (iii) the combination PAA/UV, where the maximal incident radiation was used along with four different acid concentrations. The microorganisms used to conduct these studies were *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. While working with UVC, either on its own or combined with PAA, microorganisms were added with the lamp off, and after homogenization time, a sample at the initial time was taken and then the lamp was turned on and samples were taken at different exposition times. For the PAA essays, a similar procedure was followed but the UV lamp was off during the whole duration of the essays. Afterward, samples were inoculated in solid culture media (EMB y Cetrimide) for determining the concentration of viable microorganisms. For each sample,

DNA extraction was done for its evaluation through ERIC-PCR. Also, for PAA samples, the SDS-PAGE technique was used to determine changes in the membrane proteins.

Every single one of the disinfection processes employed (UVC, PAA, and PAA/UV) was highly effective, requiring short contact times for an inactivation or disinfection of 99.99%.

The application of the ERIC-PCR technique was successful as a tool for the detection, assessment, and monitoring of DNA damage produced by UVC radiation. In this manner, a DNA damage index was defined (IDADN), which was correlated with the inactivation index (IINAC) showing a strong linear relationship between them. This linear relationship was consistent throughout all essays where UVC radiation was used. From these results, a proportionality factor was defined for the calculation of each index from the other. This represents a novelty and has important practical applications, allowing us to survey the disinfection process either by plate count or by DNA amplification using the primer Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) for essays employing UV.

Higher global efficiency was achieved for essays using PAA/UV and *E. coli* over essays where both agents were used on their own. On top of that, a simple kinetics model was developed to represent the disinfection process. The calculated parameters allowed to determine how the global process is affected by PAA concentration, and, in this manner, the synergy between agents was quantified. The negative effect of PAA in terms of DNA damage for PAA/UV essays over UVC essays was also quantified.

For *P. aeruginosa*, the addition of PAA caused the predominant effect to be the attack of free radicals formed during the advanced oxidation process because damage to DNA was almost null. Also, the calculation of kinetics parameters showed no synergic effect between the agents.

In conclusion, it is possible to affirm that this thesis achieved to develop methodologies for the quantification of molecular-level damage by means of a molecular biology technique (ERIC-PCR) during the performed disinfection processes. The proposed methodology, through the calculation of different parameters, gives enough information to establish simplified kinetic models that allow determining what happens during the disinfection processes at a specific molecular target.

## INTRODUCCION GENERAL

### AGUA Y SOCIEDAD

Hace unos diez mil años, la humanidad transformó su estilo de vida nómada, hacia otro agrario y sedentario. Esto propició el rápido crecimiento de centros urbanos. Antes de los asentamientos, se estima que las enfermedades transmitidas por el agua eran escasas debido a un sistema natural de defensa, basado en el rechazo al agua con malas características organolépticas como mal olor y sabor. Con el advenimiento de los asentamientos, el agua y su manejo pasaron a ser un tema de gran preocupación para los pequeños poblados que, con el pasar del tiempo, fueron formando aldeas, ciudades y finalmente estados.

Durante el siglo XIX, tras el estallido de la industrialización, y el consecuente desarrollo demográfico de las ciudades, producto de la migración de las personas desde las zonas rurales en busca de trabajo, comenzaron a gestarse graves problemas de saneamiento en las mismas. En esta época, finalmente se asoció al agua con enfermedades como: cólera, disentería, fiebre tifoidea y diarreas. A partir de estos hechos, la evaluación sensorial del agua se complementó con análisis químicos y microbiológicos. De este modo, a principios de siglo XX se comenzó a utilizar la cloración y los pasos de cribado del agua, lo que allanó el camino para eliminar los problemas de salud pública causados por la misma. Esta situación persistió hasta que a finales del siglo XX los peligros biológicos, surgidos del mal manejo del agua, volvieron al mundo occidental post moderno [1–3].

En la actualidad, cerca de 1.000 niños mueren todos los días a causa de enfermedades diarreicas asociadas con agua potable contaminada, saneamiento deficiente o malas prácticas de higiene. En total, 748 millones de personas en todo el mundo siguen teniendo serios problemas para acceder al agua [4].

### MICROBIOLOGIA DEL AGUA

Los microorganismos acuáticos juegan un rol fundamental en lo que respecta a la calidad del agua. En las fuentes naturales de agua podemos encontrar organismos como algas, artrópodos, rotíferos, briozoos, protozoos, hongos y bacterias. El fito y zooplancton, conjuntamente con los microorganismos que forman la microbiota del agua, son importantes para mantener el balance de su sistema ecológico. Algunas bacterias, al igual que las algas, son fotosintéticas siendo la base de la cadena alimenticia, mientras que las

## INTRODUCCION GENERAL

---

bacterias heterótrofas y hongos son los encargados de la descomposición de la materia orgánica. El conjunto de interacciones entre estos organismos mantiene el equilibrio del ecosistema acuático y es uno de los más importantes en cuanto a metabolismo y biomasa.

La presencia de las poblaciones humanas cerca de las fuentes de agua conlleva al inminente riesgo de contaminación y consecuente alteración del equilibrio natural de la microbiota presente en ella. Debido al vertimiento de aguas servidas y basura se incorporan microorganismos exógenos que en su mayoría son patógenos y de origen fecal tanto humano como animal.

La mayor parte de los patógenos presentes en el agua son causantes de problemas intestinales ya sean de origen bacteriano, parasitario o vírico. Otros, en cambio, producen problemas en otras partes del cuerpo como ser las meninges (meningitis), hígado (hepatitis) y el músculo del corazón (cardiopatías).

Las bacterias patógenas más comunes que se encuentran en el agua se muestran en la Tabla 1. Los géneros *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Helicobacter* son causantes principalmente de enfermedades gastrointestinales. Otras causan afecciones fuera del aparato digestivo como las bacterias del género *Leptospira* responsables de la enfermedad conocida como leptospirosis o *Legionella pneumophila*, que causa legionelosis, enfermedad que afecta los pulmones. Otra bacteria que no pertenece al grupo enterobacterias y genera problemas de salud como patógeno oportunista es *Pseudomonas aeruginosa*. Este microorganismo se puede aislar tanto de las fuentes de agua superficiales como de napas freáticas debido a su versatilidad metabólica. Es responsable de infecciones en vías urinarias, intestino, oído y heridas [5].

Las diarreas pueden ser causadas, además, por agentes patógenos como virus y parásitos que se encuentren contaminando el agua de bebida. Los rotavirus, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* son ejemplos de estos organismos. Los virus de la hepatitis A y E, causan problemas en el hígado, mientras que el virus Coxsackie B producen infecciones del músculo cardíaco que puede producir complicaciones y derivar, finalmente, en la necesidad de un trasplante de este órgano [6].

## INTRODUCCION GENERAL

Debido a los riesgos microbiológicos mencionados anteriormente, pero también a los físicos y químicos, el agua destinada al consumo de la población es tratada mediante procesos que evitan los riesgos de enfermedad para las personas. Esta serie de etapas a las que debe someterse el agua de bebida constituyen al proceso de potabilización que está fuertemente regulado en la gran mayoría de los países del mundo [7].

**Tabla 1.** Características de las enfermedades de origen bacteriano transmitidas por el agua. Modificado de Boyd, 2015 [6].

Enfermedad	Bacteria	Características
Cólera Salmonellosis	<i>Virio cholerae</i> <i>Salmonella sp.</i>	Diarrea severa, deshidratación, diarrea acuosa con calambres abdominales, náuseas, vómitos, fiebre y escalofríos.
Fiebre tifoidea	<i>Salmonella thyphi</i>	Fatiga, jaqueca, dolor abdominal, temperatura alta. Tiene una tasa de muerte del 4%.
Gastroenteritis o campylobacteriosis	<i>Campylobacterjejuni</i>	Diarrea acuosa a menudo con calambres abdominales, vómito, fiebre y escalofríos.
Disentería o shigellosis	<i>Shigella sp.</i>	Diarrea sanguinolenta, calambres abdominales, dolor rectal. La especie más virulenta, <i>S. dysenteriae</i> , produce una toxina que causa síndrome urémico hemolítico.
Colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Condición severa y sistémica que afecta principalmente a niños menores de 10 años.
Leptospirosis	<i>Leptospira spp.</i>	Fiebre, infección renal, puede generar insuficiencia renal. En ocasiones se producen hemorragias internas, incluyendo hemorragias pulmonares
Legionellosis	<i>Legionella pneumophila</i>	Neumonía aguda, fiebre alta, dolor de cabeza, tos, algo de esputo.
Úlcera péptica y cáncer gástrico	<i>Helicobacter pylori</i>	Irritación o perforación en el revestimiento del estómago. Cáncer
Infecciones en vías urinarias, oído y heridas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Las infecciones pueden ser leves (externas) o producirse enfermedades graves potencialmente mortales cuando afecta el interior del organismo.

#### PROCESO DE POTABILIZACION DEL AGUA DE CONSUMO

El Código Alimentario Argentino (CAA) [8] define como “agua potable de suministro público y agua potable de uso domiciliario a aquella que es apta para la alimentación y uso doméstico. La misma no debe contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que resulten peligrosos para la salud.



## INTRODUCCION GENERAL

Deberá presentar sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente”.

El proceso de tratamiento de agua cuenta con los pasos detallados en la Figura 1. Esta sucesión de pasos tiene el propósito de eliminar los agentes contaminantes que puedan existir en el agua ya sean de origen físico, químico o biológico. El último paso, el de la desinfección, cumple la función de eliminar a los agentes biológicos que puedan haber quedado en el agua una vez realizados todos los procesos de eliminación físicos y químicos (determinadas desde las etapas de cribado hasta la de filtración) [9].

El término desinfección se utiliza para describir al proceso de extracción, desactivación o eliminación de los microorganismos patógenos que existen en el agua. La efectividad de la desinfección depende del tiempo de contacto entre los microorganismos y el agente desinfectante, del pH, temperatura, concentración, naturaleza y calidad del agua a tratar, y de los tipos de microorganismos presentes. Los agentes químicos más utilizados para la desinfección son el cloro, el bromo, el yodo, el ozono, el permanganato de potasio, el peróxido de hidrógeno y los iones metálicos. Las etapas anteriores como la coagulación-floculación, sedimentación, filtración, son barreras físicas que van disminuyendo la carga microbiana. Otros métodos físicos de desinfección son el calor y la radiación UV [9].

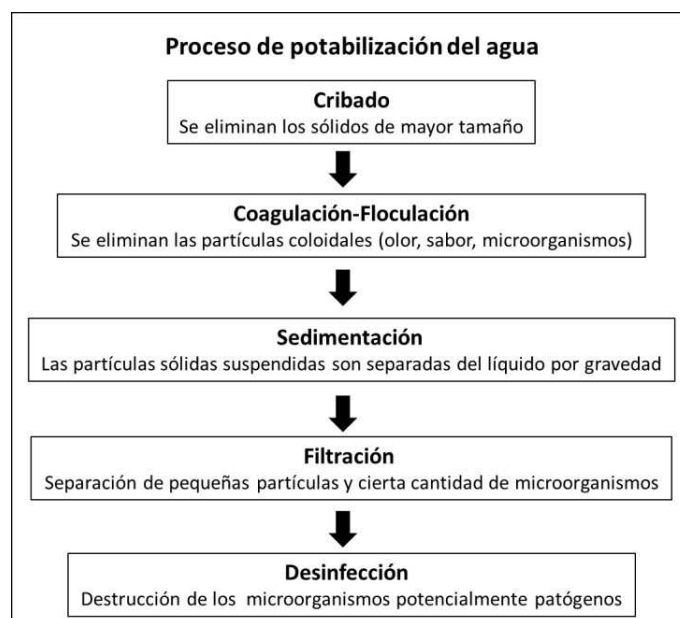


Figura 1. Esquema representativo del proceso convencional de potabilización de agua.

#### DESINFECCION MEDIANTE CLORACION

---

El agente desinfectante normalmente utilizado en América Latina y en la mayoría de los países en desarrollo es el cloro, que continúa desempeñando una función primordial en la reducción y el control de enfermedades que hoy día siguen siendo una preocupación en muchos países [10].

El cloro es un agente químico muy versátil, se puede utilizar en forma de gas, líquido o sal (hipoclorito de sodio). Es de fácil aplicación y manejo, además de presentar un bajo costo [9].

A pesar de todos los beneficios de la aplicación de cloro para los ciudadanos de gran parte del mundo, en el año 1974 se detectó por primera vez la presencia de múltiples sustancias halogenadas en el agua de bebida, como subproducto del proceso de desinfección con cloro. Hasta ese momento se creía que la cloración era un proceso totalmente inocuo para la salud de las personas que permitía eliminar eficientemente los microorganismos patógenos del agua, sin efectos secundarios para la salud [11]. Los productos de la desinfección (PDD) son formados por la reacción de los desinfectantes con materia orgánica, iodo y bromo [12]. Entre los productos encontrados se destaca una familia de compuesto de carbono simple y halógeno sustituido conocido como trihalometanos (THMs).

Los THMs más predominantes son el cloroformo y el bromodiclorometano; con frecuencia también se encuentran el dibromoclorometano y el bromoformo. La concentración de THMs depende de la presencia de precursores (compuestos activos que pueden reaccionar con el cloro), así como de la dosis de cloro, tiempo de contacto, temperatura del agua y pH. En estudios efectuados en animales, se ha descubierto que el cloroformo en altas dosis es cancerígeno y que los otros THMs son mutagénicos. Se ha comprobado, además, que causan daños al hígado, riñones y sistema nervioso central [13]. En los últimos años se publicaron nuevos estudios en los cuales se descubrió una asociación entre defectos cardíacos de nacimiento con PDD específicos. El bromoformo, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético y los cinco ácidos haloacéticos regulados (HAA5: cloro, bromo, dicloro, dibromo y ácido tricloroacético) fueron todos asociados con diferentes tipos de defectos cardíacos de nacimiento [12,14].

## INTRODUCCION GENERAL

---

Además del riesgo químico que se deriva de una mala desinfección con cloro existen riesgos microbiológicos. Pablos y col, 2011 y Lin y col., 2017 , demostraron que, en el agua potable tratada con cloro, persisten bacterias de los géneros *Helicobacter pylori* [15] y *Escherichia coli* [16], en un estado no cultivable, pero viables y potencialmente infecciosas. Por otra parte, existen trabajos que indican que especies de parásitos como son *Cryptosporidium spp.* y *Giardia lamblia* atraviesan con relativa facilidad las barreras que le impone el proceso de potabilización convencional (cloración, filtración a través de lecho profundo, filtración a través de carbón activado, filtración por cartucho, suavización y ozonificación del agua). Esto ocasiona un problema de salud pública que genera una alta tasa de morbilidad y mortalidad, debido principalmente a la ausencia de tratamiento efectivo contra las enfermedades causadas, principalmente por especies de *Cryptosporidium* [17].

La potabilización del agua es un proceso muy importante para conservar la salud pública, pero debe hacerse de tal forma que el mismo proceso no introduzca riesgos adicionales por el uso inadecuado de los productos químicos dosificados. Por lo tanto, los productos químicos y procesos utilizados para tal fin deben estar sometidos a constante vigilancia y actualización [18].

---

### PROCESOS DE DESINFECCION DE AGUA ALTERNATIVOS AL CLORO

La creciente demanda de la sociedad para la descontaminación de aguas contaminadas de diversos orígenes, materializada en regulaciones cada vez más estrictas, ha impulsado, en la última década, al desarrollo de nuevas tecnologías de purificación. Cada vez más crecientemente, se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs, PAOs), muy poco aplicados y, peor aún, menos difundidos en los países de economías emergentes como los de América Latina. La mayoría de las PAOs puede aplicarse a la remediación y destoxificación de aguas especiales, generalmente en pequeña o mediana escala. Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos o con métodos convencionales, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos. Permiten incluso la desinfección por inactivación de bacterias y virus [19–21].

## INTRODUCCION GENERAL

---

El concepto de PAOs fue inicialmente establecido por Glaze y col., 1987. [20,22,23], quienes los definieron como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo (HO•). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica.

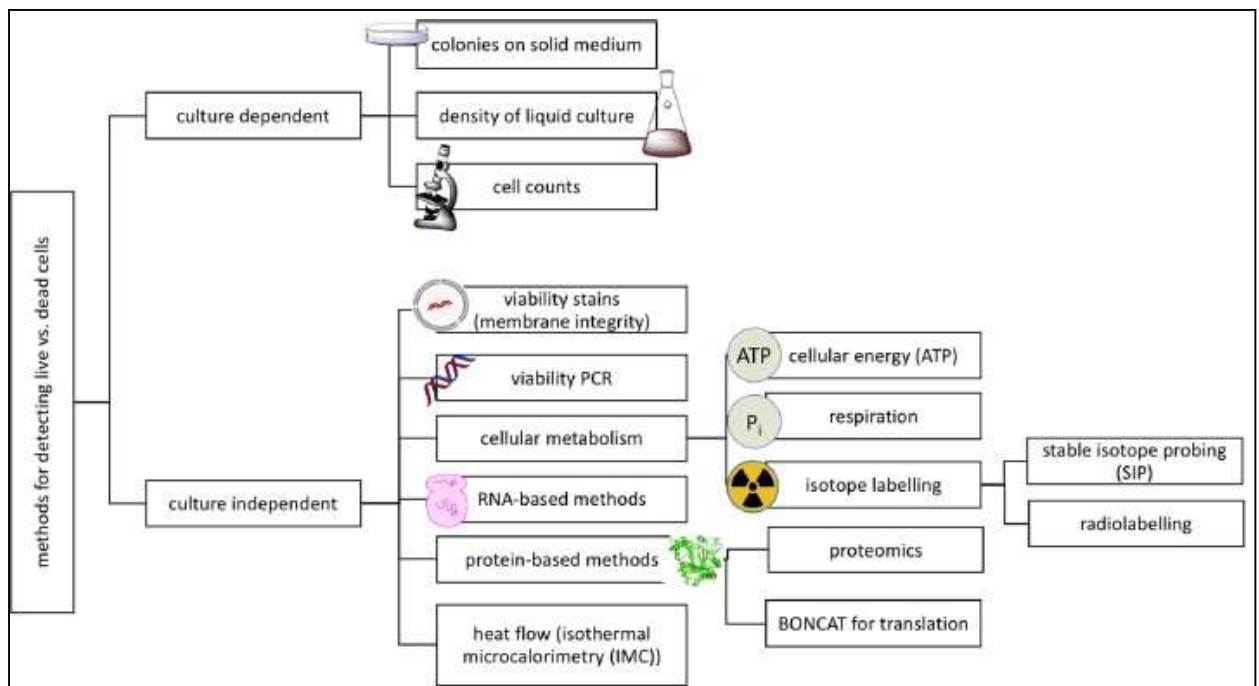
Los procesos de oxidación avanzada pueden generarse utilizando, por ejemplo, UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno), UV + O<sub>3</sub> (ozono) y UV + TiO<sub>2</sub> (dióxido de titanio), entre otros.

### EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PROCESOS DESINFECCION

La efectividad germicida de los procesos de desinfección se puede monitorear midiendo bacterias indicadoras usando técnicas tradicionales de recuento en placas. Desde el comienzo de la microbiología, se han utilizado métodos basados en cultivos para evaluar la viabilidad. Sin embargo, las bacterias que crecen en cultivos tradicionales pueden perder su capacidad de crecer en la superficie del agar después de la exposición a los agentes desinfectantes a pesar de mantener su viabilidad y capacidad infecciosa [24,25]. En consecuencia, los métodos estándar basados en el cultivo no pueden reflejar la eficiencia de la desinfección a nivel molecular de toda la población afectada.

Generalmente se acepta (pero no es una regla universal) que una célula debe estar intacta, capaz de reproducirse y metabólicamente activa para ser considerada viva, y diferentes evaluaciones de viabilidad están diseñadas para medir una o más de estas propiedades, ya sea directamente o por proxy. Estos llamados protocolos vivos / muertos típicamente abordan uno de los tres aspectos de la viabilidad microbiana: (1) la existencia de una membrana celular funcional intacta, (2) la presencia de metabolismo o energía celular, o (3) la presencia de ADN autoreplicante que se puede transcribir en ARN, que, si corresponde, se puede traducir posteriormente en proteína [25]. En la Figura 2 se muestra un esquema que resume las tecnologías que pueden ser aplicadas para analizar cada aspecto de viabilidad microbiana.

## INTRODUCCION GENERAL



**Figura 2.** Resumen conceptual de técnicas para la detección de los microorganismos vivos de los muertos independientes del cultivo. Modificado de Emerson y col, 2017 [25]

Estos métodos apuntan al estudio de los principales objetivos moleculares de los desinfectantes alternativos más utilizados: ADN cuando se utiliza UV, membrana y proteínas intracelulares que son el punto de ataque principal de los oxidantes (APA, peróxidos) y de los procesos avanzados de oxidación a través de radicales libres del oxígeno (APA/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV). Por lo tanto, se pueden emplear para hacer un seguimiento a través de las biomoléculas afectadas mediante herramientas de biología molecular. Nizri y col. 2017 [26], utilizaron la amplificación de genes del ADNr 16S para realizar el seguimiento del método de desinfección por UV, logrando plantear una relación directa entre el índice de inactivación de los microorganismos y el daño producido al ADN. Trombert y col. 2007 [27] pudieron determinar el daño producido al ADN mediante la amplificación del mismo por REP-PCR. Múltiples autores han utilizado técnicas que dependen de la amplificación del ADN (ARDRA, RAPD, qPCR, ESS, entre otras) para demostrar daño tanto de radiación UVC como UVB y hasta lograr su cuantificación [26,28–31]. La técnica epifluorescencia y citometría de flujo proporcionan información acerca de la integridad de la membrana celular al utilizar cromóforos que sólo pueden atravesar la membrana cuando se manifiesta gran nivel de daño [15,32,33].

## **INTRODUCCION GENERAL**

---

Todo lo expuesto anteriormente lleva a la realización de esta tesis Doctoral que se encuentra enfocada en el hallazgo de una herramienta molecular que pueda permitir el seguimiento del daño a través de las biomoléculas afectadas durante proceso de desinfección. Y una vez determinada dicha herramienta, proceder al manejo de los datos obtenidos para desarrollar un análisis cinético de los procesos que se llevan a cabo a nivel celular. Esto tiene como objetivo final, ser acoplado al recuento tradicional de microorganismos en placa. Por lo tanto, se describen a continuación los objetivos planteados a tal fin, los métodos utilizados para conseguirlos y los resultados alcanzados.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar procesos de desinfección de aguas para eliminar los diferentes microorganismos patógenos utilizando agentes oxidantes en combinación con radiación UV. Estudiar incluye la cuantificación de las alteraciones o daños en los componentes biológicos de los patógenos al utilizar técnicas de biología molecular, y modelar el sistema biológico y desarrollar los modelos cinéticos simplificados basados en el análisis de daños.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ➔ Desarrollar el modelado del sistema biológico, representando el mecanismo de desactivación / muerte de bacterias por medio de agentes de desinfección química y su combinación con radiación UV.
  
- ➔ Aplicar los distintos procesos sobre microorganismos que ofrecen diferente nivel de tolerancia a los agentes desinfectantes
  
- ➔ Cuantificar la forma y el grado en que se produce el daño sobre los microorganismos durante proceso de desactivación y/o muerte a través de técnicas de biología molecular.
  
- ➔ Realizar ensayos de toxicidad de los distintos desinfectantes con microcrustáceos u otros indicadores de toxicidad característicos de la región litoral argentina.

CAPITULO 1:

# ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC





## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

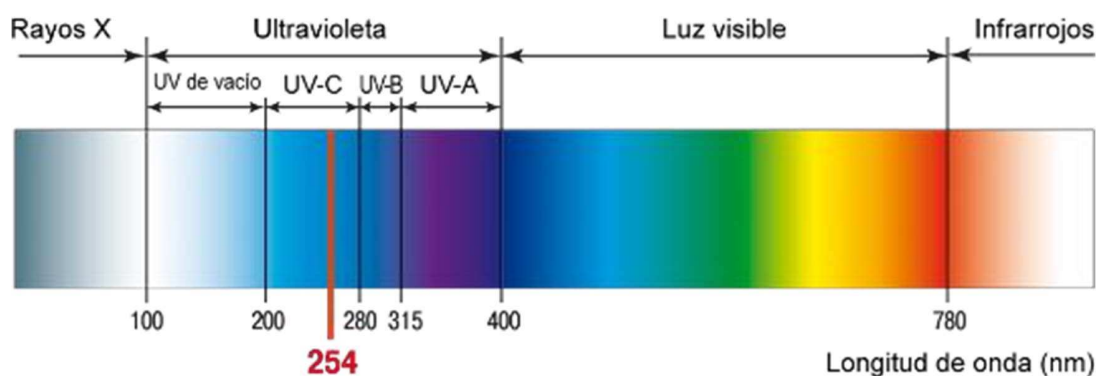
## INTRODUCCION

## RADIACION ULTRAVIOLETA

La historia de la radiación ultravioleta (UV) comenzó cuando un farmacéutico llamado Johann Ritter, en 1801, descubrió que el cloruro de plata se descomponía más eficientemente por los rayos invisibles que se encontraban más allá del violeta en el espectro electromagnético. A partir de 1900 la radiación UV comenzó a tener utilización clínica ya que se aplicó como tratamiento contra el *lupus vulgaris*. En 1904 Bernard y Morgan descubrieron que la intensidad de 250 nm era la más efectiva contra bacterias. Ese mismo año se fabricó la primera lámpara de vapor de mercurio en Alemania.

Desde aquellos primeros hallazgos la investigación sobre la radiación UV nunca cesó hasta nuestros días, donde la aplicación de esta radiación se encuentra regulada e implementada en muchos procesos de desinfección alrededor de todo el mundo [34].

La luz ultravioleta constituye la parte del espectro electromagnético comprendida entre las longitudes de onda que se encuentran entre los 100 y 400 nanómetros (nm) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del espectro electromagnético donde se encuentra marcada la longitud de onda a la que emiten las lámparas de bajo vapor de mercurio.

Esta región está dividida en cuatro sub-rangos relacionados con la sensibilidad de la piel humana a la luz UV. El rango UVA (315–400 nm) causa cambios en la piel que llevan al bronceado. El rango UVB (280–315 nm) puede causar quemaduras solares y eventualmente puede inducir cáncer de piel. El rango de UVC (200–280 nm) es absorbido por el ARN, el ADN y las proteínas y puede provocar mutaciones celulares, cáncer o muerte celular. En lo que respecta a los seres humanos, la radiación UVC debe tratarse con el cuidado adecuado. La UVC se absorbe fuertemente en la capa superficial de las células de la piel, la que se desprenden casi a diario. Por lo tanto, la exposición moderada puede ser tolerada. Sin embargo, la exposición de los rayos UVC de los ojos es más peligrosa porque puede causar la formación de cataratas [34].

---

#### LAMPARA DE BAJA PRESION DE VAPOR DE MERCURIO

Hay varios tipos de lámparas que emiten en la región UV y visible (Tabla 2). Las más importantes para la desinfección UV son las lámparas de descarga de gas. Estas tienen dos electrodos, usualmente uno en cada extremo de un tubo que contiene un gas, que puede llevar dentro átomos de metal (por ejemplo, mercurio) o un gas raro (por ejemplo, xenón). En tales lámparas, la emisión de luz surge de los electrones de los átomos que han sido excitados a estados de mayor energía por los electrones de alta energía emitidos por los electrodos. Hay varios tipos comunes de lámparas de descarga de gas. La gran mayoría de las lámparas utilizadas en los sistemas de desinfección UV son lámparas de vapor de mercurio. En estas, la corriente eléctrica que fluye a través del plasma caliente ionizado hace que los átomos de mercurio se eleven a estados de mayor energía o excitación. Cuando estos estados excitados vuelven a su estado fundamental, la luz UV es emitida [34].

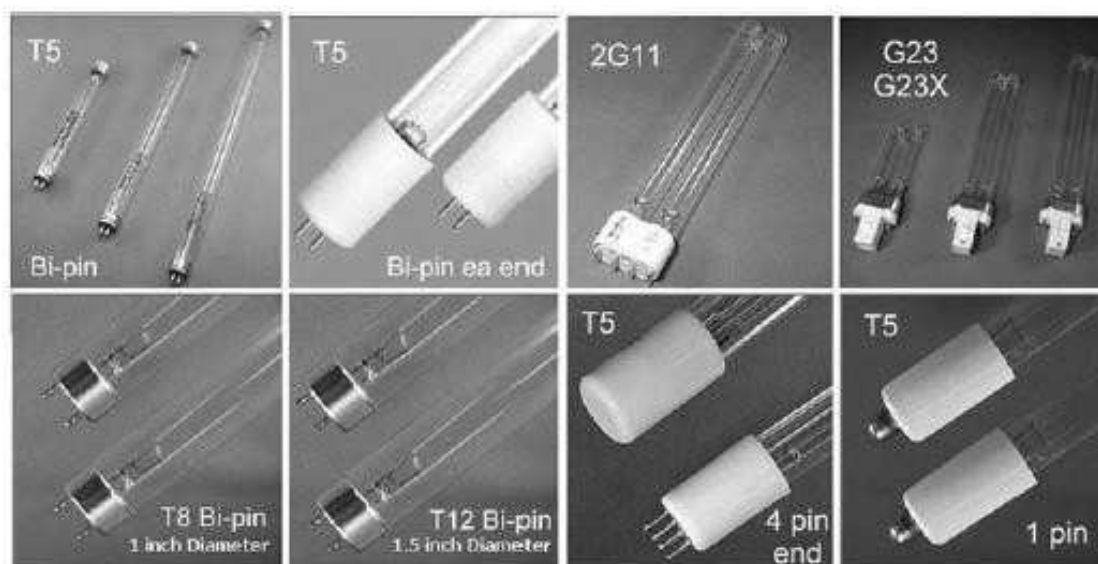
Las lámparas UV se comercializan en muchas formas, tamaños y niveles de potencia de salida de radiación, y pueden producir diferentes bandas espectrales de UV germicida (Figura 4). Todas las lámparas germicidas UV producirán longitudes de onda de luz de UVC (100–280 nm), UVB (280–320 nm), o ambas (UVC / UVB). Las longitudes de onda de UVA (320–400 nm) no son germicidas. Actualmente se utilizan varios tipos de lámparas UV para aplicaciones de desinfección, incluidas las lámparas UV de media presión (MP) estándar que producen longitudes de onda UVC / UVB de banda ancha, lámparas UV de baja presión

(LP) que producen longitudes de onda UVC de banda estrecha, lámparas UV de microondas, y diodos emisores de luz (LEDs) [35].

**Tabla 2.** Clasificación de lámparas UV. (modificado de Bolton y Cotton, 2011) [34]

Tipo de lámpara	Características	Rango de longitud de onda	Ejemplo
Lámparas de radiador de temperatura	Filamento caliente (ej. tungsteno) en un gas inerte	380-800 nm	Luz de lámpara incandescente
Lámparas de descarga de gas	Electrodos en los extremos de un tubo cilíndrico largo que contiene vapor de metal (ej. mercurio)	150-800 nm	Tubo fluorescente, lámparas de mercurio de baja y media presión
Diodos emisores de luz (LEDs)	Semiconductores en estado sólido que emiten luz cuando una corriente pasa a través de ellos	250-600nm	Luces indicadoras de equipamiento electrónico

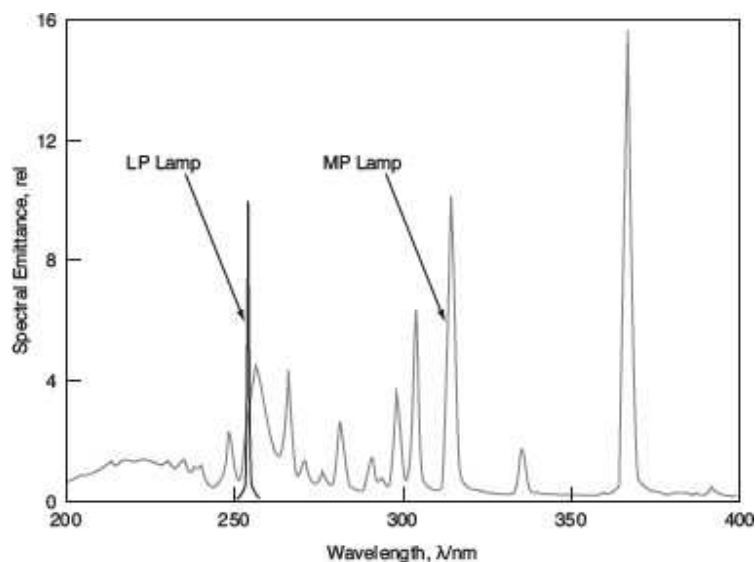
La lámpara UV es el componente principal de cualquier sistema de desinfección y debe cumplir con ciertos estándares y criterios de rendimiento, y actualmente hay una serie de pautas y estándares disponibles [35].



**Figura 4.** Diferentes tipos de lámparas UV (modificado de Kowalsi, 2009) [35].

La Figura 5 presenta una comparación de la salida espectral de las lámparas de arco de mercurio de baja y mediana presión.

Las lámparas de arco de mercurio de baja presión usadas en la desinfección de agua varían en longitud de 35 a 163 cm y tienen un diámetro entre 1.2 y 1.9 cm. Durante la fabricación de la lámpara, se introduce el mercurio en la misma, en la forma de una sola gota (50-100 mg Hg) en una lámpara de baja presión de 1.5 m [36]. Las lámparas están diseñadas para operar a su óptima eficiencia con una temperatura de 40°C en la pared de lámpara y una potencia de arco eléctrico cercana a 0.3 W.cm<sup>2</sup> [37]. Aproximadamente 85% de la luz emitida por una lámpara de baja presión es radiación UV resonante [36]. Las lámparas de arco de mercurio de mediana presión usadas en la desinfección de agua varían en longitud de 25 a 70 cm y tienen un diámetro de cerca de 2.2 cm. Debido a la alta temperatura del plasma dentro de la lámpara de mediana presión, el mercurio vaporizado se encuentra en varios estados de excitación. El paso de estos niveles de excitación a un nivel de energía menor da como resultado la liberación de luz con diferentes longitudes de onda. En consecuencia, la salida espectral de una lámpara de mediana presión consiste de numerosos picos con un continuo de UV por debajo de 400 nm (Figura 5).



**Figura 5.** Salida espectral de lámparas de arco de mercurio de baja (LP) y mediana presión (MP) (modificado de Bolton y Cotton, 2008) [21]

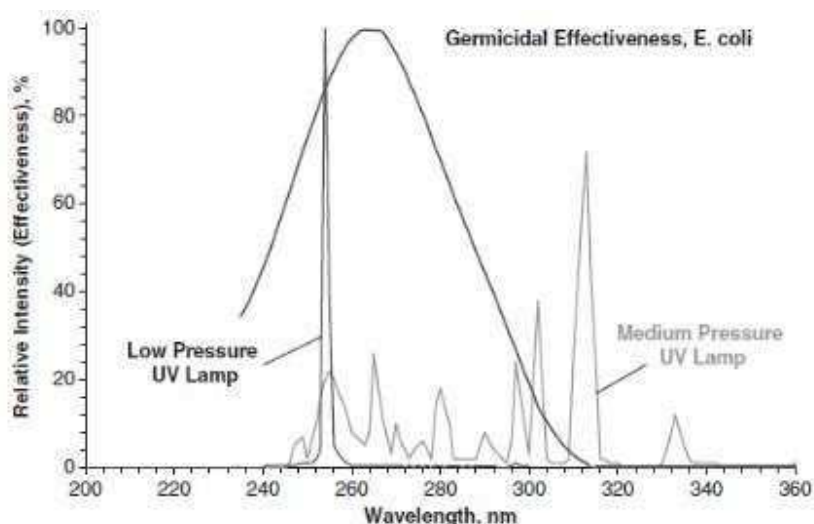
Si bien las lámparas de baja presión son eléctricamente más eficientes que las lámparas de mediana presión, estas últimas producen una potencia UV mayor por lámpara.

#### REACCIONES FOTOQUIMICAS

Una reacción fotoquímica es un proceso que se inicia por la absorción de radiación por una molécula. Como consecuencia, la molécula queda en un estado excitado de mayor energía y puede transformarse en una o más etapas en un producto o puede convertirse en un intermediario altamente reactivo que puede participar en otras reacciones de naturaleza térmica como sucede, por ejemplo, en las reacciones en cadena. El primer grupo de reacciones se llaman reacciones moleculares y el segundo, reacciones de radicales libres. A veces, la absorción de radiación puede ocurrir en una molécula particular pero los cambios definitivos (en ambos tipos de mecanismos) suceden en otras, como es el caso de las reacciones fotosensibilizadas y fotocatalíticas [38].

#### ACCION MICROBICIDA DE LA LUZ UV

La desinfección de microorganismos (virus, bacterias, hongos, algas y protozoarios) por medio de radiación ultravioleta (UV) afecta directamente el material genético ADN y ARN [37].



**Figura 6.** Efectividad germicida de las lámparas de media y baja presión de mercurio sobre células de la bacteria *Escherichia coli*, (modificado de Kowalski, 2009) [35].

En la Figura 6 se muestra el espectro de absorción de la bacteria *Escherichia coli*, frente a lámparas de media y baja presión de mercurio. En la figura, se puede observar cómo la radiación de la lámpara a baja presión de mercurio es la que desarrolla una emisión más cercana a la de inactivación de la cepa estudiada [35]. La lámpara de baja presión de mercurio emite un único pico a los 254 nm, ésta porción del espectro UV es donde el ADN tiene su máxima absorción.

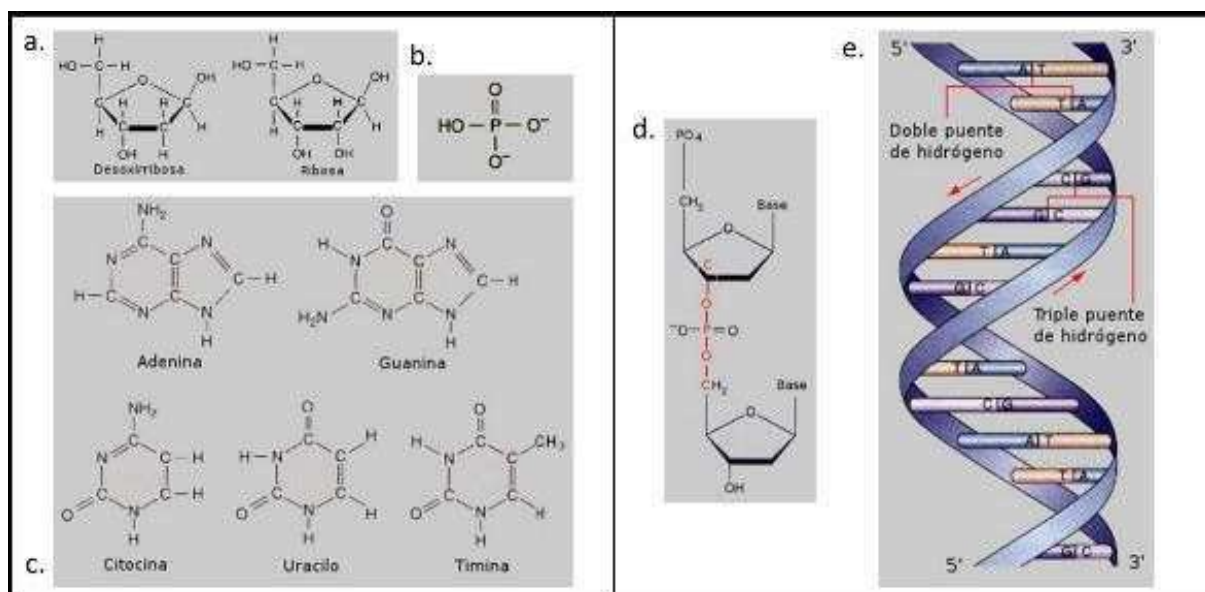
La dosificación de radiación ultravioleta requerida para destruir los microorganismos más comunes varía entre 6000 y 10000  $\mu\text{Ws.cm}^{-2}$ . Las normas para la dosificación de UV en diferentes países varían entre 16000 y 38000  $\mu\text{Ws.cm}^{-2}$  [17].

---

#### ESTRUCTURA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

La base estructural de los ácidos nucleicos son los nucleótidos, compuestos cíclicos que contienen nitrógeno (denominados bases porque en soluciones ácidas pueden combinarse con protones) está unido a una azúcar de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa) que también está unida a un grupo fosfato. Los anillos nitrogenados de los nucleótidos son semejantes entre sí, la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U), reciben el nombre de pirimidinas ya que todos derivan de un anillo de pirimidina hexagonal. Los nucleótidos restantes, la guanina (G) y la adenina (A), conforman el grupo de las purinas, compuestas por un segundo anillo pentamérico unido al anillo hexamérico (Figura 7).

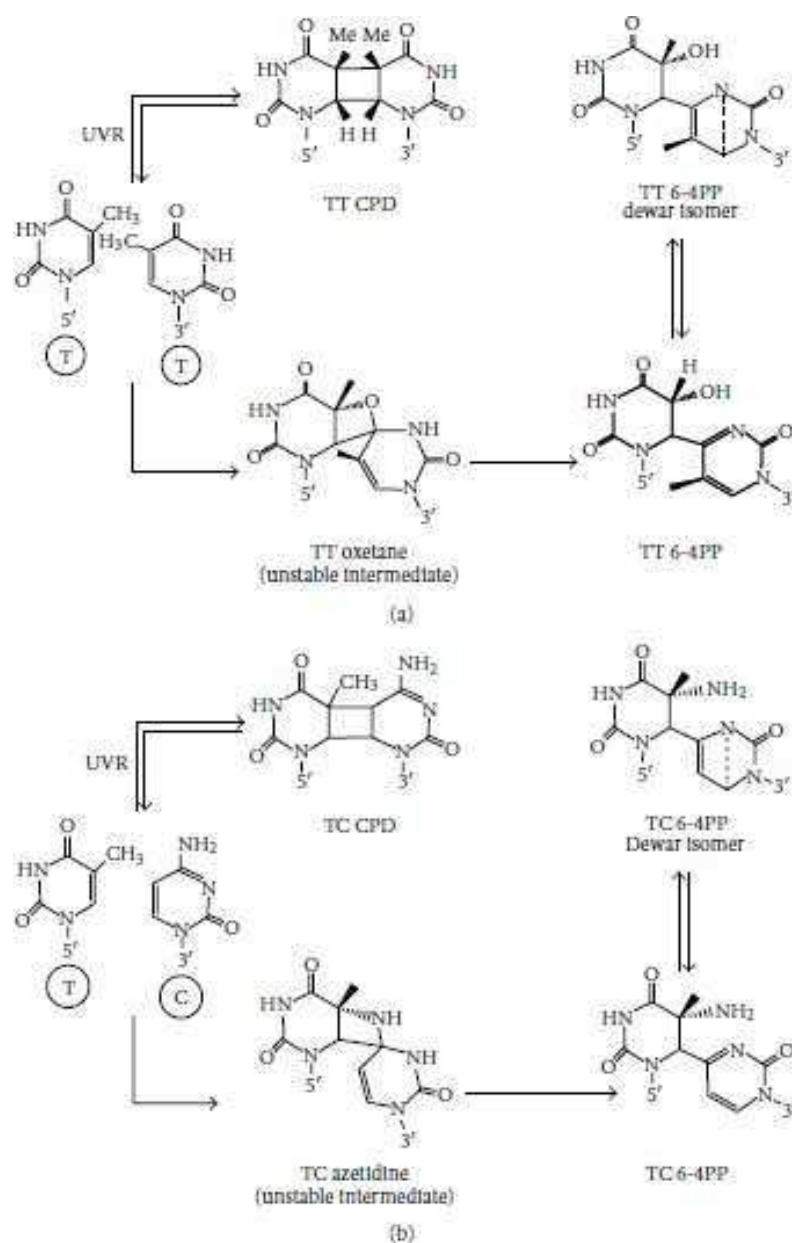
Una cadena de ADN es un largo polímero no ramificado, compuesto únicamente por cuatro subunidades, éstas son los desoxirribonucleótidos, que contienen las cuatro bases nitrogenadas guanina, citosina, timina y adenina. Los nucleótidos están unidos por enlaces covalentes fosfodiéster entre el carbono 5' de un grupo desoxirribosa y el carbono 3' del siguiente. El ADN está formado por dos cadenas dispuestas en forma helicoidal donde los grupos azúcares y fosfato se alinean en el exterior, mientras que las bases se encuentran en el centro muy cercanas una de otra. Las bases nitrogenadas del centro de la molécula se encuentran apareadas, pirimidinas con purinas, unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno de la siguiente manera: G-C y T-A (Figura 7.e) [39].



#### DAÑO FOTOQUIMICO DEL ADN Y ARN

La fotoexcitación UV al ADN crea bases de pirimidina fotoexcitadas y, en última instancia, lesiones en la doble cadena de ADN (Figura 8). Los estudios espectroscópicos a corto plazo y en estado estacionario han demostrado que, dependiendo de la conformación local de las bases de ADN entre sí en la doble hélice, se producen reacciones a diferentes productos fotoinducidos. La gran mayoría de las lesiones inducidas por los rayos UV se crean en los sitios pirimidina-pirimidina, lo que indica que la fotoexcitación está algo concentrada en esas posiciones. En condiciones estándar, la irradiación UV conduce a la formación de lesiones mutagénicas de dímero de pirimidina mediante un anillo ciclobutano (CPD) y fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP). Particularmente las lesiones más frecuentes son las de CPD que se forman en sitios 5'-TT-3', pero 5'-TC-3', 5'-CT-3' y 5'-CC-3' también son susceptibles a reaccionar, pero con menor eficiencia. En todos los casos, los fotoproductos son el resultado de una reacción de cicloadición [2p + 2p] que conduce a la formación de un anillo de ciclobutano, que representa un entrecruzamiento dentro de la cadena que conectan dos pirimidinas apiladas (consecutivas en la misma cadena). Las lesiones de CPD que contienen citosina son, por lo tanto, particularmente mutagénicas. Las lesiones T (CPD) T, T (CPD) U, U (CPD) T y U (CPD) U, finalmente obtenidas son productos estables, que

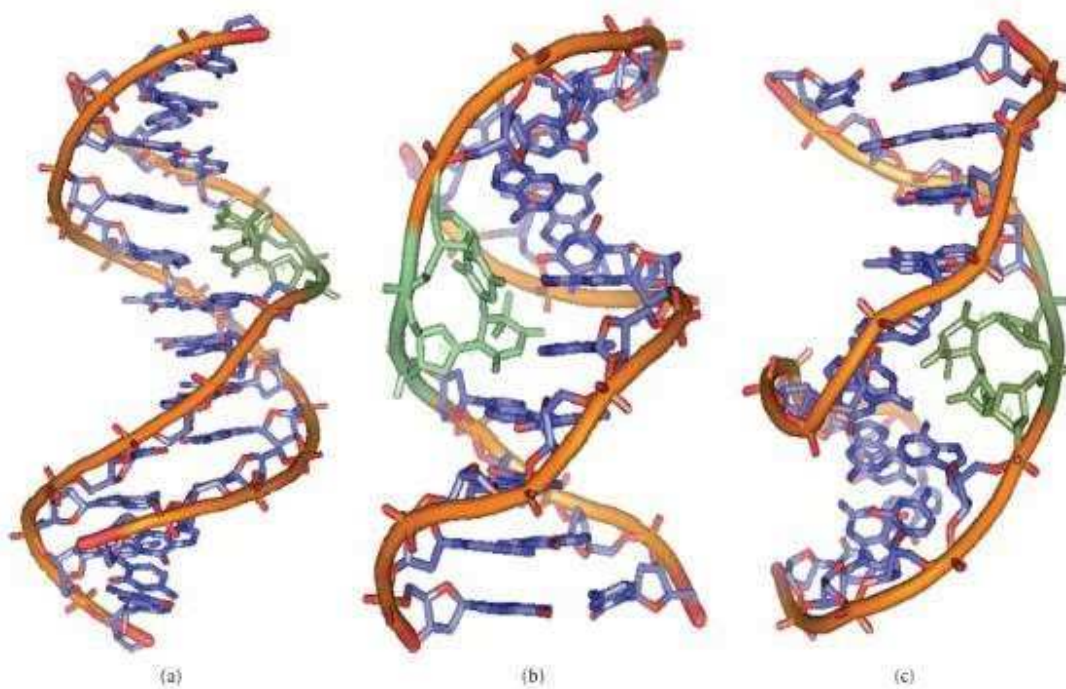
no experimentan más reacción. Pero si ocurre la replicación y la parte U se empareja con una A, da mutaciones de transición de C a T. Cuando las lesiones 6-4 son irradiadas nuevamente se forman los isómeros de Dewar, otro tipo de lesión que permanece en el ADN y se va acumulando [40].



**Figura 8.** Descripción de las lesiones fotoquímicas y caminos de reacción inducidos por radiación UVC en las bases nitrogenadas. (modificado de Rastogi y col., 2010) [41].



En resumen, la irradiación UV del ADN conduce a la formación de enlaces cruzados entre las pirimidinas de las cadenas opuestas y complementarias. Todas las lesiones inclinan el ADN en varios grados y causan una desestabilización local del mismo (Figura 9) [42,43]. Las lesiones poseen propiedades de emparejamiento de bases alteradas. Típicamente reducen o incluso bloquean la capacidad de las polimerasas para replicar y transcribir la molécula de ADN [44] [45,46].



**Figura 9.** Representación de las lesiones (en verde) que produce la radiación UVC a la molécula de ADN: (a) CPD; (b) 6-4PP y (c) dímero 6-4 de Dewar. (modificado de Rastogi y col 2010) [41]

---

#### DETECCION DEL DAÑO POR UVC CON METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Para el estudio de los procesos de desinfección y control de la calidad de agua, se utiliza tradicionalmente el recuento en placa de microorganismos cultivables. Esta técnica nos permite monitorear la capacidad de supervivencia de los microorganismos tratados en medios agarizados y el seguimiento de la cinética de los procesos de desinfección [47–49]. Pero, esta técnica, resulta inadecuada para poder observar el daño que los agentes utilizados provocan a las células afectadas. Además, se puede incurrir en una sobre o subestimación del fenómeno que está ocurriendo, existen afectaciones con daños sub-

CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

letales que permiten el desarrollo de las bacterias en las placas y, por lo contrario, bacterias que mantienen su viabilidad pero que son incapaces de reproducirse sobre la superficie de los medios de cultivos artificiales [50].

Para superar estas desventajas, varios autores utilizan diversas metodologías de biología molecular como las que se detallan en la Tabla 3. Para estudiar el daño específico producido hacia el ADN por la radiación UV se recurre principalmente a las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Tabla 3.** Varias estrategias de detección del daño al ADN. (modificado de Rastogi y col, 2010) [41]

Estrategias para la detección del daño al ADN	Tipos de lesiones detectadas
Ensayos basados en PCR (TDPCR, LMPCR, ICPCR, SINE)	Disminución de la actividad del templado, T<>T CPDs, 6-4PPs
Ensayo cometa	Daño oxidativo al ADN y ruptura de simple y doble cadena.
Ensayo Halo/AHA/FHA	Fragilidad de la cromatina/ruptura de simple cadena a nivel celular
Ensayo TUNEL	Ruptura de cadena simple y doble. Apoptosis
HPLC-MS/MS	Daño oxidativo del ADN; CPDs, 6-4PPs y sus respectivos dímeros balanceados de Dewar; 5-hdroxi-2-deoxiuridina, 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiadenosine; 5-metilcitosina y adenina
FISH	Cromosomas con aberraciones numéricas
FCM	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas, aductos de ADN y ruptura de cadenas de ADN
Etiquetado con anexina V	Condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, apoptosis inducida por radiación
Ensayo de inmuno dot blot	CPDs, 6-4PPs y sus isómeros balanceados de Dewar.
RIA	CPDs y 6-4pps
GC-MS	Ruptura de cadenas, bases modificadas, sitios básicos, entrecruzamientos de proteínas unidas a ADN y otros daños oxidativos hacia el ADN
FADU	Rupturas en Simple/doble cadenas y sitios lábiles alcalinos
Espectroscopia NMR	Lesiones que distorsionan la doble hélice de ADN.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TDPCR: PCR terminal transferasadeependiente; LMPCR: PCR mediada por ligación; ICPCR: inmono-acplada; SINE: elementos cortos dispersos en el ADN; AHA: ensalo halo alcalino; FHA: ensayo rápido de halo; TUNEL: desoxirribonucleotidil transferasa terminal mediada por el marcador de unión final de trifosfato de desoxiuridina; HPLC-MS / MS: cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem; FISH: hibridación fluorescente in situ; FCM: citometría de flujo; RIA: radioinmunoensayo; ELISA: ensayo inmunosorbente ligado a enzimas; GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas; RMN: espectroscopía de resonancia magnética nuclear

#### TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA ( PCR)

La técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue desarrollada por Mullis en 1986 [51] y se basa en la amplificación de millones de copias mediante la enzima conocida como ADN polimerasa de un fragmento específico de ADN, de tal manera que cantidades pequeñas de esta molécula pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación según lo expuesto anteriormente. Estas características son las que hacen posible que esta molécula de doble hélice pueda amplificarse *in vitro*. Sus cadenas están unidas entre sí por enlaces puente de hidrógeno que pueden separarse y volverse a unir mediante cambios en la temperatura, sin que la estructura base de cada cadena se vea modificada, de esta forma la enzima polimerasa puede entrar en contacto con las hebras para proceder a la formación de las copias.

Otro elemento crucial para que se lleve a cabo la reacción de amplificación es la enzima, la más usada se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas (tiene la capacidad de ser termoestable).

Los primers son otros elementos de la mezcla de reactivos para PCR, que se definen como secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).

Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores cruciales que contribuyen a la especificidad de

la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM.

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1:1. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado.

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM.

El ciclo de PCR esquematizado en la 10 consiste en tres etapas de variación de temperatura que se detallan a continuación:

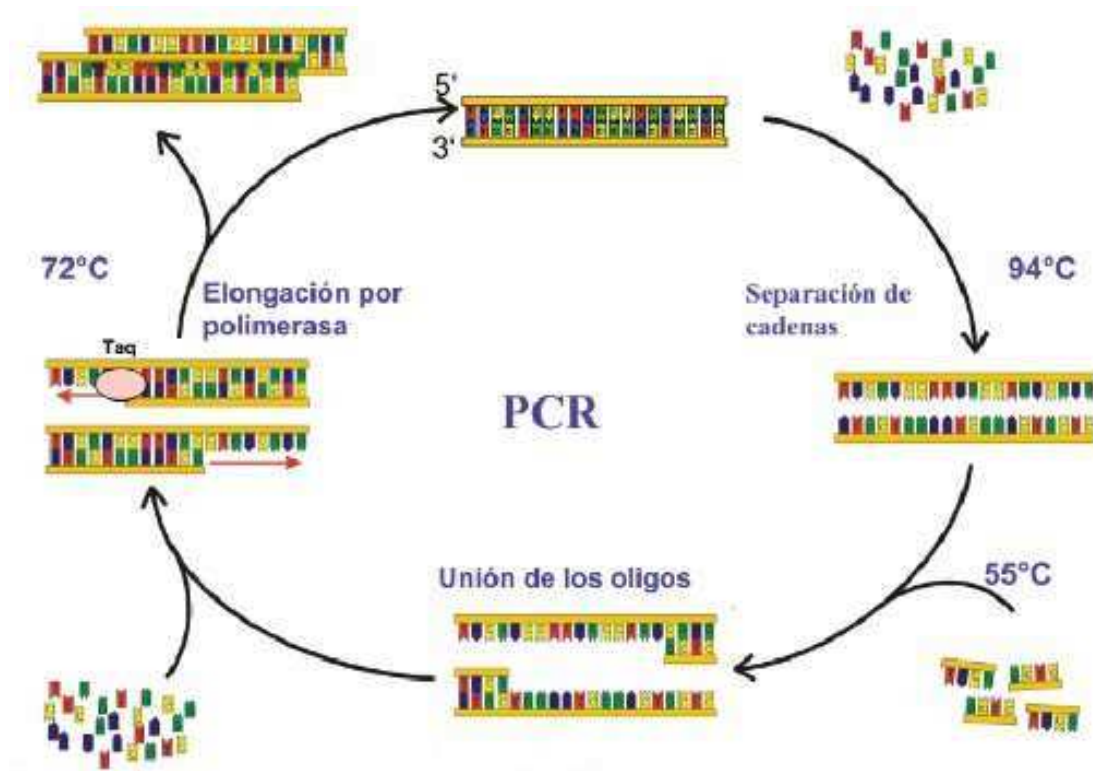
**Desnaturalización:** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

**Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T<sub>m</sub>) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

**Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las mismas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los

amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Cuando el ciclo de PCR ha terminado, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. Finalmente, la visualización del material amplificado se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV; adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas [52].



**Figura 10.** Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa con sus principales pasos: separación de cadenas, unión de primers u oligonucleótidos y elongación de las cadenas hijas. (modificado de Babesiakvazco, 2010) [53].

Algunos ejemplos de técnicas que aplican PCR para detección del daño podrían ser, el análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), la secuenciación de PCR de punto final del 16S rRNA y atpD, entre otras [26, 54–57]. Algunas otras técnicas de biología molecular, como los sitios sensibles a la endonucleasa (ESS) y qPCR (cuantitativo) proporcionan una alta especificidad, sensibilidad y precisión, pero requieren equipos y reactivos caros [29,30].

Una variante de la técnica de PCR se conoce como secuencia Consenso Intergénica Repetitiva Enterobacteriana (ERIC-PCR). Las secuencias ERIC son secuencias consenso extragénicas que se encuentran en diferentes loci dentro de un genoma. Estas secuencias se observaron por primera vez en el genoma de la cepa bacteriana *Escherichia coli*, pero estudios posteriores mostraron su presencia en *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Yersinia sp*, *Erwinia sp*, *Photobacterium sp*, *Vibrio sp*, *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*. La amplificación

de ADN por PCR usando secuencias ERIC como objetivo da como resultado diferentes tamaños de banda que producen perfiles únicos [24]. Dado que la ERIC-PCR tiene una capacidad moderadamente alta para diferenciar cepas bacterianas estrechamente relacionadas, este ha sido el uso más frecuente de esta técnica [31,58–60].

---

#### DISEÑO DE REACTORES FOTOQUIMICOS

Los procesos que ocurren en un reactor fotoquímico a cualquier escala requieren la utilización de conocimientos de distintas disciplinas, para ser realmente comprendidos. El estudio de estos procesos desde su etapa inicial, la emisión de radiación en forma de fotones a partir de la fuente (solar o artificial, según el diseño del reactor) hasta finalmente la etapa en que la molécula de un dado contaminante es descompuesta en especies inocuas, o se produce la inactivación de un microorganismo. En estos estudios se aplican conceptos vinculados a la física del estado sólido, fisicoquímica, electroquímica y fenómenos de transporte. Por lo tanto, el diseño de un reactor es un procedimiento completo que requiere ser estudiado en sus sucesivas etapas [38,61] que se describen a continuación:

---

#### CAMPO DE RADIACION

Para describir la velocidad de una reacción fotoquímica es necesario hacer la distinción entre las etapas activadas por radiación (iluminadas) y las etapas oscuras. Para el tratamiento de las reacciones oscuras se puede utilizar la misma metodología empleada en los reactores convencionales; el principal obstáculo aparece cuando se evalúa la velocidad de la etapa de activación. La existencia de este paso muy específico constituye la diferencia cinética principal (y la más importante) entre las reacciones térmicas convencionales y las activadas por radiación.

La velocidad de la etapa de activación por radiación es proporcional a la energía útil absorbida mediante una propiedad que se ha definido como la Velocidad Local Volumétrica de Absorción de Fotones ó “Local Volumetrical Rate of Photon Absorption” [62]. La LVRPA,  $(\frac{e^a}{\lambda})$  representa la cantidad de fotones absorbidos (de una determinada energía o longitud de onda) por unidad de volumen de reacción y unidad de tiempo. La LVRPA depende del campo de radiación en el espacio de reacción; por lo tanto, es necesario conocer el campo

de radiación dentro del fotorreactor. La distribución de la energía radiante no es uniforme en el espacio debido a la cercanía con la fuente de radiación y la atenuación producida por la absorción de las especies. Por otro lado, no necesariamente es constante el campo de radiación, ya que la concentración de especies absorbentes puede variar en el tiempo.

Otros factores importantes a tener en cuenta son las propiedades físicas y las características geométricas del sistema lámpara-reactor. Por lo tanto, la reacción de iniciación será espacialmente dependiente, aún en el caso de ausencia de gradientes de concentración. Esta carencia de homogeneidad en el campo de radiación es intrínsecamente irreductible en reactores fotoquímicos en la práctica. La evaluación de la L.V.R.P.A. se lleva a cabo resolviendo primero la ecuación general de transporte de radiación que requiere de las ecuaciones constitutivas apropiadas para la absorción, emisión y el scattering. El balance resultante de radiación se aplica entonces al espacio de reacción donde hay absorción únicamente (en medios homogéneos) o hay absorción y scattering (en medios heterogéneos), y a la lámpara donde la emisión es el fenómeno predominante. Combinando ambos resultados uno puede obtener, de una manera directa, el valor puntual (local) de la velocidad de absorción de radiación.

---

#### DEFINICION DE LA INTENSIDAD DE RADIACION

La radiación puede considerarse a nivel macroscópico como la propagación de fotones en forma de rayos, caracterizados sólo por su energía y su dirección. La propiedad fundamental asociada a la energía es la Intensidad Específica Espectral, definida por la Ecuación 1. Es la energía de un haz de radiación por unidad de tiempo, por unidad de ángulo sólido en la dirección de propagación, por unidad de área de superficie proyectada según dicha dirección y por unidad de intervalo de longitudes de onda. En fotoquímica es conveniente expresar  $I_\lambda$  en einstein por metro cuadrado, por estéreo radián, por segundo y por unidad de intervalo de longitud de onda. El valor de la intensidad es proporcional al número (o densidad) de fotones que se propagan en la dirección  $\Omega$ , con una energía igual a  $h\nu$ .



$$I_{\lambda}(\underline{x}, \underline{\Omega}, t) = \lim_{\substack{\partial A, \partial \Omega, \partial x \rightarrow 0}} \left( \frac{\partial E_{\lambda}}{\partial A \cos \theta \partial t \partial \lambda} \right)$$

Ec. 1

Para definir  $I_{\lambda}$  podemos considerar una superficie de tamaño diferencial ( $dA$ ), que puede ser caracterizada por su posición ( $\underline{x}$ ) respecto a un sistema fijo de coordenadas y su orientación en el espacio mediante su vector unitario normal ( $\underline{n}$ ). Desde esta superficie supongamos que se emite un haz de radiación con dirección  $\underline{\Omega}$ ; esta dirección de propagación genera un diferencial de ángulo sólido  $d\Omega$ . La dirección de propagación y la orientación de la superficie forman un ángulo que puede ser evaluado por el producto escalar  $\underline{\Omega} \cdot \underline{n} = \cos \theta$ . Mediante este ángulo podemos determinar el área proyectada según la dirección de propagación  $dA' = dA \cos \theta$ . Entonces, si  $dE_{\lambda}$  es la energía emitida en el rango entre  $\lambda$  y  $\lambda + d\lambda$ , podemos definir la Intensidad Específica Espectral  $I_{\lambda}$  mediante la Ecuación 1. En el caso más general, dentro de un reactor fotoquímico la radiación puede llegar a un volumen reaccionante elemental (punto material) desde todas las direcciones en el espacio. La integración de la Intensidad Específica Espectral en todas las direcciones posibles que vienen desde el espacio esférico entero de irradiación define una propiedad fotoquímica llamada Radiación Incidente Espectral, Ecuación 2. En algunos casos, tanto  $I_{\lambda}$  como  $G_{\lambda}$  pueden ser también función del tiempo.

$$G_{\lambda}(\underline{x}) = \int_{\Omega} I_{\lambda}(\underline{x}, \underline{\Omega}) d\Omega$$

Ec. 2

En la Ecuación 2 se ha realizado una integración para todas las direcciones posibles  $\Omega$  dentro del espacio esférico total. Para un sistema en coordenadas esféricas localizado en el punto de incidencia (el volumen elemental de reacción) la radiación incidente total es:  $[2\varphi]$  son los límites de integración que define el espacio desde el cual la radiación arriba al punto de incidencia. Si la radiación arriba desde todo el espacio  $4\pi$  entonces dichos límites se extienden para  $\theta$  de 0 a  $\pi$  y para  $\varphi$  de 0 a  $2\pi$ .

Debe considerarse que, con la excepción de un haz paralelo y colimado (donde un sistema de coordenadas cartesianas es suficiente), la energía radiante que emerge de una fuente (o que alcanza un punto de incidencia) siempre se propaga en forma esférica. De esta

CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

manera, un sistema de coordenadas esféricas es el sistema natural de representación para la propagación de la radiación. Para la radiación policromática, debe realizarse una integración sobre el rango de longitudes de onda de interés (considerando las regiones de  $\lambda$  en que se solapan la emisión de la lámpara, la transmisión de la pared del reactor y el coeficiente de absorción de las especies que absorben radiación).

A partir de la definición de la radiación incidente se puede definir la energía absorbida, en un volumen elemental, de acuerdo a:  $e^a_\lambda$  la Velocidad Volumétrica Local de Absorción de Fotones (LVRPA), muy a menudo inapropiadamente llamada "Intensidad Absorbida". Sus unidades son Einstein por metro cúbico y por segundo, muy diferente de las que corresponden a una Intensidad;  $\lambda \kappa$  es el coeficiente volumétrico espectral de absorción, que guarda algún tipo de relación funcional con la concentración de las especies absorbentes.

De esta forma, para evaluar la LVRPA debemos conocer la Intensidad Específica Espectral en cada punto dentro del reactor. Su valor puede obtenerse de la ecuación de transporte de fotones (Ecuación 3).

$$G_\lambda(\underline{x}) = \int_{\Omega} I_\lambda(\underline{x}, \underline{\Omega}) d\Omega \quad \dots \text{Ec. 3}$$

LA ECUACION GENERAL DE TRANSPORTE DE FOTONES

La forma general de la ecuación de conservación de fotones, a partir de la intensidad de radiación caracterizada por su longitud de onda y una dirección de propagación  $\underline{\Omega}$ , es [38]:

$$\underbrace{\frac{1}{c} \frac{\partial I_{\lambda, \underline{\Omega}}(\underline{x})}{\partial t}}_{\text{Transiente}} + \underbrace{\nabla \cdot (I_{\lambda, \underline{\Omega}}(\underline{x}) \underline{\Omega})}_{\text{Variación sobre la dirección } \underline{\Omega}} = - \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{abs}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por absorción del medio}} - \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{out-s}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por "Out-scattering"}} + \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{em}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por emisión del medio}} + \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{in-s}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por "In-scattering"}} \quad \text{Ec. 4}$$

MODELADO DE PROCESOS DE DESINFECCION

La primera hipótesis que podemos hacer para simplificar la ecuación es suponer el campo de radiación en estado estacionario. Esta suposición es válida, ya que el sistema alcanza el estado estacionario a la velocidad de la luz. Como paso siguiente, se pueden incorporar las ecuaciones constitutivas apropiadas para modelar cada fenómeno. De esta manera un

CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

rayo a lo largo de su trayectoria pierde energía debido a la absorción, que se modela con el coeficiente de absorción volumétrico  $\kappa\lambda$  que caracteriza a las especies absorbentes y representa la fracción de la radiación incidente que es absorbida por la materia por unidad de longitud a lo largo de la ruta del haz de luz. Esta ecuación constitutiva, cuando se inserta en la ecuación de transporte de fotones para un medio puramente absorbente, da origen a lo que generalmente se conoce como “Ley de Bouguer-Lambert” para la absorción de radiación en medios homogéneos. También se pierde energía debido al “out-scattering” (pérdida de energía por “scattering”), que se modela mediante el coeficiente volumétrico de “scattering”  $\sigma\lambda$ . El scattering de salida es un proceso mediante el cual la radiación transportada en un dado ángulo sólido  $d\Omega$  alrededor de la dirección  $\Omega$ , es desviada por el medio fuera de tal dirección o trayectoria y dispersada en todas direcciones en el espacio.

$$\underbrace{\frac{1}{c} \frac{\partial I_{\lambda, \Omega}(\underline{x})}{\partial t}}_{\text{Tranziente}} + \underbrace{\nabla \cdot (I_{\lambda, \Omega}(\underline{x}) \underline{\Omega})}_{\text{Variación sobre la dirección}} = - \underbrace{W_{\lambda, \Omega}^{abs}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por absorción del medio}} - \underbrace{W_{\lambda, \Omega}^{out-s}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por "Out-scattering"}} + \underbrace{W_{\lambda, \Omega}^{em}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por emisión del medio}} + \underbrace{W_{\lambda, \Omega}^{in-s}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por "In-scattering"}} \quad \text{Ec.5}$$

La ganancia de energía del haz se debe a la emisión interna y al “in-scattering”. La posibilidad de que exista emisión radiactiva varía apreciablemente entre un proceso y otro. La mayoría de los materiales producen una emisión espontánea que depende de su temperatura, siendo significativo a altas temperaturas (un cuerpo radiante, una llama, etc.). En otros casos los cuerpos pueden emitir radiación mediante la excitación producida por campos externos (por ejemplo: un arco de luz producido por una descarga eléctrica entre dos electrodos, la fluorescencia generada por un campo de radiación, etc.). El “in-scattering” puede definirse como la contribución de energía producida por otros rayos distintos de aquel en que se efectúa el análisis; es decir, parte de la energía dispersada en otros puntos como consecuencia del “out-scattering”, es redistribuida e incorporada a la dirección  $\underline{\Omega}$ . Esta “redistribución” de radiación se puede modelar con la función de fase para “scattering”  $p(\Omega' \rightarrow \Omega)$ , suponiendo “scattering” elástico (redistribución, sin cambio de longitud de onda). La función de fase  $p$  informa cuales, de todas las direcciones posibles  $\underline{\Omega}$ , se incorporan a la dirección del balance  $\underline{\Omega}$ . La expresión para el balance de radiación monocromática, teniendo en cuenta estas consideraciones es:

CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

$$\underbrace{\frac{dI_{\lambda\Omega}(\underline{x})}{ds}}_{\text{Variación sobre la dirección } \Omega} + \underbrace{\kappa_{\lambda}(\underline{x}) I_{\lambda\Omega}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por absorción}} + \underbrace{\sigma_{\lambda}(\underline{x}) I_{\lambda\Omega}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por "Out-Scattering"}} = \underbrace{j_{\lambda}^{\Omega}}_{\text{Ganancia por emisión}} + \underbrace{\frac{\sigma_{\lambda}(\underline{x})}{4\pi} \int_{\Omega=4\pi} p(\underline{\Omega}' \otimes \underline{\Omega}) I_{\lambda\Omega'}(\underline{x}) d\Omega'}_{\text{Ganancia por "In-scattering"}}$$

Ec. 6

En el caso de un sistema homogéneo tanto el término de “in-scattering” como el de “Out-scattering” pueden despreciarse. Además, si la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente la emisión también se considera despreciable. La distribución de la radiación se obtiene resolviendo la ecuación de transferencia radiativa en un sistema homogéneo con todas las consideraciones realizadas. En este trabajo en particular, las especies absorbentes varían su concentración a través del tiempo, por lo tanto, es necesaria una dependencia con esta variable:

$$\frac{dI_{\lambda\Omega}(s,t)}{ds} + \kappa_{\lambda}(s,t) I_{\lambda\Omega}(s,t) = 0$$

Ec. 7

La representación paramétrica de la trayectoria del rayo está dada por la variable s. La Ecuación 7 es válida para luz monocromática y una dirección simple  $\Omega$ . La solución de esta Ecuación diferencial provee el campo de intensidades de radiación.

LA CONDICION DE CONTORNO

En las condiciones planteadas, y a efectos de resolver el balance de radiación, se debe conocer la condición de contorno. Para ello, se pueden emplear distintos procedimientos.

Existen dos tipos de modelos rigurosos, que permiten el cálculo de las condiciones de contorno del espacio de reacción, estos son: Modelo de Emisión: son los que modelan la emisión de la fuente, considerando sus características geométricas y ópticas. Hasta el presente, en las aplicaciones ingenieriles de fotorreactores, las lámparas tubulares han sido usadas casi exclusivamente. Pueden modelarse dos tipos principales de lámparas: de emisión superficial y de emisión volumétrica. Las lámparas de emisión superficial poseen un tubo de vidrio con un material fluorescente que recubre la pared interna del mismo. La

radiación UV emitida por el mercurio contenido en el tubo es absorbida por el material fluorescente depositado sobre la superficie, el cual a su vez emite un espectro continuo de radiación UV y/o visible, dependiendo de la composición del material empleado. Entre estas lámparas se encuentran las lámparas actínicas, de luz negra y las fluorescentes en general. Si el medio existente entre la lámpara y la pared del reactor es diactínico (la intensidad no cambia con la trayectoria) a partir de la definición de intensidad específica espectral se obtiene la Ecuación 8 en función de la potencia de salida de la lámpara  $s_\lambda$  a una longitud de onda  $\lambda$  (fotones por segundo),  $r_L$  es el radio de la lámpara,  $L$  es la longitud útil de la lámpara, y  $Y_{R,\lambda}$  es un coeficiente de transmisión de la pared del reactor [38].

$$I_\lambda^0(\theta, \varphi) = \frac{P_\lambda}{2\pi^2 r_L^2 L} Y_{R,\lambda} \quad \text{Ec. 8}$$

Las lámparas de emisión volumétrica, en cambio, producen un espectro discontinuo o de líneas, generado por la emisión del mercurio gaseoso contenido en el tubo. En este caso, la emisión es producida por todo el volumen de la lámpara. Estas lámparas pueden ser de alta, media o baja presión de mercurio (por ejemplo, germicidas). También en este caso se considera que el medio existente entre la lámpara y la pared del reactor es diactínico. Además, se puede aplicar la RTE a todo el volumen de la lámpara, donde existe solamente el fenómeno de emisión representado por el coeficiente de emisión de radiación  $j_\lambda^e$ . Siguiendo el procedimiento presentado por Cassano y col., 1995 [38], se obtiene la ecuación (Ecuación 9).

$$I_\lambda^0(\theta, \varphi) = \frac{P_\lambda}{4\pi^2 r_L^2 L} \Delta\rho_s(\underline{x}, \theta, \varphi) Y_{R,\lambda} \quad \text{Ec.9}$$

La función  $\Delta\rho(\underline{x}, \theta, \varphi)$  puede obtenerse como la intersección de la ecuación de un cilindro en el espacio (la lámpara) con la ecuación de una recta en coordenadas esféricas (el rayo). Resolviendo la ecuación cuadrática resultante y reemplazando en la Ecuación 8, se llega a la Ecuación 10.

$$I_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = \frac{P_{\lambda}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \frac{(r_L^2 - r^2 \sin^2 \varphi)^{1/2}}{\sin \theta} Y_{R,\lambda} \quad \dots \text{Ec.10}$$

Donde  $P_{\lambda}$  es la potencia de salida de la lámpara a una longitud de onda  $\lambda$ ,  $r_L$  es el radio de la lámpara,  $L_L$  es la longitud útil de la lámpara, y  $Y_{R,\lambda}$  es un coeficiente de transmisión la pared del reactor.

Modelo de Incidencia: Son los que suponen una dada distribución de la energía radiante a la entrada del reactor, independizándose de la emisión de la fuente de radiación. Para determinar experimentalmente la radiación incidente dentro de un fotorreactor, pueden utilizarse dos tipos de métodos:

- Físicos: Se basan en la utilización de un instrumento de medición altamente sensitivo a la radiación, el cual debe ser calibrado con una fuente cuya potencia de salida y distribución espectral sean rigurosamente conocidas.
- Químicos: mediante el seguimiento de una reacción química producida por la absorción de energía radiante, cuyas características cinéticas y propiedades ópticas son perfectamente conocidas, además de existir una expresión matemática simple que vincule la velocidad de reacción y la velocidad de absorción de energía radiante.

Entre los métodos físicos de medición uno de los más comúnmente empleados es el sistema compuesto por un radiómetro y un sensor de radiación. Este dispositivo puede utilizarse para medidas absolutas o relativas del campo radiante en cualquier zona del espectro dentro del rango visible-ultravioleta. La principal desventaja es que estos equipos deben ser adecuadamente calibrados (se deben utilizar fuentes estándar de radiación).

Los métodos químicos brindan resultados confiables y reproducibles cuando se trata de evaluar la radiación incidente o la velocidad volumétrica de absorción de fotones dentro de un fotorreactor cualquiera sea su geometría y tamaño. Esto significa que cuando un actinómetro es apropiadamente usado se lleva a cabo una especie de "titulación de la luz" en el interior del recipiente de reacción. El análisis de los resultados experimentales de la reacción del actinómetro mediante un adecuado modelo permite la obtención del valor de la radiación incidente en la pared.

EXPRESION DE LA L.V.R.P. A UTILIZANDO UN MODELO DE EMISION

Para ambos modelos de lámparas mencionados en el punto anterior, es necesario conocer los límites de integración de las coordenadas angulares  $(\theta, \phi)$ , correspondientes al ángulo sólido que forma la fuente de radiación con un punto de incidencia  $I_n$  dentro del reactor. La Figura 11 muestra la emisión a lo largo de la dirección producida por un elemento de volumen pequeño de la lámpara que llega al reactor a  $s = s_R$ . Teniendo en cuenta la Figura 11, la ecuación 5 puede ser integrada a lo largo de la dirección de propagación dada (definida por las coordenadas  $\theta$  y  $\phi$ ) a partir de  $s = s_R$  (a un punto arbitrario de la radiación a la entrada del reactor) en un punto de incidencia  $I_n$  dentro del reactor, como se expresó en la ecuación (1) donde  $I_\lambda^0(\theta, \phi, t) = I_\lambda(s_R, \Omega, t)$  es la condición límite para  $I_\lambda$  al punto de entrada y para una dirección arbitraria  $\Omega$ .

El paso siguiente es integrar todas las posibles direcciones de irradiación a partir del volumen de la lámpara de emisión para el punto  $I_n$ . El valor, de la radiación incidente ( $G_\lambda$ ) en un punto  $x$  dentro del reactor se obtiene integrando el ángulo sólido de incidencia ( $d\Omega$ ) =  $sen\theta d\theta d\phi$ .

Entonces con todo lo anteriormente expuesto la ecuación para la L.V.R.P.A. es:

$$e_\lambda^a(\underline{x}, t) = K_\lambda(\underline{x}, t) \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \, sen\theta \times I_{\lambda, \Omega}^0(t) \exp \left[ - \int_{\bar{s}=s_\lambda(\underline{x}, \theta, \phi)}^{\bar{s}=s(\underline{x}, \theta, \phi)} K_\lambda(\bar{s}, t) \, d\bar{s} \right] \quad \text{Ec. 11}$$

En la integral doble,  $\theta$  considera el largo de la lámpara y el diámetro de la lámpara  $\phi$ . Los límites de la integración, que resultan de simples relaciones trigonométricas, están dados por las Ecuaciones 12 a 14 [62]:

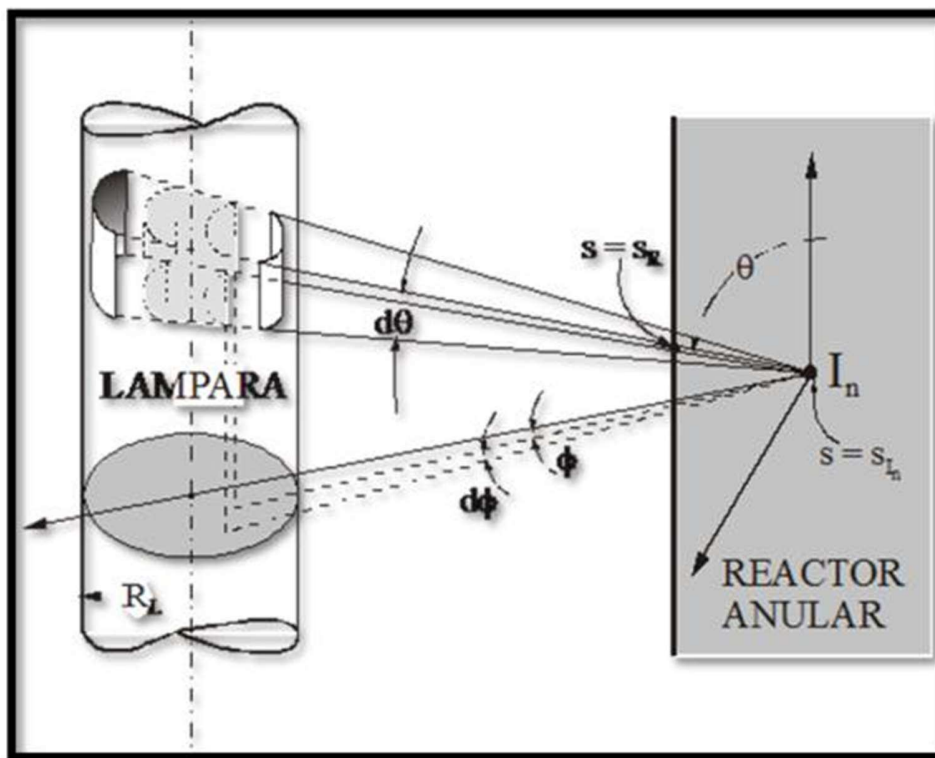
$$\theta_1(\phi) = \tan^{-1} \left[ \frac{r \cos\phi - (r_L^2 - r^2 \sin^2\phi)^{1/2}}{(L_L - z)} \right] \quad \text{Ec. 12}$$

$$\theta_2(\varphi) = \tan^{-1} \left[ \frac{r \cos \varphi - (r_1^2 - r^2 \sin^2 \varphi)^{1/2}}{-z} \right]$$

Ec. 13

$$-\varphi_1 = \varphi_2 = \cos^{-1} \left[ \frac{(r^2 - r_L^2)^{1/2}}{r} \right]$$

Ec. 14



**Figura 11.** Modelo de emisión para una lámpara tubular a lo largo de la dirección \$(\theta, \phi)\$ en un punto \$I\_n\$ (reactor anular) (modificado de Labas y col, 2008) [63].

#### FACTORES QUE AFECTAN LA DESINFECCION EFICAZ CON UV

Estos factores están relacionados principalmente con la exposición de los contaminantes en el agua y la transmisión eficiente de radiación UV para una inactivación adecuada y son los siguientes:

- Calidad del agua



- Transmisión de radiación UV
- Sólidos suspendidos
- Nivel de orgánicos disueltos
- Dureza total
- Condición de la lámpara
- Limpieza del tubo de cuarzo
- Tiempo de uso de la lámpara
- Tratamiento del agua antes de aplicar radiación UV
- Flujo
- Diseño del reactor

Los problemas incluyen la existencia de zonas en sombras (cuando los contaminantes pequeños son ocultados y no reciben radiación por otros contaminantes presentes en el agua), incrustación o decoloración del tubo de cuarzo, intensidad de la lámpara y flujos no adecuados [37].

El uso de UV como método de tratamiento es seguro y no presenta riesgos de manipulación, el agua tratada no se altera ni en olor ni sabor, la desinfección es rápida, aunque requiere de energía eléctrica para las lámparas. La radiación ultravioleta es efectiva sobre un gran espectro de microorganismos y no genera subproductos en su utilización ni al agua ni al medio, además la tecnología actual permite obtener bajos niveles de energía eléctrica en regiones apartadas, con el uso de paneles fotovoltaicos [17]. No se necesitan tanques de contacto; apenas algunos segundos son suficientes para la desinfección. El mantenimiento es muy simple, pues necesita solamente un reemplazo anual de la lámpara y limpieza del tubo de cuarzo de vez en cuando. Dependiendo de la calidad del agua, la limpieza puede no ser necesaria [37].

#### AVANCES EN EL DESARROLLO DE LA TECNOLOGIA UV EN DESINFECCION DE AGUA

Las aplicaciones prácticas de la tecnología UV han sido comunicadas por Blatchley, 1997 [64] sobre la desinfección convencional de efluentes secundarios, así como tratamientos específicos para reutilizar el agua y una variedad de procesos utilizados en varios países de Europa. La investigación en la desinfección UV se continúa aumentando a una tasa sustancial en los últimos años.

La inactivación de microorganismos por irradiación UV ha sido estudiada bajo diferentes condiciones experimentales. La mayoría de los estudios utilizan un aparato que emite rayo colimado de radiación sobre un recipiente (pruebas CB) a baja escala y condiciones de laboratorio bien definidas. Un volumen de agua inoculada se irradia durante períodos variables de tiempo bajo una lámpara que emite luz UV. Otros estudios tienen sistemas de flujo continuo (sistemas CF) en un laboratorio, en una planta piloto o demostración de condiciones a baja escala en las que el agua pasa a un reactor con una o más lámparas UV y la radiación y el tiempo de contacto varían con el reactor [65].

Labas y col, 2006 [66] pudieron observar utilizando fotorreactores tipo batch con una lámpara UV en el centro que siempre fue lograda una desinfección del 99,99% o más, en las concentraciones de bacterias *E. coli* ATCC 8739. Por lo tanto, confirmaron que la radiación de baja longitud de onda ( $\lambda = 253.7$  nm) y tiempos de contacto cortos son eficaces, en virtud de condiciones de agua clara, para la inactivación de las bacterias en todos los ensayos que realizaron. Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de Tarrán, 2002 [37] que dicen que la aplicación de radiación UV es usada principalmente como tratamiento secundario en agua potable debido a que el contenido de sólidos suspendidos es casi cero y el tratamiento en estas condiciones se vuelve muy eficiente.

El interés en la radiación UV como un proceso de desinfección de agua aumentó después de que Clancy y col., 1998 [67] demostraron que los oocistos de *Cryptosporidium parvum* fueron altamente sensibles a los rayos UV cuando el efecto sobre la infectividad se evaluó con el modelo neonatal de ratón. Desde entonces, Clancy y col. 1998 y varios otros autores han estudiado la inactivación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia muris* mediante radiación UV. En el caso de estos protozoarios, la ausencia de los métodos actuales de

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

---

tratamiento resulta en un aumento de casos patológicos. Además de que atraviesan con relativa facilidad los procesos de las plantas potabilizadoras (cloración, filtración a través de lecho profundo, filtración a través de carbón activado, filtración por cartucho, suavización y ozonificación del agua) por lo que es importante buscar alternativas para eliminarlos del agua de bebida [17]. Johnson y col., 2005 [68] demostraron una sensibilidad UV similar para ooquistes de *C. hominis* que predomina en las infecciones humanas de criptosporidiosis. Siguiendo con esta línea de trabajo Torres-Olave y col., 2014 [17] realizaron la inactivación de *Cryptosporidium spp.* y *Giardia lamblia sp.* en agua mediante luz UV de bajo voltaje con un concentrador solar casero. Los resultados que arrojaron estos experimentos fue una desactivación total de los ooquistes de estos parásitos tras 8 horas de exposición.

Los datos de la literatura acumulada sobre la desinfección con irradiación UV demuestran que el proceso es eficaz contra todos los microorganismos patógenos relevantes para las prácticas actuales de agua potable [65].

### OBJETIVOS

- ➔ Estudiar desde un enfoque novedoso, el proceso de desinfección de agua aplicando radiación UVC a dos cepas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ➔ Proponer una metodología para el seguimiento del daño generado hacia el ADN por la radiación en ambos microorganismos utilizados, buscando técnicas de biología molecular.
- ➔ Realizar un modelado matemático a través de la definición de índices y parámetros que permitan obtener una correlación entre los datos experimentales de inactivación y los daños detectados en el ADN.

### MATERIALES Y METODOS

---

#### MICROORGANISMOS

---

##### *ESCHERICHIA COLI*

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo de Tesis es de la American Type Culture Collection (ATCC) 8739. Para clasificar los microorganismos se toma la relación de ADN y una variedad de características fenotípicas (taxonomía polifásica), la cual parece ser

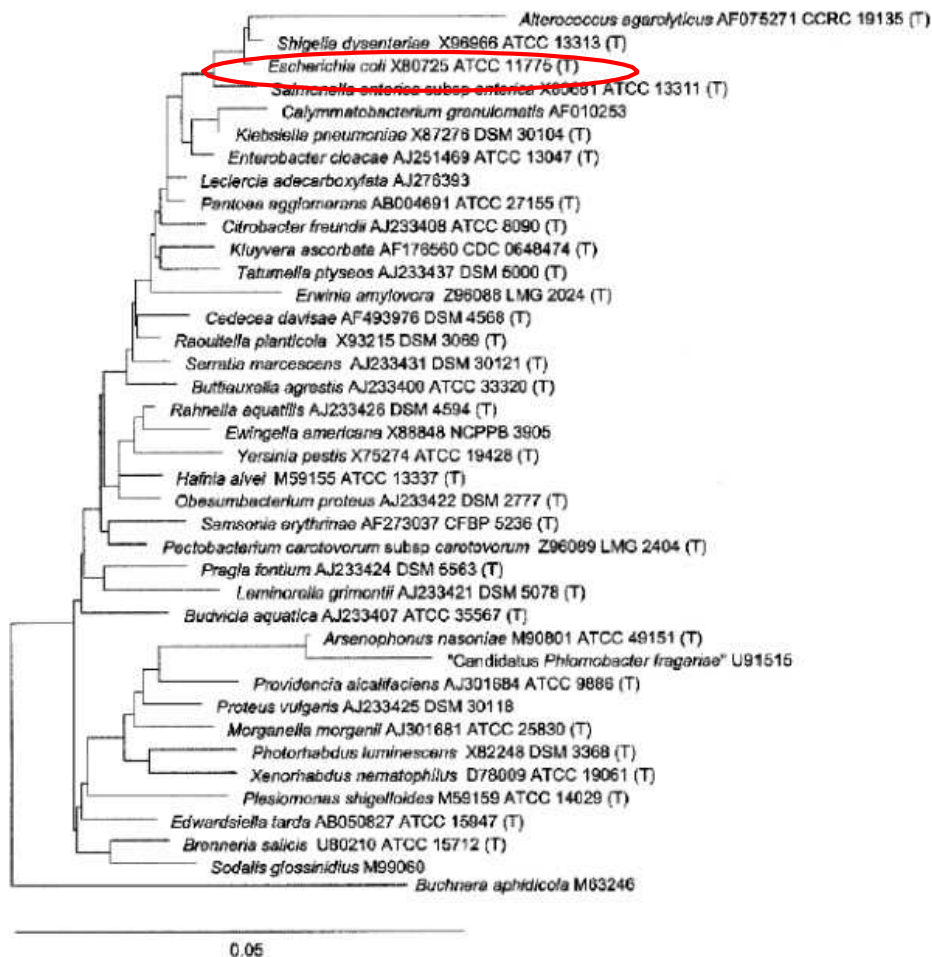
el mejor enfoque para una descripción válida de especies. *E. coli* pertenece al orden Enterobacteriales y a la familia Enterobacteriaceae (Figura 12). Esta familia taxonómica está formada por aproximadamente 44 géneros y 176 especies diferentes. Se caracterizan por ser bacilos Gram (-), la mayoría tiene de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud. Si poseen movilidad es a través de flagelos peritricos. No forman esporas y no son ácido – rápidas. Pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Crecen bien con peptona, extracto de carne y, por lo general, el medio de McConkey, a excepción de *Calymmatobacterium* y simbiontes de insectos, que no se han cultivado. La mayoría crece bien a 22–35°C. El crecimiento óptimo y la capacidad bioquímica máxima de varios géneros (*Yersinia*, *Hafnia*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* y muchas *Erwinias*) se produce a 25–28 °C. Algunos crecen con d-glucosa como la única fuente de carbono y otros requieren vitaminas y / o aminoácidos. Poseen un metabolismo quimioorganotrófico; y son capaces de fermentar. El gas ácido y visible a menudo se produce durante la fermentación de d-glucosa, otros carbohidratos y alcoholes polihidroxílicos. No son halófilas. La mayoría son catalasa-positivas, excepto *Shigella dysenteriae* O grupo 1 y *Xenorhabdus*. La mayoría es oxidasa negativa, a excepción de *Plesiomonas*. La mayoría reduce el nitrato a nitrito, excepto *Saccharobacter fermentatus* y algunas cepas de *Erwinia* y *Yersinia*. El porcentaje molar G-C del ADN es: 38–60 %. El género representativo de esta familia es *Escherichia*.

La definición de la familia circunscribe un gran grupo de microorganismos relacionados bioquímicamente y genéticamente que muestra una heterogeneidad sustancial en su ecología, rango de huéspedes y potencialidad patógena para el hombre, los animales, los insectos y las plantas. La posición filogenética de la familia Enterobacteriaceae se encuentra dentro de las Gammaproteobacterias. Sus vecinos más cercanos son las familias Alteromonadaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae y Pasteurellaceae [69].

Teniendo un contexto taxonómico del género al que pertenece la cepa en estudio, a continuación, se presentarán características del género *Escherichia* cuyo microorganismo representativo es *E. coli*. Son bacilos Gram negativos rectos, de 1.1–1.5 / 2.0–6.0  $\mu\text{m}$ , que se presentan solas o en pares. Si presentan movilidad es a través de flagelos peritricos. Pueden ser aeróbicas y anaerobias facultativas que tiene un tipo de metabolismo respiratorio y fermentativo, pero existen biotipos anaerobios. Oxidasa negativa.

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

Quimioorganotrofas. Tanto el ácido como el gas se forman a partir de la mayoría de los carbohidratos fermentables, pero el i-inositol no se utiliza y el d-adonitol solo lo utiliza *Escherichia fergusonii*. La lactosa es fermentada por la mayoría de las cepas de *Escherichia coli*, pero la fermentación puede retrasarse o estar ausente en *Escherichia blattae*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii* y *Escherichia vulneris*. No crece en KCN (con la excepción de *E. hermannii* y una pequeña proporción de *E. vulneris*). Por lo general, no producen H<sub>2</sub>S. *E. coli* se encuentra naturalmente en la parte inferior del intestino de animales de sangre caliente. Su porcentaje molar de G-C es de 48 a 59%. Las pruebas bioquímicas necesarias para distinguir *E. coli* de las demás de su género se mencionan en la Tabla 4 y fueron realizadas para la identificación de nuestra cepa de referencia [69]



**Figura 12.** Dendrograma de la familia Enterobacteriaceae a la cual pertenece la especie de *Escherichia coli* ATCC 8739 utilizada en este trabajo (modificado de Bergey y col., 1957) [69].

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

En la Figura 13 se muestra el desarrollo de la cepa de *E. coli* ATCC 8739 en superficie de agar Eosina Azul de Metileno (EMB), donde muestra un desarrollo típico oscuro y verde metalizado producido por el bajo pH de la fermentación de la lactosa y su correspondiente tinción de Gram que muestra su comportamiento típico Gram (-), además de sumorfología representada por bacilos cortos que se encuentran de a pares.

**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas para diferenciar cinco tipos de especies de género *Escherichia*. (modificado de Bergey y col., 1957) [69].

Test	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (metabolically inactive strains)	<i>E. blattae</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>
Indole	+	[+]	-	+	+ <sup>c</sup>	-
Citrate, Simmons	-	-	d	[-]	- <sup>d</sup>	-
Lysine decarboxylase	+	d	+	+	-	[+]
Ornithine decarboxylase	d	[-]	+ <sup>e</sup>	+	+	-
Motility	+	-	- <sup>e</sup>	+	+	+
KCN, growth	-	-	-	-	+	[-]
Malonate utilization	-	-	+	d	-	[+]
D-Glucose, gas	+	-	+	+	+	+
Acid production from:						
D-Adonitol	-	-	-	+	-	-
D-Arabitol	-	-	-	+	-	-
Cellobiose	-	-	-	+	+	+
Dulcitol	d	d	-	d <sup>r</sup>	[-]	-
Lactose	+	[-]	-	- <sup>r</sup>	d	[-] <sup>f</sup>
D-Mannitol	+	+	-	+	+	+
Melibiose	[+]	d	-	-	-	+
D-Sorbitol	+	d	-	-	-	-
Mucae	+	d	d	-	+	[+]
Acetate utilization	+	d	-	+	[+]	d
Yellow pigmentation	-	-	-	-	+	d

\*Data compiled from references Farmer (1999), Cowan et al. (1995), Holt et al. (1994), and Richard (1989). Reactions for indole for *E. fergusonii* and melibiose for *E. coli* differ slightly in these references. The reactions listed in this table are supported by our own unpublished data.

<sup>b</sup>Symbols: -, 0-10% positive; [-], 11-25% positive; d, 26-75% positive; [+], 76-89% positive; +, 90-100% positive. Results are for 48 h incubation at 36° ± 1°C.

<sup>c</sup>Delayed positive in approximately a fifth of *E. hermannii* strains.

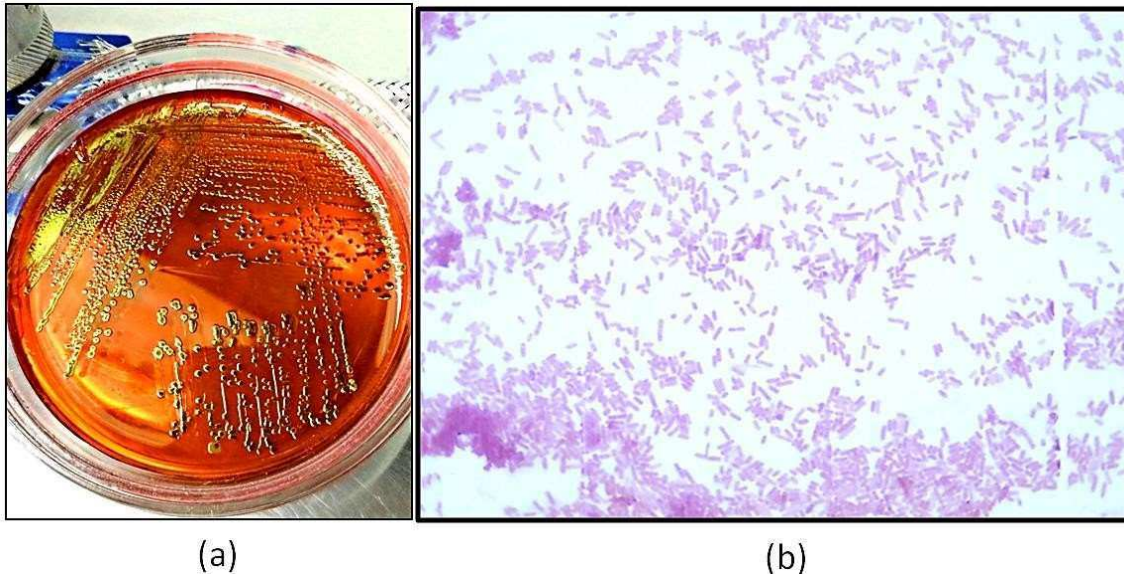
<sup>d</sup>Delayed positive in a third of *E. hermannii* strains.

<sup>e</sup>75% of *E. blattae* strains will become motile after incubation of more than 2 d.

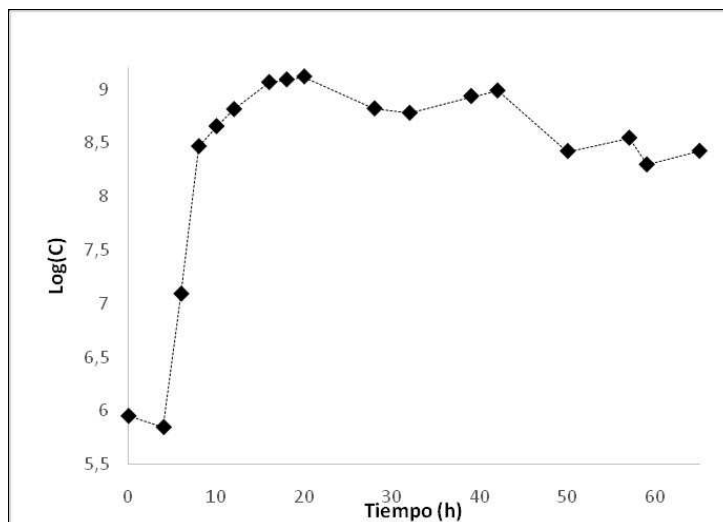
<sup>f</sup>Delayed positive in approximately two thirds of *E. fergusonii* and *E. vulneris* strains.

Antes de proceder a las corridas de inactivación en el reactor fotoquímico, se caracterizó el crecimiento de la cepa empleada para determinar el tiempo de incubación adecuado del inóculo inicial. El ensayo consistió en la incubación de un erlenmeyer con 150 ml de Caldo Nutritivo estéril, al cual se le colocó un inóculo de la cepa a estudiar y se monitoreó cada dos horas mediante siembras en superficie en agar EMB para el recuento de microorganismos viables. Tanto el caldo como las placas fueron incubados en estufa a 37°C durante 65 h y 24 h, respectivamente. De esta forma, tras los recuentos de las placas que tenían entre 30 y 300 colonias se representaron gráficamente los resultados en la Figura 14. La curva de crecimiento es una curva típica que manifiesta a sus comienzos una fase lag de 4 horas aproximadamente, que es seguida de una fase exponencial que dura 16

horas para luego entrar en fase estacionaria a las 20 h de comenzada la incubación el microorganismo. Es por ello que se eligió las 20 h de incubación para realizar los cultivos para los ensayos de inactivación ya que en ese tiempo no hay más reproducción, las células son jóvenes y se encuentran en su número más alto.



**Figura 13.** Imágenes de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 en (a) superficie de agar EMB y (b) luego de la tinción con la técnica de Gram.



**Figura 14.** Curva de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 8739 representada como el logaritmo decimal de los recuentos de colonias en placa (Log (C)) vs el tiempo transcurrido en horas.

---

*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con la que trabajamos fue la ATCC 15442, este microorganismo pertenece al orden taxonómico *Pseudomonadales*, que a su vez contiene a las familias *Pseudomonadaceae* (Figura 15) y *Moraxellaceae*. Sus miembros son quimiorganotrofos, con metabolismo respiratorio aeróbico. La mayoría son móviles mediante flagelos. *Azomonas spp.* y *Azotobacter spp.* fijan nitrógeno; *Azotobacter spp.* forma quistes y *Moraxella spp.* habita en la mucosa de los animales y el hombre. El género modelo es *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* está integrado por bacterias en forma de bacilos rectos o ligeramente curvados, pero no helicoidales, que miden 0.5–1.0 / 1.5–5.0 µm. La mayoría de las especies no acumulan gránulos de polihidroxibutirato. No producen prótesis y no están rodeadas de vainas. No se conocen etapas de reposo. Son Gram (-), móviles por uno o varios flagelos polares; raramente no móvil. En algunas especies también se pueden formar flagelos laterales de onda corta. Son microorganismos aeróbicos, que tienen un tipo de metabolismo estrictamente oxigénico; en algunos casos, el nitrato se puede usar como un receptor de electrones alternativo, permitiendo que el crecimiento ocurra anaeróbicamente. La mayoría, si no todas, las especies no crecen en condiciones ácidas (pH 4.5 o inferior). La mayoría de las especies no requieren factores de crecimiento orgánicos. Pueden ser oxidasa positiva o negativa y catalasa positiva. Tienen metabolismo quimiorganotrófico. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunas especies son patógenas para humanos, animales o plantas. El contenido de G-C promedio varía entre 58-69%. El microorganismo representativo de este género es *Pseudomonas aeruginosa* [69].

En algunos de los hábitats, las cepas de especies de *Pseudomonas* pueden representar una minoría de la flora microbiana; sin embargo, ciertas condiciones (un pH cercano a la neutralidad, materia orgánica en solución, una temperatura en el rango mesofílico, un buen suministro de oxígeno disuelto) junto con una capacidad de crecimiento rápido en ausencia de factores orgánicos complejos pueden favorecer su predominio. Incluso en medios con un contenido extremadamente bajo de nutrientes, las *Pseudomonas* se multiplican ocasionalmente en gran medida. *P. aeruginosa* se ha encontrado capaz de crecer a



expensas de las impurezas menores presentes en el agua destilada del hospital. Las cepas de muchas especies son ubicuas, y los datos de aislamiento a menudo arrojan poca luz sobre su ecología. Cuando se trata de organismos de tal versatilidad, las conclusiones ecológicas son particularmente difíciles de extraer.

En la Tabla 5 se expresan las pruebas bioquímicas que se utilizan para distinguir a *Pseudomonas aeruginosa* de otras especies cercanas de *Pseudomonas*. En este trabajo se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes a nuestra cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15442 para confirmar su pureza e identidad. Además se realizó la tinción de Gram y se corroboró su crecimiento en medio sólido Cetrimide (Figura 16) [69].

Para poder ajustar el tiempo de cultivo del inóculo inicial se hizo una curva de crecimiento de la cepa en estudio. Este ensayo consistió en inocular un erlenmeyer con 150 ml de Caldo Nutritivo con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, se incubó a 37°C durante 52 horas y se tomaron muestras para controlar el crecimiento. Cada muestra fue sembrada, luego de hacer las diluciones seriadas pertinentes para cada tiempo, en la superficie de placas de agar Cetrimide e incubadas a 37°C durante 24 horas. El resultado del recuento se expresa en la gráfica de la Figura 17. La curva de crecimiento obtenida presenta la forma típica de una curva de crecimiento bacteriano, con una fase lag muy corta (2 h aproximadamente). Seguida de la fase exponencial que se extendió hasta las 19 h de cultivo aproximadamente y por último el comienzo de la fase estacionaria hasta las 48 horas de cultivo que terminó con la aparición de una incipiente fase de muerte. Teniendo en cuenta todo esto se eligió trabajar con una incubación a 20 h, debido que es el comienzo de la fase estacionaria donde las cepas no envejecieron aún, están en su máximo número y no se replican más.

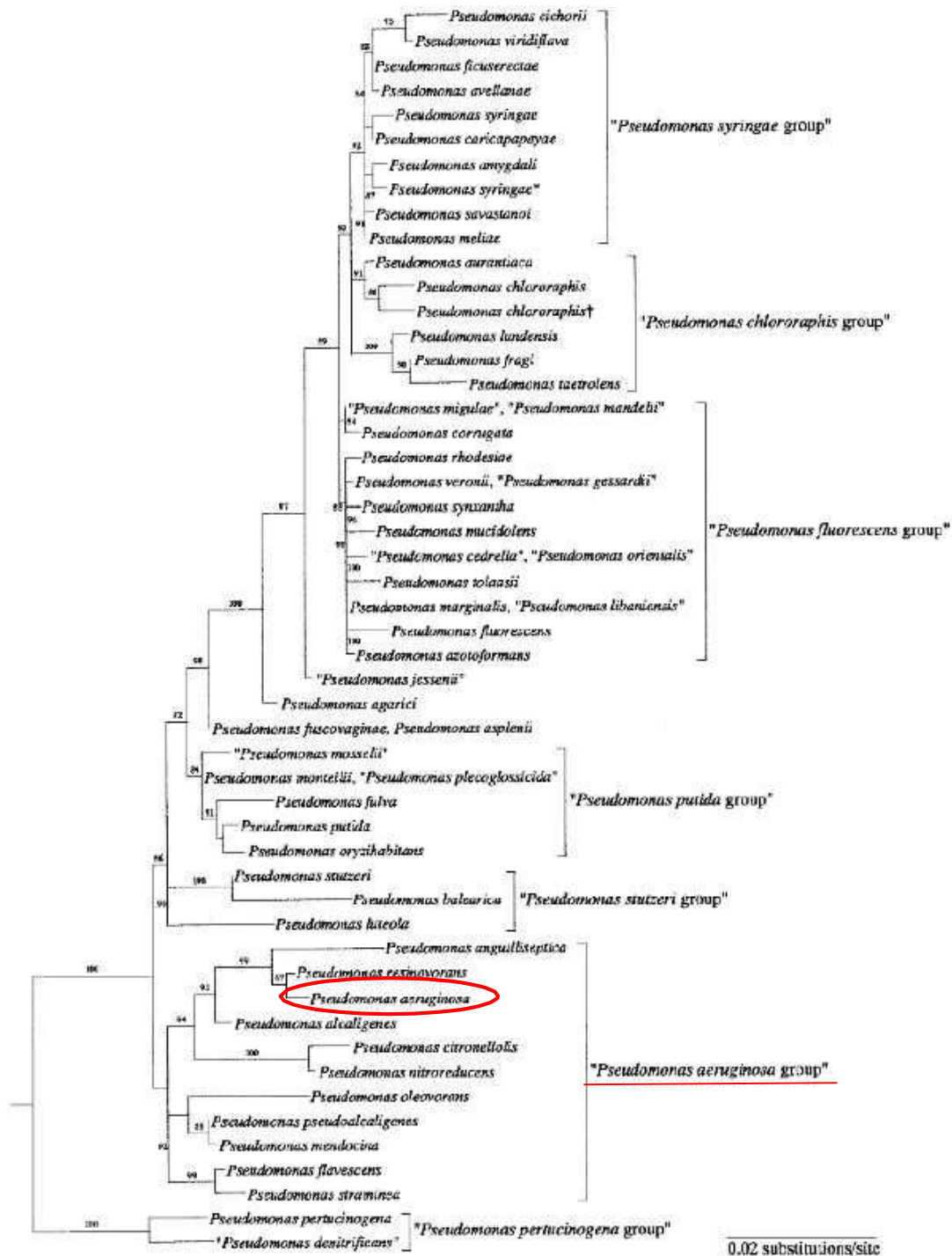


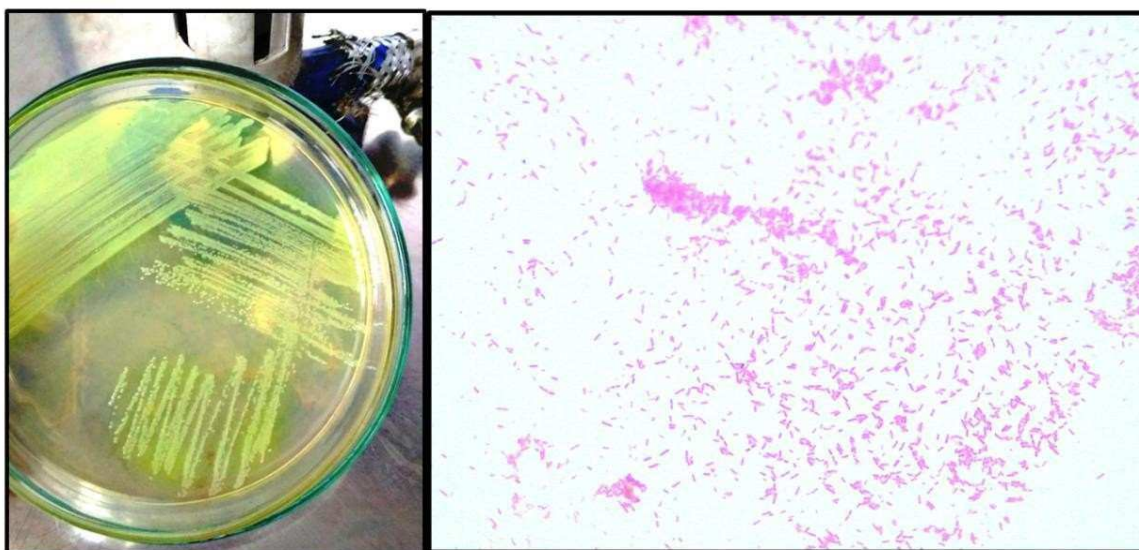
Figura 15. Árbol filogenético de especies del género *Pseudomonas* generado a partir de las secuencias 16 s rADN (modificado de Bergey y col., 1957) [69]

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

**Tabla 5.** Características que diferencian *Pseudomonas aeruginosa*, *P. balearica*, *P. stutzeri* y *P. putida* (modificado de Bergey y col., 1957) [69].

Characteristics	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. balearica</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>Type of colony:</i>				
Smooth	+		+	
Wrinkled		+		+
Number of flagella	1	1	>1	1
<i>Hydrolysis of:</i>				
Gelatin	+	-	-	-
Starch	-	+	-	+
<i>Utilization of:</i>				
Maltose	-	+	d	+
Xylose	-	+	d	-
$\gamma$ -Aminobutyrate	-	-	d	d
Malate	d	+	-	+
Suberate	d	-	-	d
Mannitol	+	-	-	d
Ethylene glycol	-	-	-	+
Denitrification	+	+	-	+
<i>Growth at:</i>				
42°C	+	+	-	d
46°C	-	+	-	d
Growth in media with 8.5% NaCl	-	+	-	-
<i>Fatty acid content (%):</i>				
C <sub>17:0</sub> cyclo	0.8	4.71	>5	0.28-1.72
C <sub>19:0</sub> cyclo	1.2	3.8	Traces	0.32-1.45
Mol% G + C of the DNA	67	64.1-64.4	60.7-62.5	60.9-64.9

\*For symbols see standard definitions. Data from Bennasar et al. (1996) and Stanier et al. (1966).



(a)

(b)

**Figura 16.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 en (a) desarrollando en medio de cultivo sólido Cetrimide y (b) tinción de Gram.

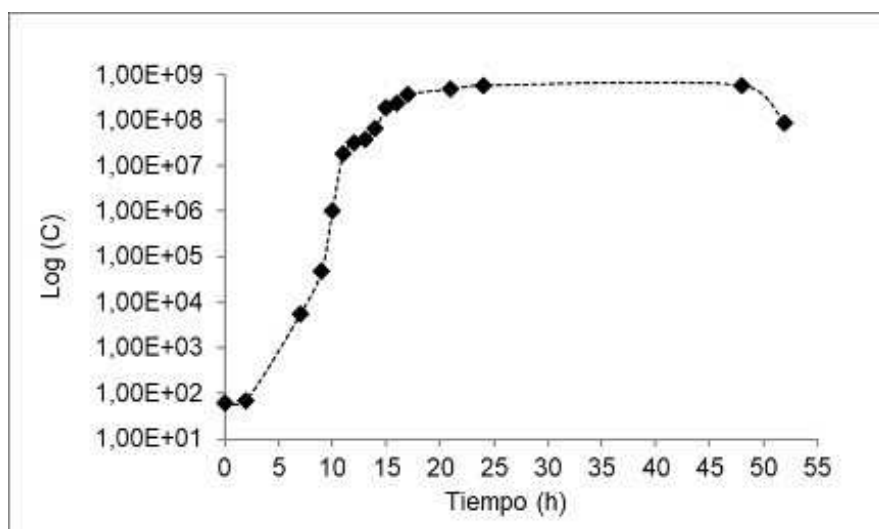


Figura 17. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

#### ACTIVACION DE LOS INOCULOS BACTERIANOS

Para llevar a cabo los ensayos de inactivación se utilizaron la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Para la reactivación de las mismas fue colocado el liofilizado en Caldo Nutritivo y se cultivó durante 20 h a 37°C. Tras el tiempo de incubación se hicieron placas con medio sólido EMB y Cetrimide, respectivamente, y se realizaron siembras en estrías por agotamiento para comprobar su pureza. Tras un tiempo de incubación de 24 h a 37°C, estas placas se conservaron a 4°C para ser utilizadas en las corridas experimentales.

#### REACTIVOS

Durante los ensayos experimentales se utilizaron los siguientes reactivos que se detallan: Caldo nutritivo (triptona 10 gL<sup>-1</sup>; extracto de carne 5 gL<sup>-1</sup>, cloruro de sodio 5 gL<sup>-1</sup>); EMB (eosina azul de metileno) (Peptona 10 gL<sup>-1</sup>, sacarosa 5 gL<sup>-1</sup>, lactosa 5 gL<sup>-1</sup>, fosfato dipotásico 2 gL<sup>-1</sup>, eosina 0.4 gL<sup>-1</sup>, azul de metileno 0.065 gL<sup>-1</sup>, agar 13.5 gL<sup>-1</sup>) (Biokar); Agar Cetrimide (digestión de gelatina pancreática 20 gL<sup>-1</sup>, cetrimide 0.3 gL<sup>-1</sup>, cloruro de magnesio 1.4 gL<sup>-1</sup>, sulfato de potasio 10 gL<sup>-1</sup>, agar 13.6 gL<sup>-1</sup>) (Biokar); Agua de peptona (Peptona de carne 10 gL<sup>-1</sup>, cloruro de sodio 5 gL<sup>-1</sup>, fosfato básico de sodio 3.57 gL<sup>-1</sup>,

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

---

hidrogeno fosfato de potasio  $1,5 \text{ gL}^{-1}$ ) (Biokar); Cloruro de Sodio (Cicarelli), para el cultivo y recuento bacteriano.

Para los ensayos de ERIC-PCR se utilizaron: GoTaq Green Master Mix (Promega), TAE 40 x (Promega), Agarosa (Biodynamics), Bromuro de Etidio (Promega) y primers específicos ERIC (1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'); 2: (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), marcadores de tamaño molecular para ADN 1 kilo base (kb) Quick-Load® Purple (New EnglandBioLabs Inc.) y 100 Marker (Biodynamics S.R.L.).

---

### DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

En la Figura 18 se muestra un esquema del dispositivo experimental empleado que constó de un reactor batch, anular, mezcla perfecta. El reactor está compuesto por un tanque reservorio de acrílico de 2000 ml de volumen con camisa refrigerante. Con un radio interno de 2.2 cm y un radio externo de 7 cm. La temperatura se mantuvo constante a  $20^\circ\text{C}$  utilizando un baño termostático (HAAKE). El reactor posee un sistema de agitación orbital mecánico. 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 253.7 nm). La misma se encuentra en el espacio anular del reactor, separada del líquido por un tubo concéntrico de cuarzo.

---

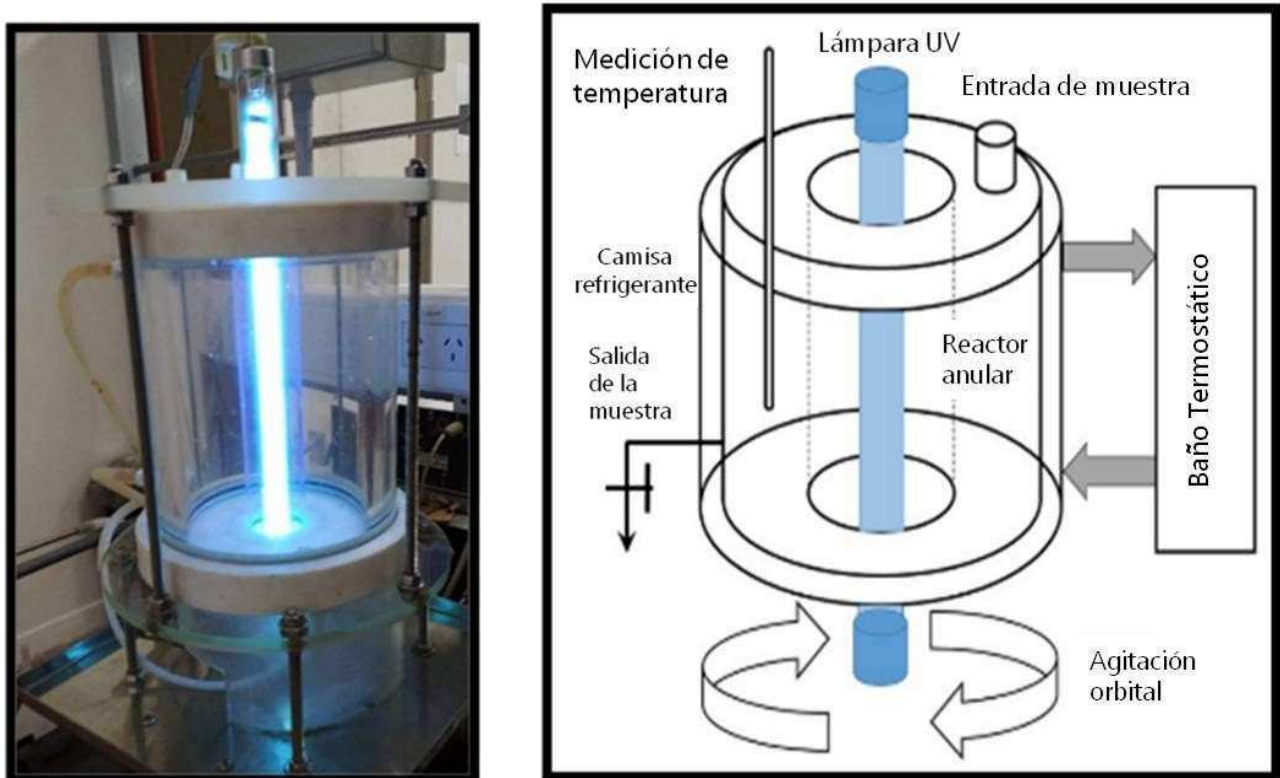
### CORRIDAS EXPERIMENTALES

---

#### PREPARACION DEL INOCULO INICIAL

Los ensayos de inactivación consistieron en colocar un cultivo de *E. coli* ATCC 8739 o *P. aeruginosa* ATCC 15442 dentro del reactor con una concentración aproximada de 107 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Esta concentración de microorganismos se logró centrifugando dos cultivos de esta cepa desarrollados durante 20 h a  $37^\circ\text{C}$  en 150 ml de Caldo Nutritivo. Luego del período de incubación se procedió a la concentración del inóculo mediante dos centrifugaciones de 15 minutos cada una a 3500 rpm, descartando el sobrenadante entre cada centrifugación. Al finalizar, se resuspendió el pellet en 3 ml de solución fisiológica estéril (agua destilada estéril con 0,9% de cloruro de sodio). Un mililitro

se utilizó para verificar el número de bacterias viables haciendo diluciones seriadas en agua de peptona bufferada y luego, se sembró en la superficie de placas de medio agarizado EMB o Cetrimide según el microorganismo utilizado. Los 2 ml restantes se introdujeron en el reactor para realizar los ensayos de inactivación.



**Figura 18.** Fotografía y esquema del reactor empleado.

#### ENSAYOS CON UV

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  $10.5 \text{ mW.cm}^{-2}$ , con un filtro con una transmitancia del 40% que equivale a  $4.2 \text{ mW.cm}^{-2}$  y un filtro con una transmitancia de 20% que equivale a  $2.1 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Los valores de radiación incidente fueron obtenidos mediante mediciones actinométricas [58]. La solución de trabajo fue solución fisiológica estéril (agua destilada estéril con 0,9% de cloruro de sodio).

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

---

### TOMA DE MUESTRA

Una vez introducido el microorganismo en el reactor se encendió la agitación mecánica para que la muestra se homogenice en todo el volumen de trabajo. Una vez que ocurrió esto, se procedió a la toma de muestra del tiempo cero sin exposición a radiación (lámpara apagada). A continuación, se encendió la lámpara junto con el cronómetro y se tomaron muestras continuas en frasco color caramelo en los tiempos detallados a continuación: 6, 12, 18, 24, 30, 40 y 60 segundos. Los ensayos fueron hechos por triplicado siendo para todas las condiciones y microorganismos se procedió de la misma forma.

### RECUESTO DE MICROORGANISMOS VIABLES

Con las muestras tomadas a distintos tiempos se realizó el recuento de colonias viables en agar EMB y Cetrimide, según la cepa. Para ello se tomó un mililitro de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada bufferada, para sembrar luego 100  $\mu$ L en la superficie de las placas. Las mismas fueron incubadas invertidas durante 24 h a 37°C para luego proceder al conteo de las colonias formadas.

### MODELADO CINETICO DE REACTORES

Un modelo cinético que represente en forma matemática la velocidad de reacción de un proceso químico o fotoquímico es un requisito indispensable para diseñar un reactor/fotorreactor. Es común encontrar en la literatura expresiones de tipo global que, más allá de su utilidad fenomenológica, no son fácilmente extrapolables a cualquier otro tipo de reactor (geometría, tamaño, fuente, etc.) para llevar a cabo el diseño o cambio de escala [70]. Por esta razón la expresión debe tener desagregadas las dependencias con todas las variables representativas del proceso (concentraciones, pH, etc.) y del dispositivo (geometría, lámpara, reflector, etc.), estas últimas expresadas a través de la adecuada valoración de la LVRPA (fotorreacción). Concretamente, se busca una expresión con validez puntual e independiente del recinto de reacción (cinética intrínseca).

### MODELOS CINETICOS DE DESINFECCION

Un modelo cinético de desinfección, en esta tesis, desinfección de aguas, es una idealización simplificada de un proceso complejo en que participan diferentes fenómenos químicos, biológicos e hidráulicos. Con él se consigue obtener una expresión matemática

que facilita el diseño adecuado de un sistema de desinfección. En la Tabla 6 se encuentran expresados de forma breve los modelos más utilizados junto con sus ecuaciones cinéticas.

---

#### INDICE DE INACTIVACION (IINAC)

A partir del recuento bacteriano, puede determinarse como parámetro de la eficiencia del proceso un índice de nivel de inactivación:

$$IINAC = - \text{Log}(C_{(t)}/C_0) \quad \text{Ec.15}$$

Donde la  $C_0$  representa la concentración inicial de microorganismos y  $C_{(t)}$  la concentración a un tiempo determinado. Este parámetro determina cuantos órdenes ha descendido la concentración de bacterias a un tiempo dado. El parámetro es tradicionalmente utilizado y deriva de la solución de una expresión cinética de primer orden con respecto a la concentración de microorganismos, como la cinética de Chick y Watson [71,72].

---

#### ANALISIS MOLECULAR

---

##### REACCION DE ERIC-PCR

Para realizar el análisis molecular se seleccionaron las muestras tomadas a distintos tiempos. Para obtener la cantidad necesaria de ADN para las amplificaciones, las muestras fueron concentradas en microtubos de 1,5 ml mediante una serie de centrifugaciones de 10 minutos a 15000 rpm en una microcentrífuga DragonLab® D2010 plus. Tras la última centrifugación de la serie, el sobrenadante fue descartado y se agregó a cada microtubo 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril con el objetivo de resuspender el pellet celular obtenido. Las muestras fueron incubadas luego, en un baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Cumplido este tiempo de incubación, se realizó una última centrifugación (15000 rpm por 10 minutos) y el sobrenadante conteniendo el ADN total (extraído) fue transferido a un microtubo estéril para medir su concentración espectrofotométricamente a 260/280 nm.

Una vez determinada la masa de ADN presente en las muestras se procedió a realizar la ERIC-PCR. Se tomaron microtubos de 200  $\mu\text{l}$  y se les colocó: 9  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas (MiliQ Promega Biodynamics); 12,5  $\mu\text{l}$  de GoTaq Green MMix (Promega Biodynamics), concentración final 1X; 1  $\mu\text{l}$  MixPrimers (Forward/ Reverse), concentración



final 0,4  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{l}$  de la muestra de ADN, completando un volumen final de reacción de 25  $\mu\text{l}$  [28].

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), con un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; seguido de 29 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. Al finalizar los ciclos de amplificación se realizaron las correspondientes electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio (1  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) que fueron registrados bajo iluminación con luz UV y analizados con el software libre ImageJ/FIJI (NHI, USA).

---

#### CALCULO DEL INDICE DE DAÑO DEL DNA (IDADN)

A partir de las fotografías de los geles de agarosa, mediante el software ImageJ/FIJI, se obtuvieron las densitometrías de los fragmentos amplificados para producir información semi-cuantitativa del proceso. Para ello se calculó el área debajo de los picos generados para cada banda del patrón de ERIC y se expresaron como el total de áreas obtenidas por muestra. El daño producido al ADN reduce su capacidad de ser amplificado, por lo tanto, las muestras con mayor nivel de daño sufrirán una menor amplificación que se reflejará en una disminución del área total. A fin de hacer más evidente la cinética de las posibles alteraciones en el DNA luego de someter las muestras a una fuente de radiación UV a diferentes tiempos, definimos para este trabajo un Índice de daño al ADN (IDADN) como:

$$\text{IDADN} = -\text{Log} (\text{AT}_{(t)}/\text{AT}_0)$$

**Ec. 16**

Donde  $\text{AT}_{(t)}/\text{AT}_0$  es la relación del área total de la calle del gel correspondiente a un tiempo dado, con el área total inicial a tiempo cero. Definiendo  $\text{AT}_{(t)}$  como la sumatoria de todas las áreas de las bandas de ADN amplificadas para un tiempo  $t$  de muestreo y  $\text{AT}_0$  como la sumatoria de las áreas de las bandas de ADN obtenidas tras la amplificación por ERIC-PCR en el tiempo cero del experimento antes de encender la lámpara UV.

**Tabla 6.** Breve descripción de los principales modelos cinéticos y presentación de sus ecuaciones finales.

Nombre del Modelo	Descripción	Ecuación final	Citas
Chick	La ley de Chick expresa la velocidad de inactivación de microorganismos mediante una expresión correspondiente a una reacción química de primer orden. La expresión es válida bajo las siguientes condiciones: población homogénea de microorganismos (cultivo puro); reactores de flujo pistón o sistemas «batch» de mezcla completa; distribución homogénea de desinfectante; concentración de desinfectante constante a lo largo del tiempo. La constante k es válida para una determinada concentración de desinfectante.	$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = -kt$	[71,73]
Chick-Watson	Este modelo relaciona la constante de inactivación (k) con la concentración de desinfectante. Donde n es el término del coeficiente de dilución y k' es independiente de la concentración de desinfectante, y teniendo en cuenta la ecuación, también es independiente de la concentración de microorganismos.	$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = -k'tC^n t$	[72]
Collins y Selleck	El propósito del modelo es graficar los microorganismos sobrevivientes (N/No) versus el producto de la concentración y tiempo (Ct) y no versus el tiempo solo.	$\frac{N}{N_0} = \left( \frac{Ct}{\tau} \right)^{-n}$ para $Ct > \tau$	[74]
Hom	Desarrolló una formulación cinética flexible y empírica para la velocidad de inactivación basada en la modificación del modelo de Chick-Watson.	$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t^m$	[75]
Modificación al modelo de Hom (Cho y col., 2003)	Propusieron una modificación del modelo de Hom original que puede simplificarse en la siguiente ecuación cuando la concentración de desinfectante permanece constante: Los parámetros del modelo hacen posible el ajuste de los datos de desinfección con curvas que presentan tres regiones diferentes correspondientes a un "hombro" inicial, una zona de desinfección lineal y una "cola" final.	$\text{Log} \frac{N}{N_0} = -k_1 [1 - \exp(-k_2 t)]^{k_3}$	[76]
Severin cinética de segundo orden	En la cinética de segundo orden de mezclado, la velocidad de inactivación es también de primer orden con respecto a la densidad de organismos sobrevivientes. Cuando se quiere representar en gráficas semi logarítmicas la fracción de sobrevivientes versus exposición UV, las curvas de inactivación en sistemas batch son lineales.	$\frac{N}{N_0} = e^{-k_q \cdot t}$	[77,78]
Severin Cinética Multi-target	Se ha utilizado para describir la resistencia inicial de los microorganismos a la inactivación UV. En el desarrollo de este modelo, se asume que una partícula contiene un número finito, $n_c$ , de targets o blancos críticos discretos, cada uno de los cuales debe ser previamente atacado para lograr la inactivación total de una "partícula". Una partícula puede representar un organismo con $n_c$ targets críticos o un grupo de organismos que posee un total de $n_c$ targets.	$\frac{N_t}{N_0} = 1 - \left( 1 - 10^{-kF} \right)^{n_c}$	[78,79]
Geeraerd	Considera los efectos del hombro y la cola. En esta ecuación $N_{res}$ es la concentración microbiana de una subpoblación específica, más resistente o que aparece como resultado de artefactos experimentales (UFC o UFP / ml), k es el máximo constante de tasa de inactivación de componentes críticos, dada como la pendiente de la parte lineal ( $\text{cm}^2 / \text{mJ}$ ), y $t_i$ es la longitud del hombro ( $\text{mJ} / \text{cm}^2$ ), que se puede obtener dividiendo el valor de la intersección en y de la parte lineal con la k.	$\frac{N_t}{N_0} = 10^{-kF} \left( 1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) \left( \frac{10^{kt_i}}{1 + (10^{k(t_i-t)} - 10^{-kt})} \right) + \frac{N_{res}}{N_0}$	[80]

RELACION ENTRE INDICES: SUSCEPTIBILIDAD DEL ADN

Se puede definir la relación entre ambos índices como

$$\zeta = \frac{IDADN}{IINAC}$$

Ec. 17

El análisis de este parámetro a priori, puede hacerse de la siguiente manera, para alcanzar un determinado nivel de inactivación, establece cuanto cambio en el ADN requieren las bacterias. De esta manera puede decirse que es un factor que determina la sensibilidad o susceptibilidad del ADN frente al ataque del agente desinfectante durante el tratamiento de inactivación. Es importante aclarar que no es la sensibilidad del microorganismo.

Con respecto a su valor, si este parámetro es bajo, implica que, a pesar de sufrir pocos cambios en el ADN, se llega a un alto nivel de inactivación. Un valor muy bajo, implicaría que: (i) la inactivación no se produce necesariamente por cambios en el ADN, o (ii) se necesitan pequeños cambios en el ADN para que se produzca la inactivación. Las dos alternativas indicarían que pueden existir otros targets de ataque hacia el microorganismo por parte del agente desinfectante. El mal uso de este parámetro puede llevar a análisis erróneos, por lo que debe utilizarse con precaución. Su empleo sería muy útil, en principio, para comparar la sensibilidad del ADN de microorganismos similares (ataque a target similares) frente a un mismo tratamiento, o por otro lado determinar la sensibilidad del ADN para un mismo microorganismo utilizando distintos tratamientos (pondría en evidencia la existencia de posibles puntos de ataque diferentes).

Si cada uno de los índices depende del nivel de radiación utilizado, esto no significa que, desde el punto de vista cinético, ambos índices tengan la misma dependencia. De tener la misma dependencia implicaría que el parámetro  $\zeta$  (sigma) es independiente prácticamente del nivel de radiación (por lo menos en el rango de intensidades utilizadas en los ensayos). En estos casos, la utilidad de este parámetro es de suma importancia y de una novedosa aplicación práctica, como se verá más adelante.

---

ANALISIS ESTADISTICO

Los recuentos bacterianos de los ensayos de inactivación, realizados por triplicado para cada condición de trabajo, fueron estudiados utilizando análisis de varianza (ANOVA) con

el paquete de software estadístico Minitab 18. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

Se calculó la varianza de las áreas obtenidas de los geles de agarosa por densitometría realizada previamente con el programa ImageJ/FIJI. Tomamos los valores de área calculados para todas las bandas (desde 2000 a 150 pb) y comparamos el cambio que se produjo a través del tiempo de inactivación, para cada una de ellas, incluyendo el valor en el tiempo cero (sin radiación UVC). Este procedimiento fue realizado para todas las condiciones de radiación y los patrones de bandas generados para ambas cepas en estudio, mediante la opción de análisis de estadísticas básicas que provee el programa Minitab 18.

## RESULTADOS Y DISCUSION

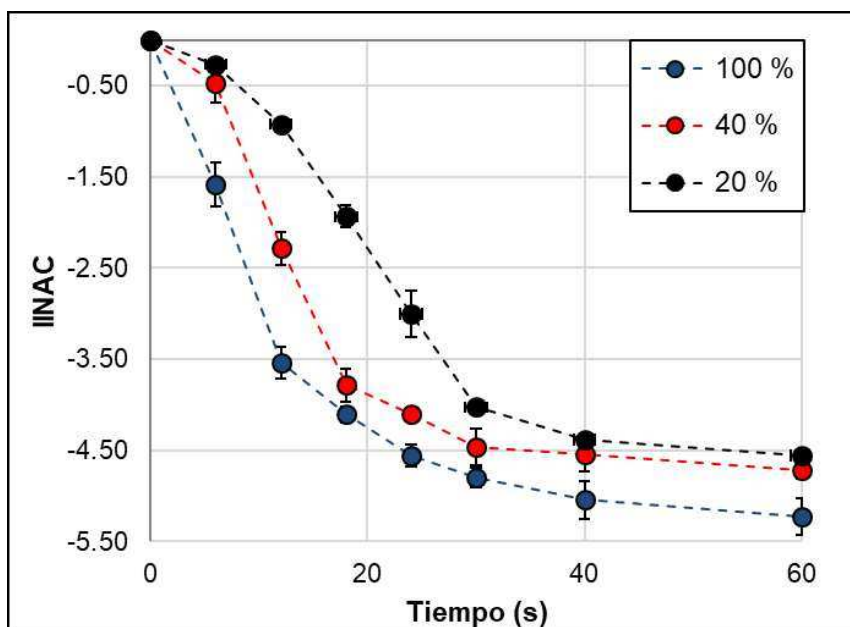
---

### INACTIVACION DE *ESCHERICHIA COLI*

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 se graficó el cambio en la concentración bacteriana de *E. coli* ( $\log (C/C_0)$ ) en función del tiempo (s). En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos.

La Figura 19 muestra los ensayos experimentales utilizando radiación UV a distintas intensidades (20, 40 y 100%). Se observa una diferencia significativa de los recuentos a partir de los 12 segundos de exposición a UV con una unidad logarítmica de diferencia entre cada tratamiento ( $P < 0.05$ ). La mayor diferencia se encuentra comparando las condiciones de 100 y 40% de radiación, respecto a la condición de 20% de radiación, al menos entre los 6 y 40 segundos de tratamiento. Respecto al análisis del comportamiento de las curvas, se observó que utilizando el 100% de radiación UV, el comportamiento es prácticamente lineal en sus inicios (hasta los 30 segundos) y luego se manifiesta la presencia de una "cola". Para las curvas obtenidas utilizando el 40 y 20% de radiación en los primeros 6 segundos se observa además un hombro. Se cree que la fase del hombro está asociada con mecanismos de reparación del ADN, o que podría surgir del requisito de varios golpes (sitios de daño del ADN) antes de que un microorganismo se inactive [77]. La formación de la "cola" se puede explicar considerando que las células que fueron afectadas en los primeros segundos de reacción (células no cultivables) quedan suspendidas en el medio,

comportándose como material en suspensión que sigue absorbiendo fotones. El resultado de esto es, por lo tanto, un enmascaramiento de las pocas células que aún permanecen cultivables reduciéndose la eficiencia de la desinfección y provocando el cambio en la pendiente de la curva. Este fenómeno se hace evidente por el hecho de trabajar en condiciones de alta concentración de microorganismos (en el orden de  $10^7$  UFC/ml). Este tipo de comportamiento o forma de la curva de inactivación con cola fue observada en distintos trabajos cuando existe la presencia de material suspendido en el efluente o agua a tratar [48,81–84]. Otras explicaciones para la presencia de las colas en las curvas de inactivación podrían ser el fenómeno de golpes múltiples y la existencia de diferentes tipos de células bacterianas más resistentes (población heterogénea) [85].



**Figura 19.** Inactivación de *E. coli* con las tres intensidades de radiación UVC utilizadas

#### ANÁLISIS DEL DAÑO AL ADN DE *ESCHERICHIA COLI*

En la Figura 20 se muestran resultados representativos de las electroforesis en gel de agarosa. Allí se pueden observar los perfiles de bandas de las muestras analizadas tras la utilización de una lámpara UV germicida con distintos niveles de radiación.

Cualitativamente, para todas las intensidades de fotones usadas (Figura 20) se observó una modificación del patrón de bandas de la ERIC-PCR, en función del tiempo de exposición. Esta modificación se manifestó como la desaparición de las bandas mayores a

900 pb en todos los casos. Además, se pudo observar que las bandas de tamaño menor a 900 pb se comportaron de manera diferente ya que sufrieron alteraciones en sus densidades ópticas a lo largo del tratamiento, pero nunca dejaron de revelarse en el gel.

Cuando se utilizó la lámpara con el 100% de radiación se tardaron sólo 12 segundos para que las bandas de mayor tamaño dejaran de revelarse en el gel (con excepción de la de 900 pb). En cambio, para obtener el mismo resultado con 40 y 20% de radiación se tuvo que irradiar el microorganismo durante 40 y 60 segundos respectivamente. Otros autores utilizando diferentes técnicas como qPCR, RADP-PCR, REP-PCR y PCR punto final, llegaron a obtener similares resultados trabajando con radiación UV, donde el daño se manifestó en las bandas de mayor tamaño molecular y las más pequeñas permanecieron inalteradas durante el proceso. Además de llegar a la conclusión común de que la falta de visualización de las bandas en los geles de agarosa está directamente relacionado con la inhibición de la amplificación del ADN por parte de la enzima TAq polimerasa [26,54–57].

---

#### ANALISIS DE RESULTADOS PARA *ESCHERICHIA COLI*

---

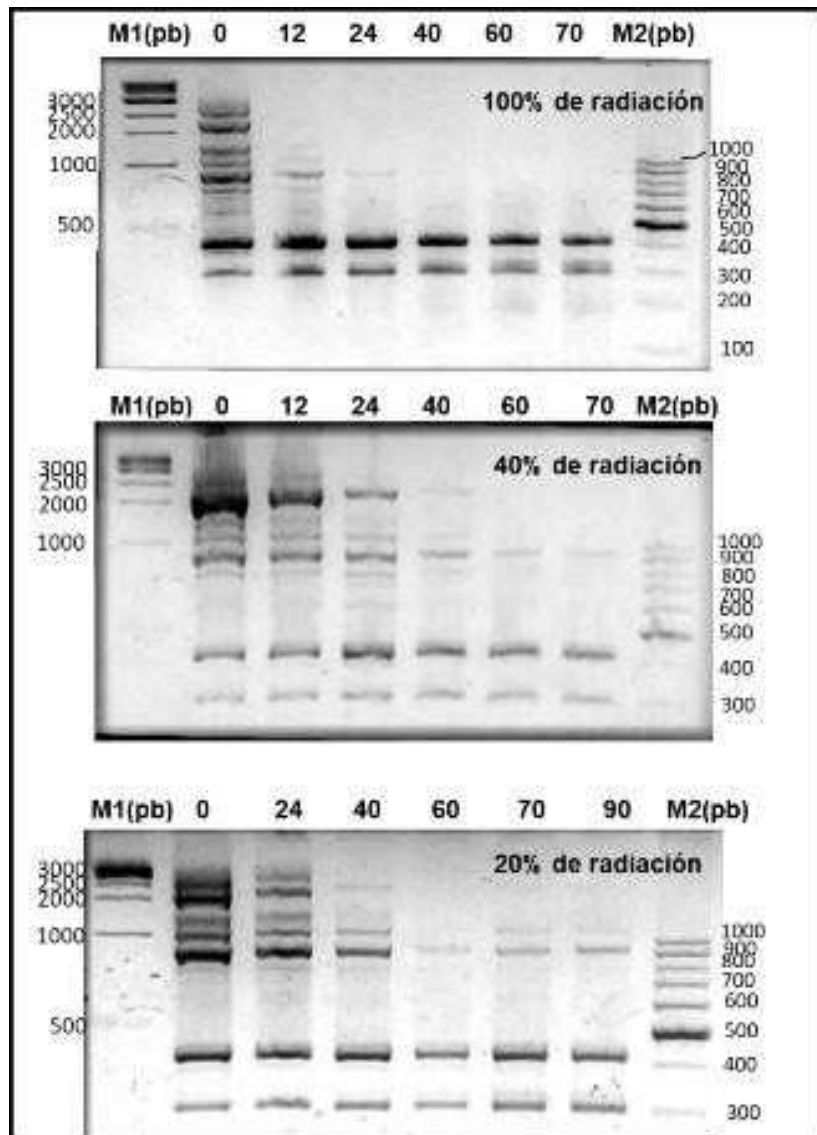
##### CALCULO DEL INDICE DE DAÑO AL ADN (IDADN)

Se realizaron densitometrías de las bandas de los geles de agarosa con el patrón de ERIC-PCR utilizando programa ImageJ/FIJI (Figura 21). El empleo de esta herramienta nos brindó la posibilidad de poder obtener datos cuantitativos (área densitométrica de las bandas generadas), con los cuales se desarrollaron todos los análisis matemáticos que se detallan a lo largo de esta tesis respecto al daño del ADN bacteriano.

Con los resultados obtenidos en los geles de agarosa, luego de la obtención de las áreas correspondientes, fue realizado el cálculo de varianza (Tabla 7) utilizando el programa Minitab18 con el objetivo de realizar un análisis exploratorio del comportamiento de las bandas obtenidas de la ERIC-PCR. Esto permitiría relacionar el daño producido al ADN con el proceso de inactivación bacteriana.

Los resultados indican que las bandas que más variación sufrieron a nivel global fueron las de 900 y 1500 pb, coincidentemente con lo obtenido por Nirzi y col., 2017 [26] quienes encontraron la misma variación en este par de bandas al trabajar con una cepa de *E. coli*. A fin de explorar comportamientos de las bandas, se realizaron gráficas para cada nivel de radiación utilizado, que muestran la variación de las áreas de las bandas obtenidas de las

fotografías de los geles de agarosa luego de la amplificación por ERIC-PCR a través del tiempo durante el ensayo de inactivación. En la Figura 22 se muestran las mencionadas evoluciones, para la corrida utilizando el 100% de radiación.



**Figura 20.** Imágenes de las electroforesis en geles de agarosa al 1,5% para los perfiles de ERIC-PCR de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 luego de ser expuesta a las tres intensidades de radiación UVC. M1 y M2 son los marcadores de tamaño molecular. Los números sobre las calles indican los tiempos, en segundos, a los cuales fueron tomadas las muestras.

## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

**Tabla 7.** Varianzas de las áreas de cada banda del patrón de ERIC-PCR obtenido del ADN de *E. coli*, en el tiempo para los tres niveles de radiación empleados.

Niveles de Radiación	Varianza de las áreas de cada banda (x10 <sup>-5</sup> )							
	300 pb	400 pb	800 pb	900 pb	1000 pb	1200 pb	1500 pb	2000 pb
100%	4.40	27.57	4.47	51.44	6.62	12.29	32.59	29.04
40%	2.42	4.00	0.30	40.88	7.87	8.10	41.49	55.94
20%	0.09	3.82	0.92	30.53	4.41	3.69	212.88	0.39

El análisis evidencia dos tipos de comportamientos, las bandas de más de 900 pb tienen un comportamiento similar, donde sus áreas disminuyen con el tiempo de tratamiento, mientras que para las bandas de 300 y 400 pb se observó un comportamiento totalmente distinto. En los primeros segundos de tratamiento, se puede apreciar claramente cómo hay un aumento del área de estas bandas pequeñas, para luego mantenerse prácticamente en un mismo valor. Esto implica que, de tener que seleccionar bandas para el seguimiento del daño, las bandas mayores a 900 pb son las más indicadas para cumplir este objetivo, confirmando el resultado obtenido empleando el estadístico de varianza.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, fue realizada una comparación de los índices de niveles de inactivación (INAC) definido en la ecuación 15, con los índices de nivel de daño (IDADN) definido en la ecuación 16, a lo largo del proceso de desinfección para cada condición estudiada (Figura 23).

Se procedió entonces a obtener una relación entre el daño aparente en el ADN (reflejado en los cambios de los valores de densidad óptica relativa de los productos de amplificación por ERIC-PCR) y la inhibición en el crecimiento bacteriano (mediante recuento en placa) durante el tratamiento con UVC.

Se puede observar claramente que existe una correlación directa entre los índices de nivel de inactivación y el nivel de daño presentando el mismo comportamiento, permitiendo establecer una relación directa entre el descenso del número células cultivables y la variación en las áreas de las bandas de ADN. El comportamiento aquí presentado guarda relación con lo observado por Nizri y col. 2017 [26], quienes propusieron la amplificación de dos fragmentos del gen rRNA 16S (uno de 900 y otro de 1500 pb) para verificar *in situ* la eficacia de un sistema de tratamiento de aguas basado en UV. Como resultado de la amplificación de estos dos fragmentos llegaron a la conclusión de que existía una relación



lineal entre el daño producido al ADN y la inactivación de los microorganismos, lo cual expresaron como un factor de daño relacionando ambos parámetros a través del concepto de dosis. Oguma y col., 2001 [29] por su parte, también pudieron lograr, mediante la implementación de la técnica de ESS (ensayo de endonucleasa de sitio específico sensible) que corta la molécula donde se encuentran los dímeros de pirimidina, una relación lineal entre la formación de dímeros de timina y la inactivación de los microorganismos.

Como paso siguiente, se representa en la Figura 24 la relación entre los índices de daño (IDADN) y el nivel de inactivación (IINAC), para cada nivel de radiación utilizado.

Se puede observar la existencia de una relación lineal entre el nivel de daño (IDADN) y el nivel de inactivación (IINAC). Las pendientes de las rectas de ajuste representan los valores del parámetro sigma ( $\zeta$ ). Por otro lado, se observa que, para los tres niveles de radiación, el valor de  $\zeta$  es prácticamente el mismo (las tres rectas se superponen casi en su totalidad). Los valores de  $\zeta$  están en el rango de 0.0556-0.0592, con una diferencia del 6.5%. Esto nos permite asumir que la relación entre los índices, es decir el parámetro sigma, es independiente al nivel de radiación (para el rango de radiación utilizado). En la Figura 25 se representa la recta de ajuste global.

Finalmente, se obtiene la siguiente relación entre los índices de daño (IDADN) y el nivel de inactivación (IINAC):

$$\text{IDADN} = (0.0568) * \text{IINAC}$$

**Ec. 18**

CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

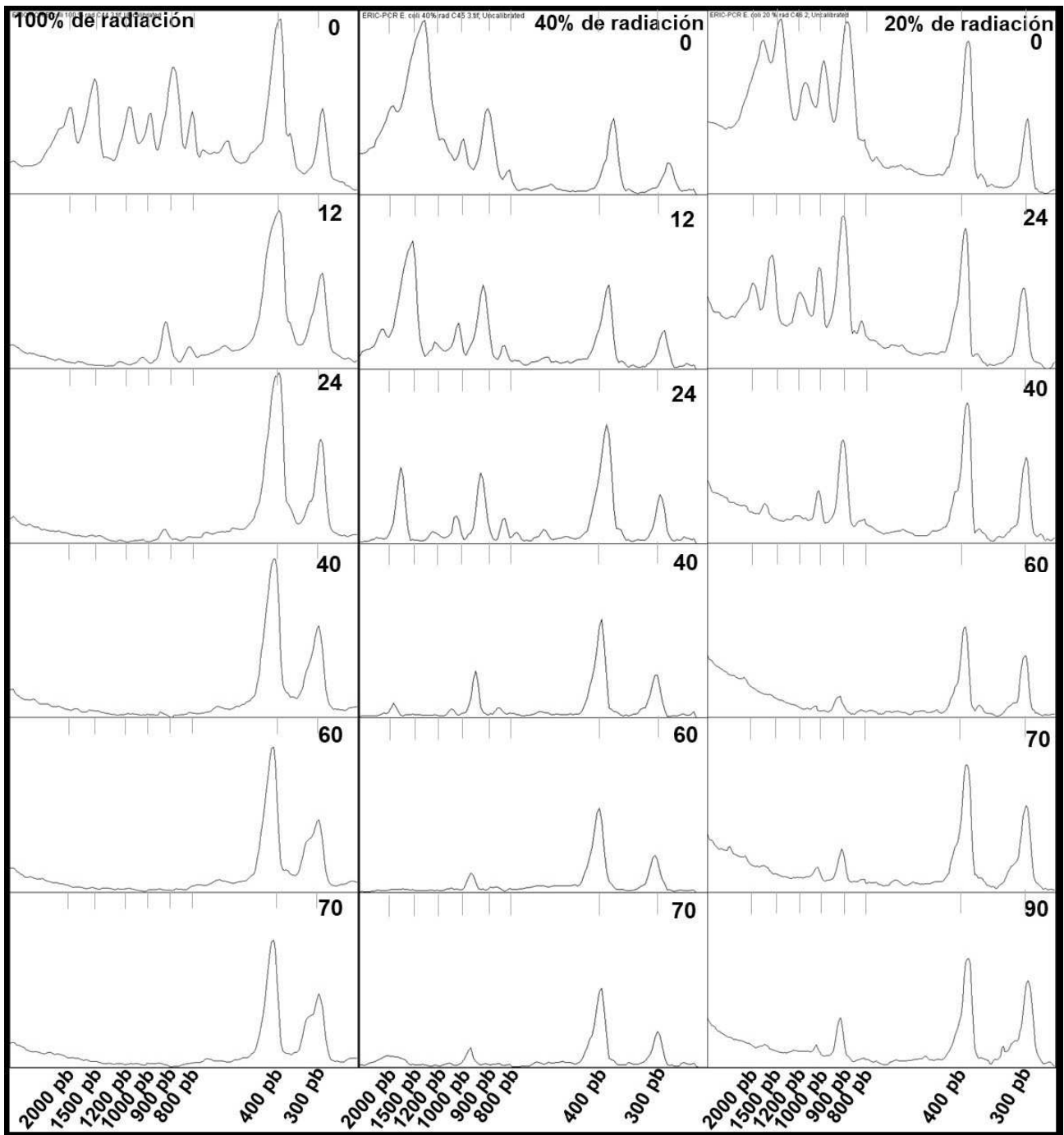
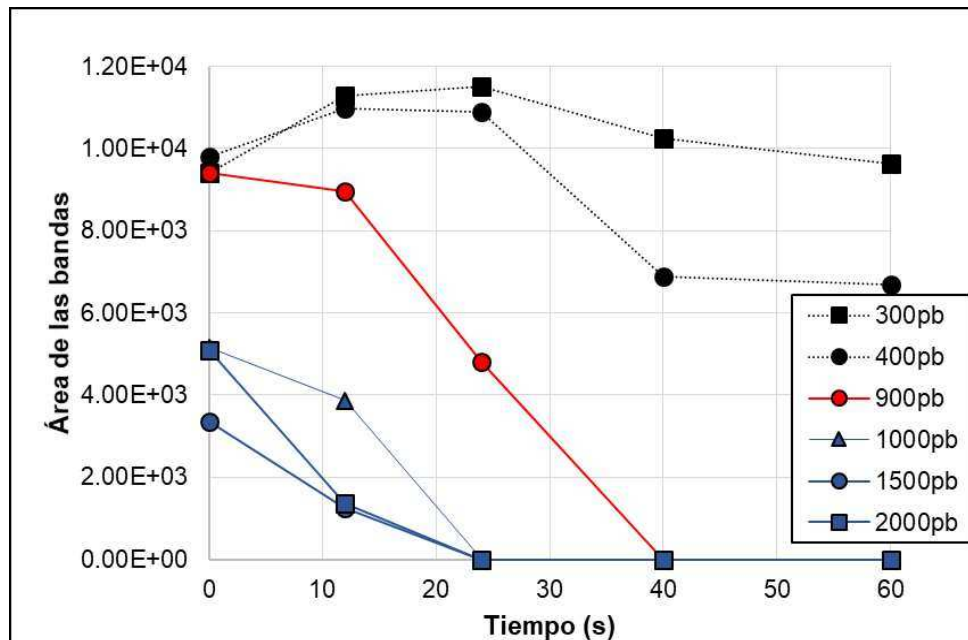
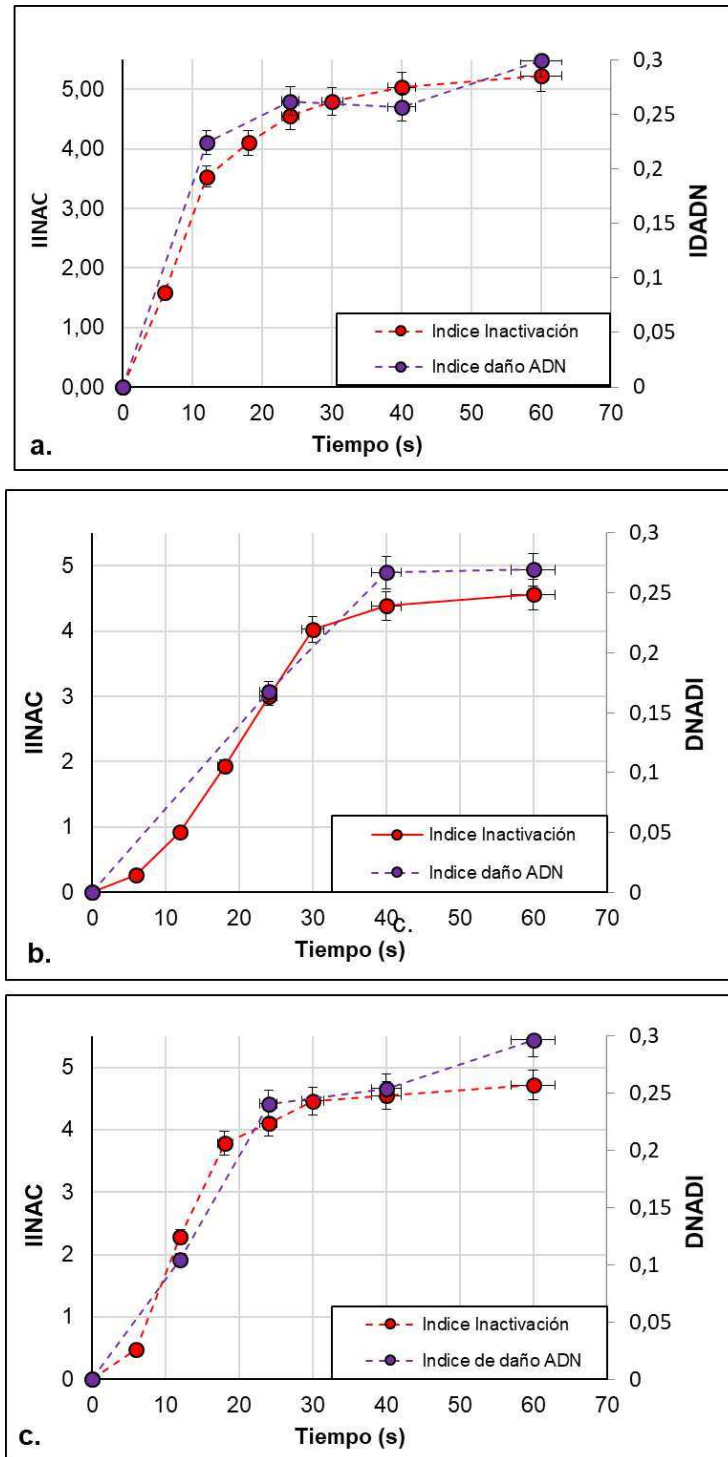


Figura 21. Densitometría generada con el programa ImageJ/FIJI, a partir de los geles de agarosa con el patrón de amplificación de ERIC-PCR para la cepa de *E. coli* luego de los tratamientos con UVC. Los números indican los tiempos de muestreo en segundos.



**Figura 22.** Evolución del área de las bandas obtenidas de las fotografías de los geles de agarosa luego de la amplificación por ERIC-PCR del ADN de *E. coli* durante el tiempo de exposición a 100% de radiación UVC.

Según la recopilación de datos hasta el momento no hay antecedentes en la obtención de la correlación entre la inactivación bacteriana y el daño sufrido en el ADN utilizando la técnica ERIC-PCR. Esta estrategia de análisis del daño sobre el DNA se podría presentar como una alternativa más práctica a los tradicionales y laboriosos métodos de cultivo. Por otra parte, una ventaja adicional de la ERIC-PCR es que no es necesario seleccionar secuencias o genes específicos para evaluar el daño. Esta técnica ofrece un panorama global sobre el daño al ADN bacteriano producido por la incidencia de la radiación UV sobre el mismo, ya que ésta influye de manera masiva y daña a la molécula en todos los sitios blancos disponibles a lo largo de ella (principalmente las bases pirimidínicas) [26]. Es por este motivo que, al realizar el estudio sobre la variación total de las áreas obtenidas para cada tiempo de muestreo, la regresión lineal resultante es muy confiable (siendo el valor de R cercano a 0.9168). Además, las bandas de menor peso molecular que fueron detectadas como no representativas del efecto a la exposición a la radiación, podrían funcionar como un control interno de la amplificación del ADN presente en la muestra. Lo que confirmaría, de esta manera, que la inhibición de la amplificación del ADN se debe sólo al daño estructural producido por la radiación y no a la falta de ADN molde.



**Figura 23.** Evolución del índice de inactivación (IINAC) y del índice de daño (IDADN) para la cepa de *E. coli*, a través del tiempo de exposición a UVC para: a.100, b. 40 y c. 20 % de radiación.

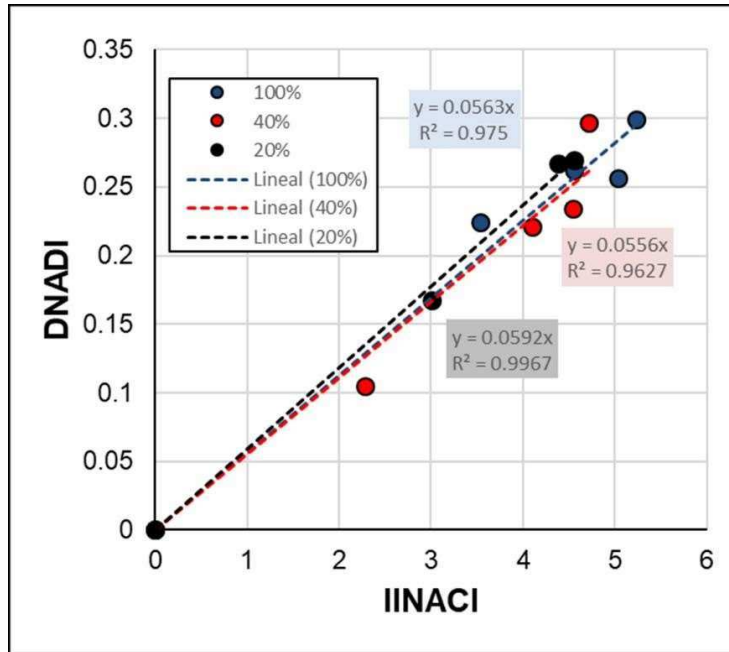


Figura 24. Gráfica de correlación IINAC vs IDADN para *E. coli*

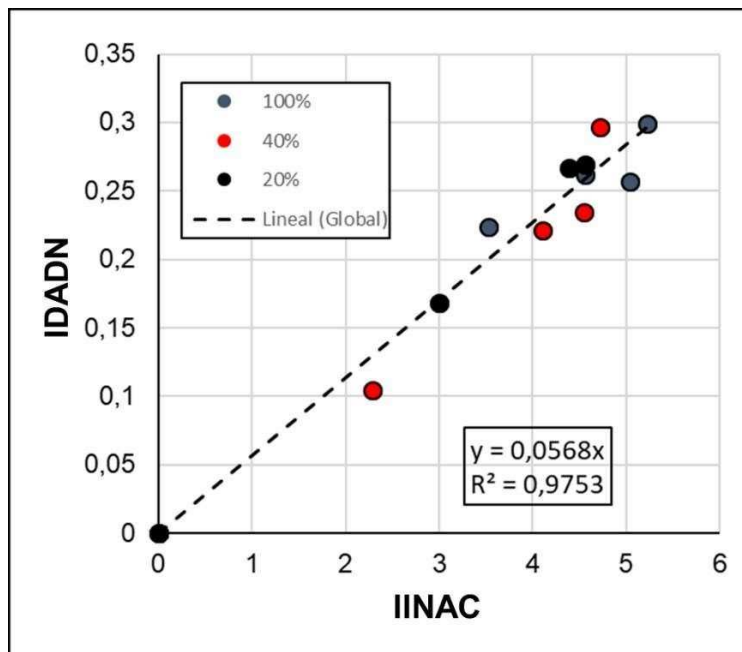
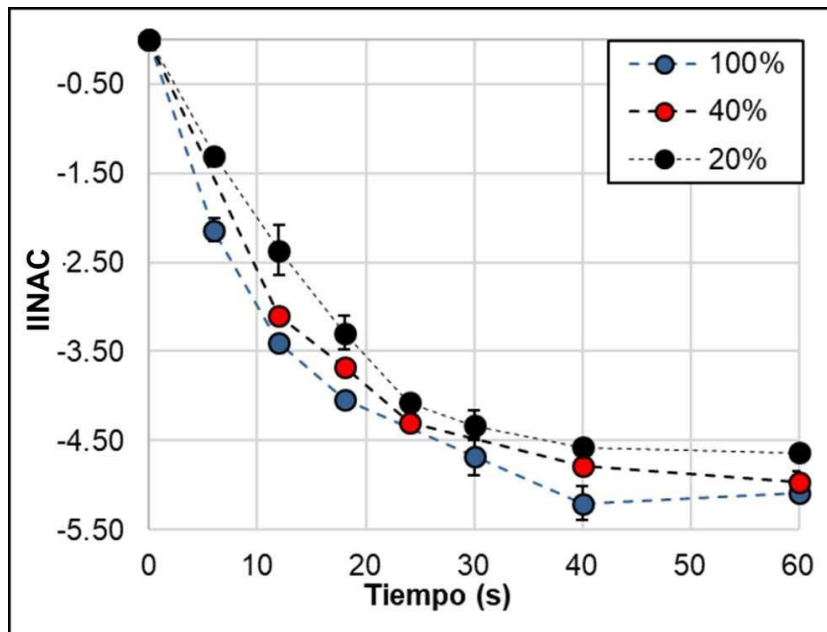


Figura 25. Se representa la recta de ajuste global incluyendo los resultados de todas las corridas realizadas para *E. coli*.

INACTIVACION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

La Figura 26 muestra el cambio en la concentración bacteriana de *P. aeruginosa* ( $\log(C/C_0)$ ) en función del tiempo (s) utilizando radiación UVC a tres intensidades, 20, 40 y 100%.

El análisis de varianza (ANOVA) que se realizó a los recuentos de microorganismos viables obtenidos, arrojó diferencias no significativas entre los grupos de datos de los tres tratamientos empleados, siendo  $P > 0.05$  en todos los casos. Esto indica que si bien se observa una disminución de la eficiencia de la desinfección a medida que disminuye la intensidad de radiación, esta variación es mínima, revelando una alta sensibilidad de este microorganismo al agente físico desinfectante. Similares resultados fueron obtenidos por Zhang y col., 2015 [86] y SúB y col., 2009 [56], que obtuvieron una mayor eficiencia del tratamiento con radiación UV para cepas de *P. aeruginosa* frente a las de *Enterococcus faecium* y *E. coli*.



**Figura 26.** Curvas de inactivación para *P. aeruginosa* para las tres intensidades de radiación UVC utilizadas.

Las curvas de inactivación exhiben un comportamiento lineal en sus inicios, hasta los 10-20 segundos, y luego se observa la tendencia a la formación de una “cola” para las tres intensidades estudiadas. La formación de una “cola” se puede explicar considerando que las células que fueron afectadas en los primeros segundos de reacción (células no cultivables) quedan suspendidas en el medio, comportándose como material en suspensión

que sigue absorbiendo fotones. El resultado de esto, por lo tanto, es un posible enmascaramiento de las pocas células que aún permanecen cultivables dificultando así la llegada de fotones a las mismas, reduciéndose la eficiencia de la desinfección y provocando el cambio en la pendiente de la curva. MiLee y col., 2015 [81] y Gehr y col., 2003 [82], comprobaron que la eficiencia de la desinfección con radiación UV disminuyó con el aumento de material suspendido en efluentes a medida que trascurrieron los cambios de estación. Estudios previos demuestran una disminución logarítmica similar a la obtenida para tratamientos de desinfección con UVC [83,86]. Además, la presencia de la “cola” se puede explicar debido a bacterias individuales resistentes dentro de la población estudiada o también debido a que el agente desinfectante debe dañar cierta cantidad de veces al microorganismo para que el daño sea consecuencia de pérdida de viabilidad [85].

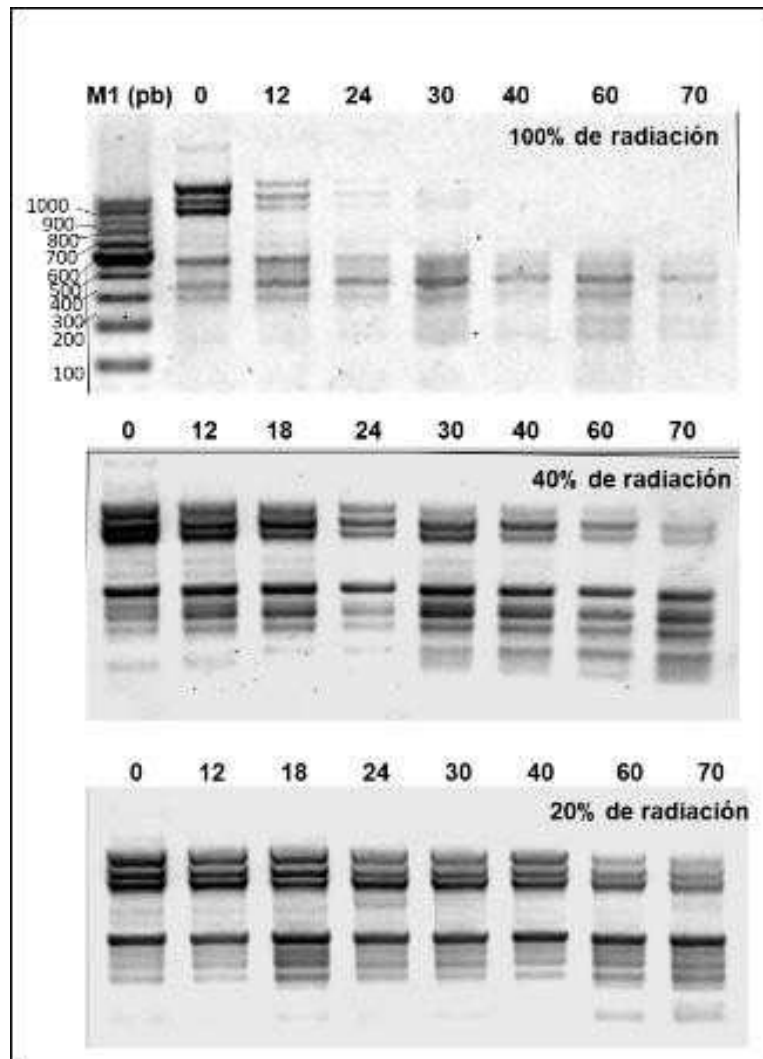
---

#### ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

En la Figura 27 se muestran resultados representativos de las electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones por ERIC-PCR para *P. aureoginosa*, tras ser expuestas a tres niveles de radiación UV germicida (100, 40 y 20%).

Cualitativamente, para todas las intensidades de fotones usadas (Figura 27) se observó una modificación del patrón de bandas de la ERIC-PCR, en función del tiempo de exposición. Esta modificación, que manifiesta el daño producido hacia el ADN, se expresa como una disminución de la eficiencia de la PCR. La desaparición total de las bandas de tamaño mayor a 500 pb cuando la radiación fue del 100% se manifestó a los 40 segundos. Cuando se utilizó el 40 y 20% de radiación, las bandas de mayor peso molecular continuaron amplificándose a tiempos más prolongados de exposición. Estos resultados coinciden con los de otros autores que observaron que el efecto de la radiación UVC se manifiesta principalmente en la desaparición de las bandas de mayor longitud y que este fenómeno está fuertemente asociado al proceso de desinfección [26,54–57].

Además, se puede observar que para esta cepa ocurre otro fenómeno, la aparición de bandas de tamaño molecular menor a 300 pb a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación. Este fenómeno se hace más evidente cuando es aplicado el 40% de radiación y sucede al mismo tiempo que las bandas de mayor longitud de pares de bases pierden intensidad al avanzar el tratamiento en el tiempo.



**Figura 27.** Imágenes de los geles de agarosa con los perfiles de ERIC-PCR para *P. aeruginosa* luego de ser expuestas a las tres intensidades de radiación UVC. M1 es el marcador de tamaño molecular. Los números sobre las calles indican los tiempos, en segundos, a los cuales fueron tomadas las muestras.

#### ANALISIS DE RESULTADOS PARA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

##### CALCULO DEL INDICE DE DAÑO AL ADN (IDADN)

Para poder comenzar un análisis semicuantitativo, se tomaron las imágenes de los geles de agarosa y se calcularon las varianzas de las áreas de los fragmentos de ADN amplificados. Esto se realizó mediante análisis densitométrico con el programa ImageJ/FIJI (Figura 28). El resultado de este análisis fue volcado en la Tabla 8, aquí se puede observar cómo las bandas de ADN que más varían son las de 900, 1000 y 1100 pb, que a su vez



## CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC

son las de mayor tamaño para nuestra cepa de *P. aeruginosa*. Estos valores coinciden con lo reportado por Nizri y col, 2017 [26] que encontraron que la banda de 900 pb era la más adecuada para el seguimiento de la desinfección con UVC, en la cepa de *Pseudomonas* con la que trabajaron, ya que variaba acorde al proceso de desinfección.

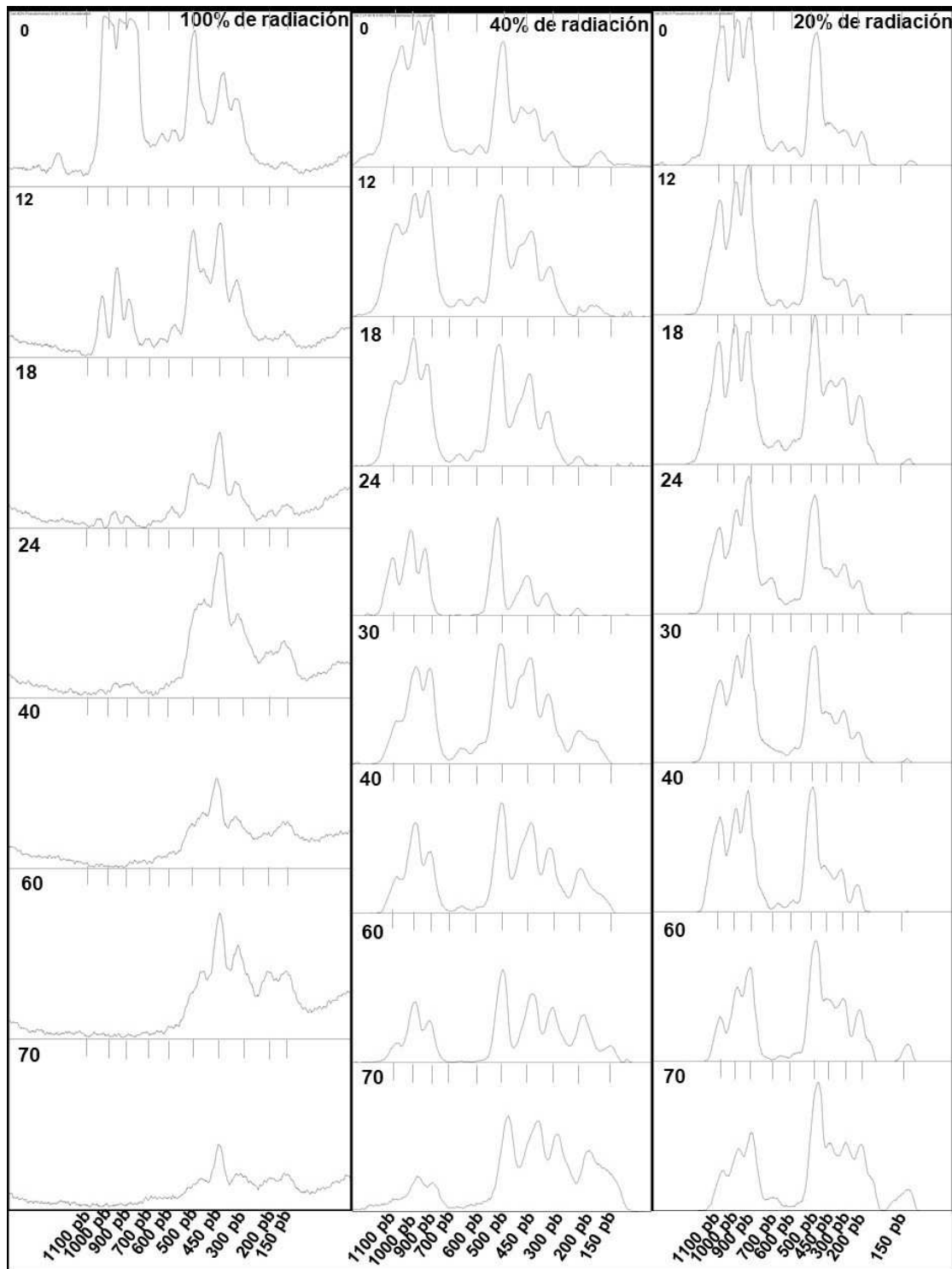
Por otro lado, cuando se usó 100 y 40 % de radiación se observó también una gran variación de la banda más pequeña conformada por 150 pb, que no fue amplificada en los geles de 20% de radiación.

**Tabla 8.** Varianzas de las áreas de cada banda del patrón de ERIC-PCR de *P. aeruginosa* durante el tiempo de exposición, para los tres niveles de radiación empleados.

Niveles de Radiación	Varianza de las áreas de cada banda ( $\times 10^{-5}$ ) (pb)									
	150	200	300	450	500	600	700	900	1000	1100
100%	118,89	60,49	79,47	213,31	422,26	3,3	0,69	246,37	307,06	697,61
40%	162,31	506,41	467,69	244,38	34,85	13,98	6,15	484,21	550,4	934,82
20%		50,02	128,15	40,53	47,32	0,14	0,91	142,53	133,56	423,74

En la Figura 29 se puede observar cómo varían las áreas de las bandas del gel de agarosa que se obtuvo luego de irradiar la cepa con el 100% de radiación. Mediante esta gráfica pudimos confirmar lo obtenido del análisis de las varianzas (Tabla 8). Notamos tres comportamientos diferentes: a) las bandas de mayor tamaño molecular (1100, 1000 y 900 pb) disminuyen en su densidad óptica a medida que transcurre el proceso de desinfección hasta los 24 segundos donde ya no se desarrollan en el gel; b) por otro lado ocurre el fenómeno contrario para las bandas de 150 y 200 pb debido a que comienzan a revelarse en el gel a los 24 segundos del proceso de inactivación y desde ese punto aumentan sus áreas hasta el final del tratamiento y c) un grupo de bandas de peso molecular intermedio (450, 500, 600 y 700 pb) que varían en sus áreas a lo largo del proceso con tendencia a disminuir a medida que avanza el tiempo, pero de una forma que parece no acompañar directamente al proceso de desinfección que se lleva adelante.

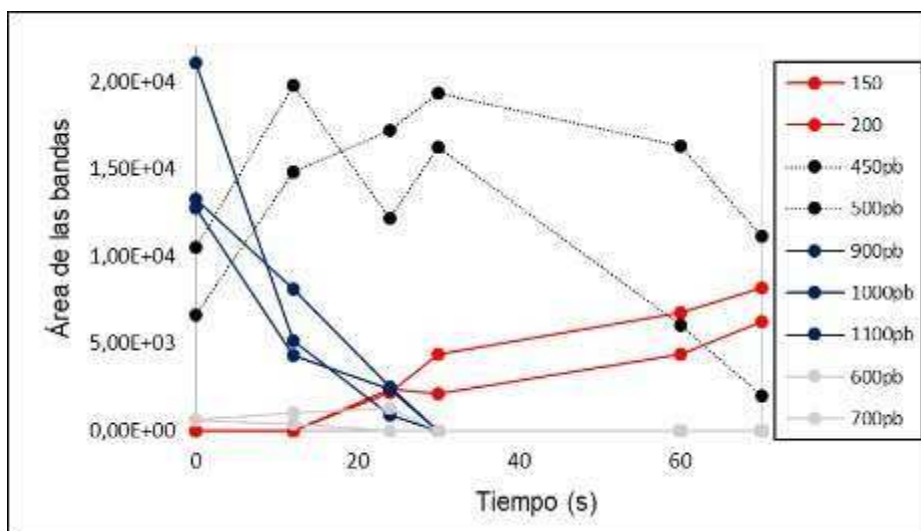
CAPITULO 1: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON UVC



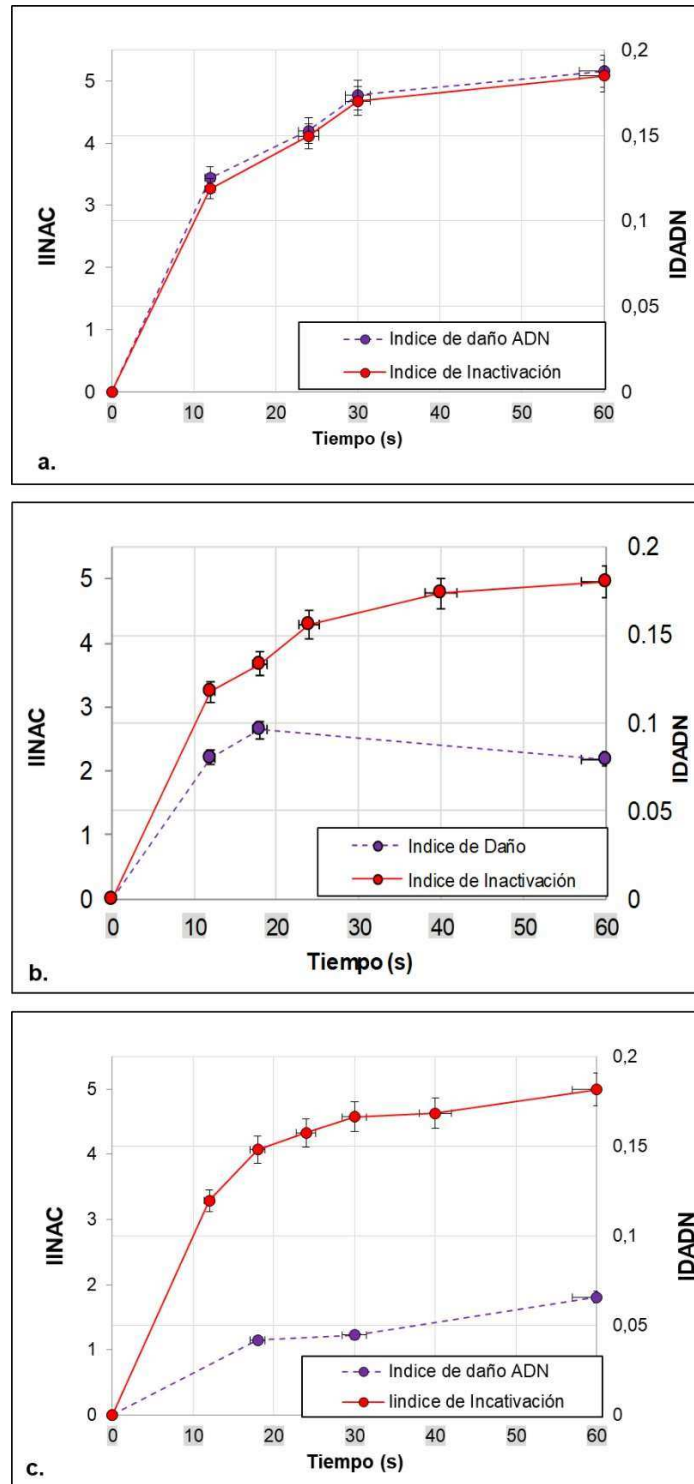
**Figura 28.** Densitometría generada con el programa ImageJ/FIJI, a partir de los geles de agarosa con el patrón de amplificación de ERIC-PCR para la cepa de *P. aeruginosa* luego de los tratamientos con UVC. Los números indican los tiempos de muestreo en segundos.

Como se mencionó, y se puede observar en la Figura 29 existe un entrecruzamiento de los valores de las áreas de las bandas de los grupos a y b a los 24 segundos de tratamiento. Este fenómeno puede ser un indicio de que las bandas que aparecen en el gel de tamaño moleculares más bajos (150 y 200 pb), correspondan a porciones amplificadas más pequeñas de las bandas de mayor longitud que están siendo dañadas. Otra explicación podría ser que los fragmentos que aparecen a los 24 segundos no pudieron ser revelados anteriormente en el gel, ya que el material para su aplicación era utilizado para amplificar las bandas de mayor tamaño que se encontrarían en mayor cantidad y consumirían más materiales para su amplificación, dejando rezagados estos fragmentos menos frecuentes y más cortos.

Para continuar con el análisis de lo que ocurre cuando *P. aeruginosa* es irradiada con UVC, se procedió a graficar el Índice de Inactivación (IINAC) y el Índice de Daño al ADN (IDADN) vs el tiempo (Figura 30). En primer lugar se procedió de igual manera que para la cepa de *E. coli* en la Figura 23. Al obtener estas gráficas se notó que el nivel de daño manifestado no correspondía con el IINAC, sino que era mucho más bajo para los tratamientos de 40 y 20% de radiación. SüB y col, 2009 [56] concluyeron en su trabajo de detección del daño al ADN con qPCR en cepas de *P. aureoginosa* tratadas con UVC, que la manifestación del daño en las tres bandas que eligieron para trabajar (100, 500 y 900 pb) no reflejaba el grado de inactivación bacteriana sino que fue menor.



**Figura 29.** Evolución del área de las bandas obtenidas de las fotografías de los gels de agarosa luego de la amplificación por ERIC-PCR del ADN de *P. aeruginosa* a lo largo del tiempo de exposición a 100% de radiación UV.



**Figura 30.** Evolución del índice de inactivación (IINAC) y del índice de daño (IDADN) a través del tiempo de exposición a UV-C de *P. aeruginosa* para: a. 100%, b. 40% y c. 20% de radiación.

Siguiendo con el análisis se procede de igual manera que con *E. coli*, se relacionan los dos índices en la Figura 31 para los distintos niveles de radiación ensayados.

De la figura se observa la existencia de la relación lineal entre los índices, para cada nivel de radiación. Las pendientes de las rectas de ajuste representan los valores del parametro sigma, manteniendo la relacion:  $IDADN = \zeta \times IINAC$ .

Por otro lado, puede observarse que la pendiente (sigma) depende del nivel de radiacion aplicado. A medida que se aumenta el nivel de radiacion, la pendiente es mayor. En este caso no puede determinarse un unico valor de sigma, como para la *E. coli*. En la Tabla 9 se sintetizan los resultados obtenidos.

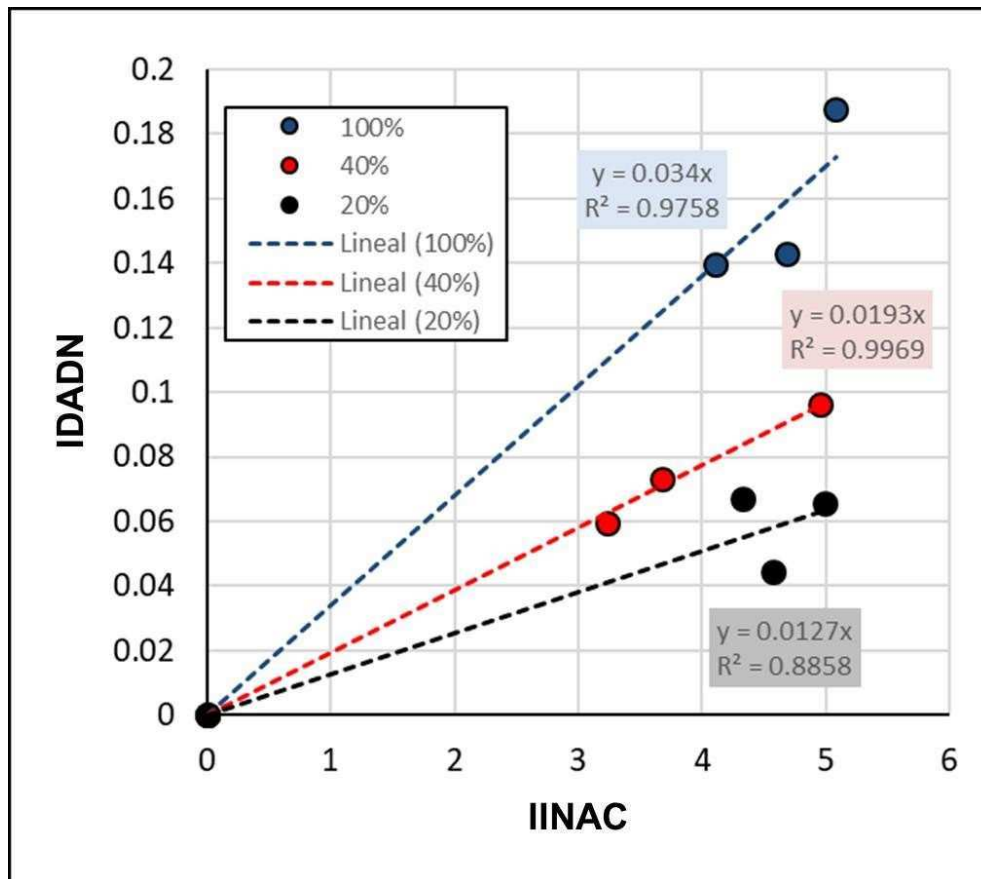


Figura 31. Gráfica de correlaciones entre los IINACI vs IDADN para *P. aeruginosa*

**Tabla 9.** Datos del parámetro  $\zeta$  obtenido para *P. aeruginosa* en cada nivel de radiación.

Nivel de Radiación (W/cm <sup>2</sup> )	(sigma) (pendiente)
0.0105 (100%)	0.0340
0.0042 (40%)	0.0193
0.0021 (20%)	0.0127

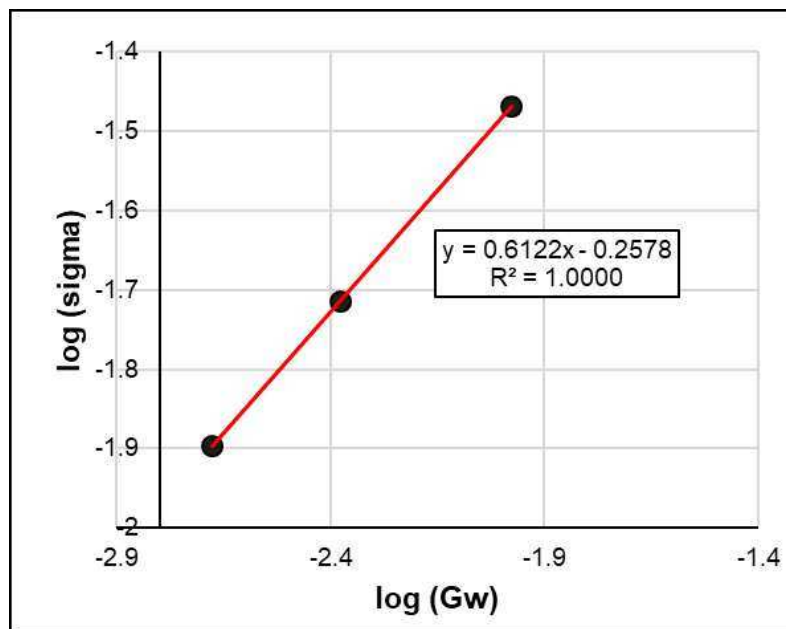
Para analizar la dependencia de sigma con el nivel de radiación se propone una función de potencia:

$$\zeta = \zeta' \times (G_w)^{\gamma} \quad \text{Ec.18}$$

Esta expresion puede ser linealizada de la siguiente forma:

$$\log(\zeta) = \log(\zeta') + \gamma \times \log(G_w) \quad \text{Ec. 19}$$

En la Figura 32 se representan los puntos experimentales y la recta de ajuste a partir de la linealización.



**Figura 32.** Representación de la funcionalidad que existe en los valores  $\zeta$  y el nivel de radiación (Gw) para *P. aeruginosa*.

Se realiza el ajuste lineal, obteniendo finalmente una expresión más completa de la relación entre índices:

$$IDADN = [0.5523 \times (Gw)^{0.6122}] \times IINAC \quad \text{Ec.20}$$

Como conclusión puede afirmarse que el grado de inactivación bacteriana es alto para los niveles de dosis utilizados y prácticamente es independiente de la concentración de fotones que se utilice. Por otro lado puede afirmarse que la cepa de *P. aeruginosa* utilizada en estos ensayos es altamente sensible al ataque de los fotones UV ya que el poco daño que se produce al ADN induce un alto grado de inactivación bacteriana. Además, se pudo comprobar que para este microorganismo el nivel de daño al ADN depende de la concentración de fotones que se utilice y es por eso que la susceptibilidad del ADN varía según el nivel de radiación utilizado.

---

#### ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *ESCHERICHIA. COLI* Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A pesar de que las cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* comparten muchas características biológicas como ser bacilos cortos Gram (-), catalasa positiva, porcentaje de GC semejante, y pertenecer a la misma clase taxonómica (Gammaprotobacterias); su reacción ante los agentes desinfectantes es particular en cada una y por ello es necesario realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos de las secciones anteriores.

Si analizamos lo que ocurre a los 18 segundos ( $189 \text{ W.cm}^{-2}$  de dosis UV) de exposición a 100% de radiación (Tabla 10), se logró una disminución de 4 unidades logarítmicas a este tiempo (IINAC=4) para ambas cepas en estudio. En cambio, cuando se observa lo que ocurre a medida que la intensidad de fotones disminuye, se puede notar que para *E. coli* va aumentando el tiempo de inactivación 6 segundos por cada filtro de radiación agregado, mientras que para *P. aeruginosa*, el efecto de la disminución de la intensidad de radiación es mínimo. Este análisis indica que *P. aeruginosa* es más sensible a la radiación UV que *E. coli* ya que al disminuir la intensidad de radiación la cepa sigue siendo fuertemente afectada por la misma. Este comportamiento sería similar al demostrado por Zhang y col, 2015 [86] que obtuvo tras sus ensayos, una mayor eficiencia en la desinfección para *P. aeruginosa* que para *E. coli*.

**Tabla 10.** Tiempo en segundos que tomó cada cepa estudiada para alcanzar los 4 log de inactivación tras los tratamientos con radiación UVC.

Experimento	<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	100%	40%	20%	100%	40%	20%
Tiempo para alcanzar los 4 log de inactivación (segundos)	18	24	30	18	22	24

Con respecto a las formas de las curvas de inactivación obtenidas, solo se aprecia una forma sigmoideal (hombro, caída lineal y cola) en los tratamientos donde se utilizó *E. coli* con el 40 y 20% de radiación. En las demás condiciones no se observó hombro, pero si una caída lineal en los primeros segundos y luego la aparición de una “cola”. Rattanakul y Oguma, 2018 [87] obtuvieron curvas sigmoideales para cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* trabajando con lámparas de baja presión de mercurio con concentraciones de microorganismos iniciales semejantes a las empleadas en este trabajo, pero cuando utilizaron UV-LEDs, de longitudes de onda mayores (265 a 300 nm) sus curvas se linealizaron. Pudieron modelar todas sus curvas, ya sea sigmoideales o lineales con el modelo de Geeraerd que se adaptó a todos los resultados que obtuvieron. El modelo de Geeraerd fue aplicado por estos autores ya que parecía ser adecuado para sus resultados porque, no solo utiliza un enfoque determinista basado en el ajuste, sino que también está respaldado por mecanismos biológicos de fondo, como posibles factores que afectan el hombro (agrupación de microorganismos, recuperación del daño por su capacidad de resíntesis, o diferencias en los componentes críticos) y colas (existencia de subpoblación resistente, y la resistencia adaptada) [80,87].

En cuanto al daño ocurrido en el ADN mediante la irradiación con UVC de los microorganismos estudiados, se puede decir que existe un comportamiento común y que define el fenómeno de desinfección. Las bandas de mayor tamaño molecular obtenidas con la técnica de ERIC-PCR van desapareciendo como consecuencia de la inhibición de la progresión de la enzima Taq polimerasa, cuando ésta se encuentra con porciones dañadas del ADN bacteriano. Esto ocurre en ambas cepas y concuerda con estudios realizados por múltiples autores [26,29,30,54–57]. Pero también existen diferencias entre los microorganismos utilizados para este trabajo respecto a su reacción al ataque mediante radiación UV. *Escherichia coli*, posee un comportamiento más simple, sus bandas de ADN de mayor tamaño van disminuyendo en intensidad y cantidad a medida que el proceso avanza en el tiempo. Su perfil de ERIC muestra dos comportamientos principales el



mencionado anteriormente en el cual las bandas más largas se van perdiendo, y otro en el cual las bandas de menor peso molecular sufren alteraciones, pero permanecen desarrollándose en el gel hasta el final del ensayo. Además, el daño provocado a su ADN es independiente a la intensidad de fotones empleada. Si lo comparamos con el comportamiento de las bandas obtenidas para *Pseudomonas aeruginosa*, ésta posee un grupo de bandas con un comportamiento diferente opuesto a las de mayor tamaño. Las bandas de 150 y 200 pb aparecen en el gel luego de cierto tiempo de irradiación (24 segundos cuando se aplicó 100% de radiación) y van aumentando su intensidad óptica a medida que avanza el tiempo de exposición. Las lesiones que ocurren en su ADN están estrechamente ligadas a la cantidad de fotones que llegan a las células. Este fenómeno marca una diferencia clara con la cepa de *E. coli*, dando la pauta de que cada microorganismo, por más semejantes que parezcan sus estructuras celulares reaccionan de manera única hacia el proceso de desinfección a nivel molecular y global. Un estudio individual de los microorganismos, como este, puede contribuir a desarrollar métodos más eficientes tanto de desinfección como de control del proceso para el futuro.

Tras el manejo de los resultados obtenidos de los geles de agarosa se estableció un parámetro al cual se lo denominó como  $\zeta$  que representa la sensibilidad del ADN frente a la radiación UV. Este parámetro está representado en la pendiente que forma el gráfico de correlación entre el IINAC y el IDAND. Cuando este parámetro se determinó para *E. coli*, se pudo obtener que el ADN de ésta bacteria es insensible a la variación de fotones, ya que  $\zeta$  se muestra como un parámetro independiente del nivel de radiación. En cambio, si observamos los resultados para *P. aeruginosa* se puede notar cómo el parámetro  $\zeta$  debe ser afectado necesariamente por el nivel de radiación, ya que, al manifestarse poco daño al ADN, se induce un alto descenso del número de microorganismos cultivables. Este desfase entre el IDADN y el IINAC, nos indica que la cepa es sensible a la radiación, pero su ADN no lo es en la misma medida. Este hecho deriva en la posible existencia de un target celular diferente al ADN que estaría influyendo en la inactivación de las células bacterianas.

#### CONCLUSION PARCIAL

A modo de conclusión de este capítulo se puede decir que la desinfección UVC es altamente eficiente para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* habiéndose obtenido un 99.99% de desinfección a cortos tiempos de contacto. *P. aeruginosa* es más sensible al tratamiento con el 20 y 40% de la radiación respecto a *E. coli*.

En cuanto al ADN se puede decir que la técnica de ERIC-PCR fue adecuada y eficiente para lograr la detección del daño en ambas cepas y que éste se detectó mediante el comportamiento de las bandas formadas durante el tiempo de desinfección. El daño se mostró como la desaparición de las bandas de mayor tamaño molecular, es decir, como una disminución en la actividad de la enzima Taq polimerasa. En *P. aeruginosa* además se observa la aparición de bandas de bajo tamaño molecular que acompañan al proceso de desinfección. 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. De aquí, fue definido un factor de proporcionalidad que llamamos *sigma* ( $\zeta$ ), que nos permite intercambiar un índice por otro. Esto es novedoso y de importante aplicación práctica ya que permite 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 usa UV sola.

CAPITULO 2:

# ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO



## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

### INTRODUCCION

---

#### DESINFECTANTES QUIMICOS

Los desinfectantes pueden actuar sobre los microorganismos de dos maneras diferentes: por inhibición del crecimiento (bacteriostasis, fungistasis) o mediante acción letal (efectos bactericidas, fungicidas o virucidas). Solo los efectos letales son de interés en la desinfección. Muchos autores han mantenido durante mucho tiempo que los desinfectantes y los antisépticos actúan de manera no específica, en contraste con los antibióticos que tienen objetivos celulares específicos dentro de los microorganismos [88]. Es necesario tener en cuenta ciertas generalidades a la hora de considerar la acción biocida de los agentes desinfectantes:

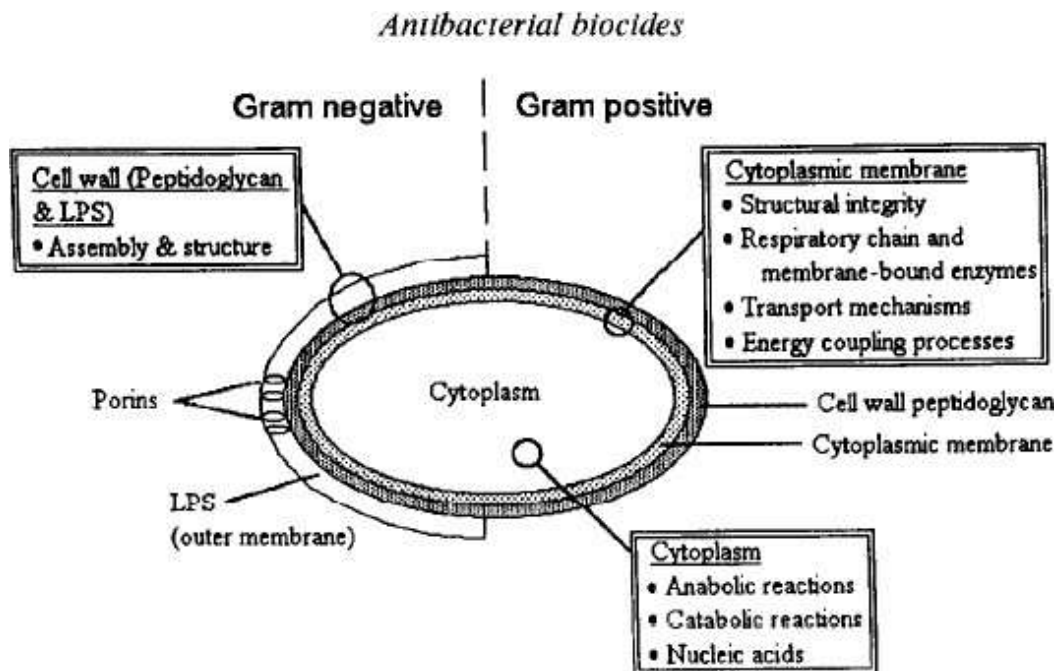
- Si existe una o diferentes vías de entrada a la célula
- Si hay sitios de ataque comunes
- Si los sitios de ataque se modifican durante la diferenciación celular
- Si se localizan mecanismos comunes de resistencia [89].

En general los mecanismos de acción de los biocidas pueden definirse de acuerdo a la estructura microbiana en contra de la cual éste presenta más actividad (Figura 33):

- Interacción con los componentes celulares exteriores
- Interacción con la membrana citoplasmática
- Interacción con los componentes citoplasmáticos

Varios biocidas pueden interactuar con los componentes exteriores de la célula, aunque la viabilidad de la célula no se vea afectada. Uno de los efectos de estos agentes es un cambio de hidrofobicidad celular. Frente a estos, las bacterias Gram-negativas poseen ventajas ya que la primera barrera de acción es la membrana externa de la que carecen las que son Gram-positivas. Los compuestos catiónicos como son el clorhexidina o cloruro de

benzalconio, interaccionan con las cargas negativas en la célula bacteriana y de la membrana externa. Otro agente con acción en el mismo target celular, el hipoclorito, induce la lisis de la pared celular en bacterias Gram-negativas [90].



**Figura 33** Esquema que separa los tipos de agentes biocidas según el target celular (modificado de Denyer y col, 1996) [91]

Cuando se trata de agentes que interactúan con la membrana plasmática para ejercer su acción biocida se los denomina “agentes activos de membrana”. Algunos ejemplos de estos agentes son: polimixinas, fenoles, parabencenos, biguanidinas, alcoholes, entre otros. Todos estos compuestos hacen daños similares en la membrana a pesar de tener estructuras muy diferentes. Existen tres mecanismos de acción básica para este tipo de químicos desinfectantes: disrupción de la membrana, disipación de la fuerza protón motriz e interacción con sistemas enzimáticos.

Por último, se encuentran los agentes que interactúan con los constituyentes citoplasmáticos. Estos pueden atacar ácidos nucleicos, los ribosomas y varias enzimas con diferentes funciones que son componentes vitales de las células y pueden causar daños celulares reversibles o irreversibles. Algunos biocidas pueden incluso alterar la estructura fisicoquímica del citoplasma. Los químicos oxidativos ( $H_2O_2$ , APA,  $O_3$ ), remueven

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

electrones de grupos químicos susceptibles, oxidándolos y reduciéndose ellos en el proceso. Estos agentes son generalmente moléculas de bajo peso molecular que atraviesan la membrana y reaccionan con componentes intracelulares. Tienen muchos sitios blancos: disrupción y peroxidación de las membranas, oxidación de oxígenos y grupos tiol, inhibición de enzimas, oxidación de nucleósidos, daño en los elementos de producción de energía, interrupción de la síntesis de proteínas. Bajos niveles de oxidación pueden ser reversibles, pero una alta concentración de oxidante causa significativo daño en la superficie, pared celular y elementos intracelulares [90].

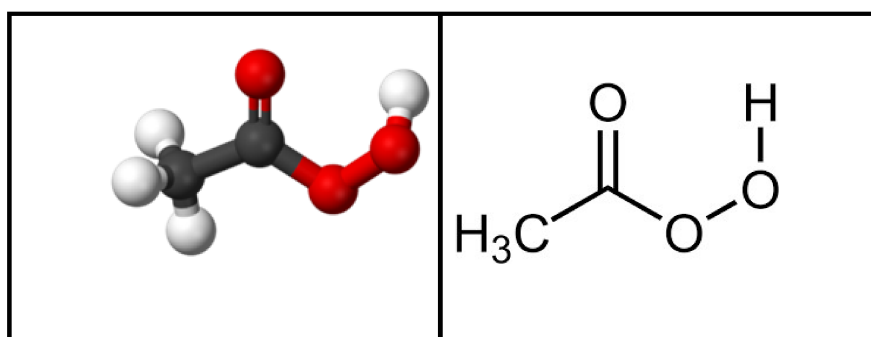
En la Tabla 11, que se encuentra a continuación, se detallan algunos biocidas junto a sus mecanismos de acción.

**Tabla 11** Mecanismo de acción antibacteriana de algunos antisépticos y desinfectantes (modificado de Cabrera y col, 2007) [92]

Sitio blanco	Antiséptico o desinfectante	Mecanismo de acción
Envoltura celular (pared celular, membrana externa)	Glutaraldehído, EDTA, otros permeabilizantes	Unión cruzada a proteínas. Bacterias gramnegativas: remoción de Mg <sup>++</sup> , liberación de algunos LPS.
	CAC	Daño generalizado de la membrana que comprometen fosfolípidos de ambas capas.
Membrana interna citoplasmática	Clorhexidina	Las bajas concentraciones afectan la integridad de membrana, las altas concentraciones causan congelamiento del citoplasma.
	Diaminas	Indicación a la pérdida de aminoácidos
	Fenoles	Pérdida, desacople
Unión cruzada a macromoléculas	Formaldehído	Unión cruzada de proteína, ADN y ARN
	Glutaraldehído	Unión cruzada de las proteínas de envoltura celular y en otros sitios celulares.
Intercalantes de ADN	Acridinas	Intercalación de una molécula de acridina entre dos conjunto de pares de bases consecutivas en el ADN.
Interacción con grupos tiol	Compuestos con plata	Enzimas que se unen a membrana, interacción con grupos tiol.
Efectos en el ADN	Halógenos	Inhibición de la síntesis del ADN
	Peróxido de hidrógeno, iones de plata	Ruptura de la hebra de ADN
Agentes oxidantes	Halógenos	Oxidación de los grupos tioles o disulfitos, sulfóxidos o disulfóxidos
	Peroxígenos	Peróxido de hidrógeno: actividad debida a la formación de radicales libres, que oxida grupos tioles Ácido peracético: inhibición de los grupos tioles

### ACIDO PERACETICO

El ácido peracético (APA),  $\text{CH}_3\text{COOOH}$  (Figura 34), es un compuesto orgánico artificial de peróxido, que tiene fuertes propiedades oxidantes. El hecho de poseer un radical peróxido hace que sea una molécula altamente inestable y combustible. Los peróxidos, en general, son compuestos de estado de alta energía y, como tales, pueden considerarse termodinámicamente inestables. Ha sido ampliamente utilizado como desinfectante o esterilizante en los laboratorios y en alimentos, bebidas, medicina e industrias farmacéuticas [93].



**Figura 34.** Representación tridimensional de la molécula de ácido peracético (APA) (izquierda) y su fórmula química (derecha).

El APA está ganando mayor aceptación en los últimos años entre los desinfectantes químicos alternativos al cloro alegando que la desinfección no solamente es inofensiva, sino que de los subproductos (DBPs) que se han identificado hasta el momento, la mayoría de ellos surge a partir de su descomposición espontánea. Se conoce desde la década de 1960 por sus propiedades bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas.

El APA, se propuso por primera vez para la desinfección de aguas residuales hace más de 30 años [94,95] y se ha estudiado ampliamente desde entonces. Los efluentes de aguas residuales secundarias requieren típicamente una dosis de 2 a 7 ppm y aproximadamente 30 minutos de tiempo de contacto para alcanzar una reducción de 3 log en el número total de coliformes. Los efluentes terciarios filtrados y tratados biológicamente ya pueden desinfectarse con una dosis de 1.5 a 2 ppm y un tiempo de contacto de 10 a 15 min para alcanzar la calidad del agua de baño de la Unión Europea para *E. coli*. Sin embargo, la dosis requerida y el tiempo de contacto dependen en gran medida de la calidad de las aguas residuales. Los efectos generales de las características químicas y físicas de las aguas

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

residuales sobre la desinfección con APA se muestran en la Tabla 12. Se pueden esperar los mejores resultados cuando se tratan efluentes terciarios filtrados, es decir, aplicando el llamado concepto de barrera múltiple. Los parásitos grandes y pesados (por ejemplo, huevos de helmintos) se eliminan por filtración y los patógenos más pequeños, como virus y bacterias, se destruyen por desinfección [96]

**Tabla 12.** Factores que afectan al rendimiento del APA durante la desinfección de efluentes (modificado de Luukkonen y col., 2014) [97].

Características del efluente	Efecto
Temperatura	La eficiencia en la desinfección aumenta con la temperatura. Activo entre 0 y 100°C
pH	Es más efectivo en condiciones ácidas. Sobre pH 9 la eficiencia decrece.
Sólidos suspendidos, turbidez	La eficiencia de desinfección disminuye ligeramente si los sólidos suspendidos o turbidez aumentan. Esto se puede ver en la dosis requerida para cada tipo de efluente: Primario>secundario>terciario
Material orgánico	Alta cantidad de lodos incrementa la cantidad de dosis requerida, sin embargo, es menos afectado que otros desinfectantes químicos.
Metales de transición	La descomposición catalítica y la formación de radicales por PAA y peróxido de hidrógeno pueden ser iniciados por metales de transición. En el caso del mecanismo radical, la actividad de desinfección puede intensificarse.
Bicarbonato, cloruro	Puede causar la disminución de los radicales (por ejemplo, OH•) por los efectos de eliminación de radicales.

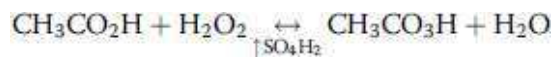
Se presenta en forma comercial como una solución cuaternaria de equilibrio entre el ácido peracético (15% v/v), ácido acético (25% v/v), peróxido de hidrógeno (20% v/v) y agua (40% v/v). Además, por requerir bajas concentraciones para ejercer su efecto biocida el costo de aplicación es moderado [98].

QUIMICA Y MECANISMO DE DESINFECCION

Para entender por qué el APA es efectivo, se deben comprender tanto la química como la microbiología en el proceso. El ácido peracético se produce combinando ácido acético,

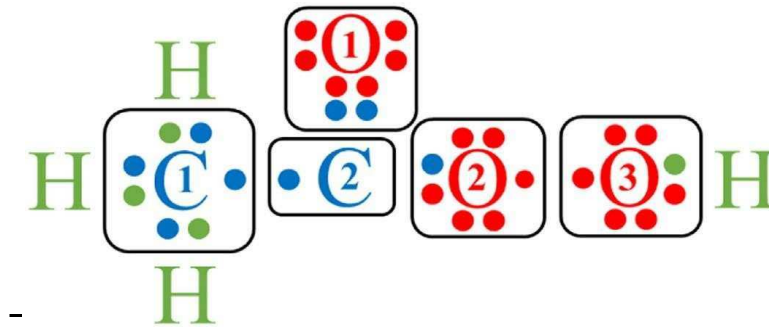


peróxido de hidrógeno y agua con ácido sulfúrico agregado para catalizar la reacción. La química de equilibrio es como sigue:



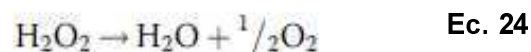
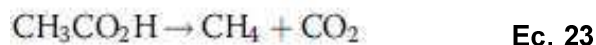
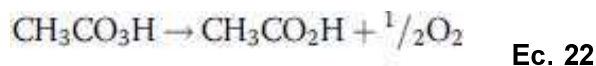
Ec.21

La estructura de Lewis del APA (Figura 35) indica que sus tres átomos de oxígeno tienen diferentes números de oxidación o estados de oxidación. El átomo de oxígeno conectado al átomo de carbono a través de un doble enlace de carbono-oxígeno (denotado por "O1") tiene un estado de oxidación de -2. Cada uno de los otros dos átomos de oxígeno (denotado por "O2" y "O3") tiene un estado de oxidación de -1.



**Figura 35.** La estructura de Lewis de PAA. Los estados de oxidación de "H", "C1", "C2", "O1", "O2" y "O3" son +1, -3, +3, -2, -1 y -1, respectivamente. Los símbolos de los átomos de hidrógeno, carbono y oxígeno, así como sus electrones de valencia, están marcados con colores verde, azul y rojo, respectivamente(modificado de Zhang y col. ,2015) [86]

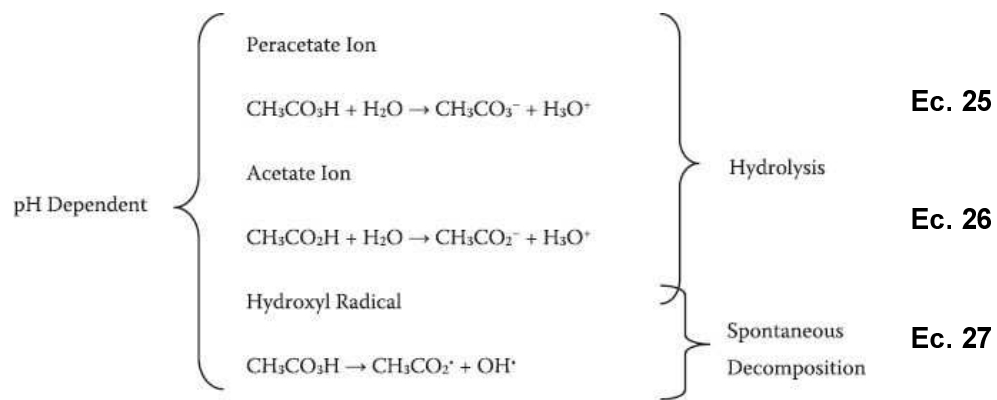
El APA se descompone espontáneamente en ácido acético, peróxido de hidrógeno y oxígeno. El ácido acético y el peróxido de hidrógeno producen metano, dióxido de carbono, agua y oxígeno libre.



El APA es un oxidante relativamente fuerte que tiene un potencial de oxidación de 1.8 V. Además, es un ácido débil con una constante de disociación (pKa) de 8.2 [99] y cuando se

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

introduce en agua con un pH menor de 8.2, se descompone espontáneamente y se forman radicales hidroxilos con un potencial de oxidación de 2.8 V. La formación de radicales hidroxilos depende del pH cuando el APA está en solución y en cualquier momento puede haber cuatro disociaciones. La descomposición espontánea produce radicales acetato e hidroxilo ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^\bullet$  y  $\text{OH}^\bullet$ ) y alcanza su máximo a pH 8.2, mientras que la hidrólisis produce iones acetato ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ) e iones de peracetato ( $\text{CH}_3\text{CO}_3^-$ ) y aumenta a medida que aumenta el pH. A pH 10.5 y superior, las reacciones de hidrólisis se vuelven dominantes [100]. Estos procesos se describen en las ecuaciones 25 a 27.



Como es una notación común en la especiación ácido / base,  $\alpha_0$  es esa fracción que está en la forma más protonada y  $\alpha_i$  es esa fracción que ha perdido  $i$  protones. El ácido peracético es un ácido monoprótico y, como tal,  $\alpha_0$  representa la fracción de ácido peracético ( $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ ) y  $\alpha_1$  representa esa fracción que es el ion peracetato ( $\text{CH}_3\text{CO}_3^-$ ).

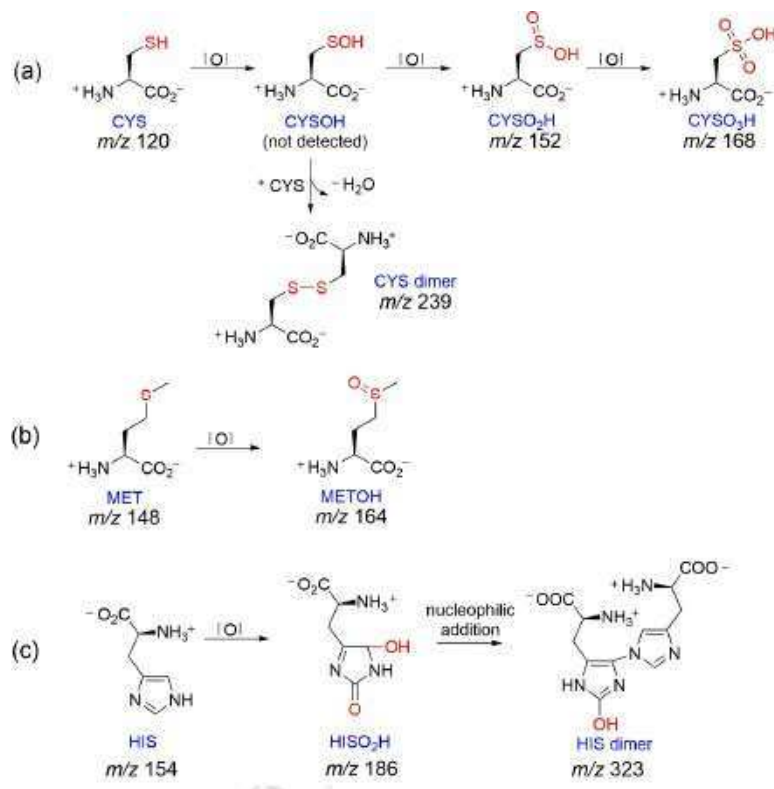
Por lo tanto, a pH menor a 8.2, tendremos una liberación de radicales hidroxilos que van a ser sumidero de electrones. Este hecho en desinfección implica para las células Gram negativas, como *E. coli* con paredes celulares altamente cargadas negativamente, el barrido de un electrón que puede ser bastante perjudicial para la estructura de la pared celular y para el ADN celular [100].

ACCION BIOCIDA DEL APA

El APA actúa de una manera similar a los clorógenos, es decir, con un alto poder oxidante, pero, a diferencia de estos, es menos corrosivo, posee un mayor espectro de acción y es efectivo aún en presencia de materia orgánica.

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

Los radicales formados afectan a la célula en diferentes niveles, siendo el radical  $\text{OH}\cdot$  uno de los agentes que produce mayor daño celular. Hay mucha bibliografía donde se menciona la acción del ácido peracético como agente oxidante. Según Baldry y Fraser, 1998 [101] el APA disrumpe los enlaces  $-\text{SH}$  y sulfuros de enzimas y paredes celulares, además causa dislocación de las funciones quimiosmóticas del transporte de membrana y desnaturalización de proteínas [49,102]. Du y col., en su trabajo publicado en 2017 [14] midió la acción del APA sobre los aminoácidos y pudo comprobar que sólo existe actividad oxidativa sobre tres de ellos. Pudieron ver que este agente afecta a grupos tioles de las cisteínas, el grupo tioester de las metioninas y el anillo himidazol de las histidinas. En la Figura 36 se muestran los caminos de reacción propuestos para estos tres aminoácidos. Estos autores proponen que podría llegar a existir una dimerización entre moléculas de cisteína alteradas e histidinas alteradas, lo que podría influir en la estructura de enzimas y proteínas preexistentes e incluso podría impedir el proceso de traducción de genes durante la formación de nuevas proteínas.



**Figura 36.** Caminos de reacción del (a) cisteína, (b) metionina y (c) histidina en contacto con APA (modificado de Du y col, 2017) [14].

#### VENTAJAS DE LA UTILIZACION DEL ACIDO PERACETICO COMO DESINFECTANTE

Las ventajas del APA que apoyan su uso en el tratamiento de aguas residuales incluyen relativamente buena eficacia de la desinfección (también en presencia de materia orgánica de aguas residuales), tiempo de contacto corto y la ausencia de residuos o subproductos de desinfección persistentes. Dell'Erba y col, 2006 [103] investigaron la posible formación de 11 fenoles, que aparecen en la lista de los mono, bi y tribromofenoles de búsqueda prioritaria como contaminantes de agua para la EPA en EEUU durante la pruebas en planta piloto de desinfección con APA, pero no se halló cantidad detectable de fenoles clorados o bromados incluso a las dosis más altas investigadas (13 ppm). Si bien se produjo cierta formación de aldehídos, el APA tiende a oxidarlos aún más, hasta transformarlos en ácidos carboxílicos y, finalmente, a dióxido de carbono. También destacaron que la cantidad de aldehídos formados fuera superior a las concentraciones máximas permisibles por las leyes italianas. Otro estudio fue realizado por Crebelli y col, 2005 [104] que utilizaron pruebas de mutagenicidad bacteriana y genotoxicidad de plantas para evaluar la formación de DBP dañinos. Sus resultados usando 2 a 4 ppm de APA y un tiempo de contacto de 26 a 37 min en el efluente secundario sedimentado, obtuvieron que no se produjo formación de DBP genotóxicos. Resultados similares también fueron obtenidos por Monarca y col, 2002 [105].

#### AVANCES EN EL DESARROLLO DE LA DESINFECCION DE AGUA MEDIANTE ACIDO PERACATICO

El peróxido orgánico, ácido peracético (APA) es un desinfectante fuerte con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, que se introdujo en el tratamiento de aguas residuales hace aproximadamente 30 años y recientemente se ha utilizado para desinfectar desbordamientos combinados de alcantarillas [106]. En los últimos años, el APA se ha propuesto como un desinfectante alternativo para reemplazar los oxidantes a base de cloro en el tratamiento de aguas residuales. Los principales impulsores del uso de APA en el tratamiento de aguas residuales incluyen los siguientes: (1) APA no genera subproductos de desinfección cancerígenos y mutagénicos (DBP), por lo tanto, beneficia enormemente la seguridad y la reutilización del agua tratada; (2) puede penetrar e inactivar efectivamente las biopelículas; (3) se ha demostrado que el uso del APA es rentable y puede instalarse fácilmente en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales existentes.

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con APA inactiva eficazmente muchos patógenos y microbios indicadores en las aguas residuales [84,102,107].

La desinfección con APA reduce eficazmente el número de microbios en los efluentes primarios. Aplicando una dosis de 10-15 ppm se lograría un descenso de aproximadamente 3.4 log de bacterias entéricas [108].

La resistencia de los virus contra la desinfección se ha demostrado en varios estudios, [108] y esto es probablemente debido a sus diferentes mecanismos de inactivación en comparación con los mecanismos de inactivación de bacterias entéricas. La acción desinfectante del APA se piensa que es debido a la liberación de oxígeno activo o la producción de radicales hidroxilos reactivos que atacan a la célula bacteriana, causando la disrupción de la pared celular y las membranas, así como algunas enzimas y ADN [102,109]. La inactivación de los colifagos puede estar relacionada con dañar a sus estructuras de superficie, tales como la capa de proteína o los sitios necesarios para la infección de las células huésped, o a los efectos sobre sus ácidos nucleicos. Los virus son normalmente más resistentes que las bacterias entéricas también a otros métodos de desinfección, tales como UV, cloro y desinfección con ozono [57], [58].

La desinfección con APA de los efluentes primarios, secundarios y terciarios normalmente logra una rápida inactivación microbiana durante los primeros 4-18 minutos de tiempo de contacto. El aumento de la dosis de ácido resulta en una mayor tasa de inactivación microbiana [82].

Flores y col., 2016 [49], realizaron un ensayo con la solución comercial de APA que resultó especialmente efectiva para la inactivación de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*, incluso a bajas concentraciones, obteniéndose una inactivación mayor al 99,9 % en tan solo 5 minutos cuando se trabajó con concentraciones superiores a 2 ppm de APA. Resultados análogos encontró Morris, 1993 [110] trabajando con efluentes secundarios reduciendo de 4 a 5 log el contaminante con 5 ppm de APA a tiempos de contacto de 20 minutos. También Falsanasi y col., 2006 [111] lograron con una dosis de 4 ppm de APA durante 10 minutos de contacto, llegar a la concentración de 1 UFC/100 cm<sup>3</sup> de microorganismos.

Liberti y Notarnicola, 1999 [102] han determinado que, aunque el APA era eficaz contra los coliformes totales, era ineficaz hacia parásitos *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp*.

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

---

El tratamiento con APA podría representar una buena alternativa para la desinfección de efluentes secundarios y terciarios de aguas residuales. En Italia, algunas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) a escala real ya utilizan APA para la desinfección de aguas residuales. La aplicabilidad de tratamiento puede ser dependiente del nivel del objetivo de desinfección [94,102,104].

Es posible realizar un proceso de oxidación avanzada combinado de APA y UV que tiene una alta eficiencia y sinergia que beneficia la desinfección [108,109].

### OBJETIVOS

- Estudiar la desinfección de agua con *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes concentraciones de ácido peracético (APA).
- Analizar la existencia de daño hacia el ADN de los microorganismos atacados durante el proceso mediante ERIC-PCR.
- Analizar la existencia de otros posibles blancos de ataque del APA a nivel de proteína de las células microbianas mediante la técnica de geles de poliacrilamida desnaturalizantes con el detergente docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) mediante electroforesis vertical unidimensional.
- Estudiar el grado de toxicidad del APA en agua a través de ensayos de exposición aguda de *Daphnia magna*.

### MATERIALES Y METODOS

---

#### MICROORGANISMOS

Fueron utilizadas las cepas de *Escherichia coli* ATTC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, descritas en el CAPITULO 1.

---

#### REACTIVOS

Los reactivos que se utilizaron en esta sección para el cultivo de microorganismos y para realizar la técnica de ERIC-PCR fueron detallados en el CAPÍTULO 1.

Adicionalmente en esta sección como se trabajó con agentes oxidantes se detallan los reactivos empleados particularmente para ello. Se usó ácido peracético (BAHER) (APA 15% v v<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20% v v<sup>-1</sup>, ácido acético 25% v v<sup>-1</sup>, y agua 40% v v<sup>-1</sup>). Para detener la

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

---

reacción de inactivación se debió agregar a cada frasco de muestras previamente a las corridas, catalasa de hígado bovino ((2915 units mg<sup>-1</sup>) Fluka) para detener la acción del peróxido de hidrógeno presente y Tiosulfato de sodio 0.1 N (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Cicarelli) para detener la acción del APA.

Para la determinación de la concentración de APA se utilizó: Permanganato de Potasio 0.1 N (KMnO<sub>4</sub>) (Cicarelli), Ácido Sulfúrico 95-98% v v<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Cicarelli), Tiosulfato de sodio 0.1 N (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Cicarelli), Almidón 1% (Cicarelli) y Ioduro de potasio (IK) (Cicarelli).

Los reactivos que se utilizaron para realizar los geles de SDS-PAGE se detallan a continuación: Acrilamida (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO) (Promega, Biodynamics), Bis-acrilamida (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Promega, Biodynamics); Glicina o ácido aminoacético (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) (Promega, Biodynamics); Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Promega, Biodynamics); TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) (C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich); Tris Base tris (hidroximetil) aminometano (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (Promega, Biodynamics), Persulfato amónico (APS) (N<sub>2</sub>H<sub>8</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Sigma-Aldrich); Nitrato de plata 2 g . L<sup>-1</sup> (AgNO<sub>3</sub>) (Cicarelli); Azul de bromofenol (Sigma Aldrich); Ácido clorhídrico (ClH) (Cicarelli); Glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (Cicarelli); Ácido acético 10% (CH<sub>3</sub>COOH) (Cicarelli); Etanol 10% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Cicarelli), Carbonato de sodio 30 g . L<sup>-1</sup> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Cicarelli); Formaldehído 37% . L<sup>-1</sup>, 1.5 g . L<sup>-1</sup> (HCOH) (Cicarelli), Tiosulfato de sodio 2 mg . L<sup>-1</sup> (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Cicarelli).

---

### DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El dispositivo experimental utilizado fue detalladamente descrito en el CAPÍTULO 1. En todos los ensayos comprendidos en este capítulo se mantuvo la lámpara germicida apagada.

---

### ENSAYOS EXPERIMENTALES

---

#### PREPARACION DEL INOCULO

Este paso se llevó a cabo como se encuentra descrito en el CAPÍTULO 1.

---

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE APA COMERCIAL

Es necesario para poder realizar los ensayos conocer la concentración justa que posee la mezcla comercial de ácido empleada. La técnica que fue elegida para llevar a cabo este

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

paso fue la desarrollada por D'Ans y Frey , 1914 [112] y su modificación posterior realizada por Greenspand y Mckellar, 1951 [113]. En estas técnicas se valoran, primero el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con permanganato de potasio (Figura 37) y el APA residual se determina a continuación mediante la adición de ioduro de potasio y almidón, se titula la mezcla con tiosulfato de sodio.

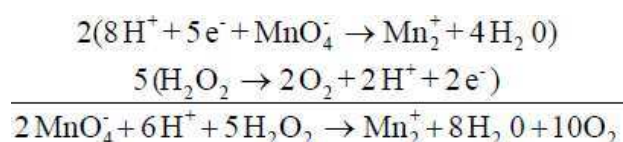


**Figura 37.** Fotografía que muestra la primera etapa de la titulación para conocer la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER EL TITULO DE LA SOLUCION DE APA COMERCIAL AL 15%

En primer lugar, se realizó una dilución 1/200 de la solución comercial de APA 15%. Se agregaron 5 ml de solución comercial con una volpipeta a un matraz de 1000 ml y se enrazó con agua destilada. Esta fue nuestra solución de trabajo.

En solución ácida el peróxido de hidrógeno reduce una solución de KMnO<sub>4</sub> de concentración conocida (SPS), con formación de O<sub>2</sub>. Cumpliéndose: meq KMnO<sub>4</sub>≡ meq H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produciéndose la siguiente reacción química:



Se tomó una alícuota de la dilución de trabajo, con una volpipeta de 10 ml, se colocó en un Erlenmeyer, al cual se le añadió posteriormente 6 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:8 (4N) para obtener pH

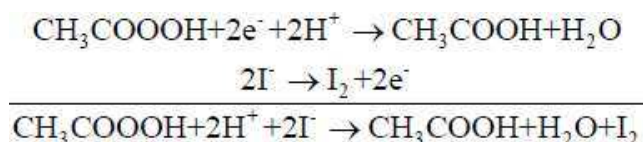


CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

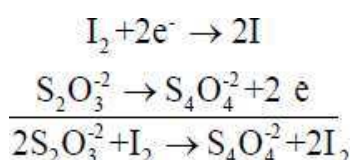
ácido. Luego se tituló con  $\text{KMnO}_4$  de normalidad conocida, hasta el primer rosado permanente. Se realizaron 2 determinaciones. Con los volúmenes obtenidos se procedió al cálculo para determinar la concentración:

$$\text{ppm H}_2\text{O}_2 = \frac{V_{\text{gastado}} (\text{ml}) \times N_{\text{KMnO}_4} (\text{meq/ml}) \times \text{Peq}_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{meq/ml}) \times 1000 (\text{ml/L})}{V_{\text{vp}} (\text{ml})}$$

Una vez que se obtuvo la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se procedió a calcular la de APA a través de una iodometría, titulando la solución con tiosulfato de sodio. Para ello se tomó una alícuota de la muestra (en este caso es la alícuota que se tituló con  $\text{KMnO}_4$ ), se le añadió  $\text{KI}$  ( $0.4 \text{ g L}^{-1}$ ) en exceso en medio ácido junto con 2 ml de almidón, y el  $\text{I}_2$  liberado fue titulado con una solución patrón secundario de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Cumpliéndose:  $\text{meq S}_2\text{O}_3^- \equiv \text{meq I}_2 \equiv \text{meq APA}$ . La reacción de oxidación que ocurre es detallada a continuación:



La reacción de titulación es la siguiente:



Obtenidos los volúmenes de titulación, el cálculo para conocer la concentración de la dilución de APA es la siguiente:

$$\text{ppm APA} = \frac{V_{\text{gastado}} (\text{ml}) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} (\text{meq/ml}) \times \text{Peq}_{\text{APA}} (\text{meq/ml}) \times 1000 (\text{ml/L})}{V_{\text{vp}} (\text{ml})}$$

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

PREPARACION DE LA SOLUCION DE TRABAJO PARA EL REACTOR

Una vez determinada la concentración de APA y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se procede a realizar la corrida experimental.

En un matraz de 2000 ml se agrega el volumen correspondiente de APA 1/200 y se enraza con solución fisiológica estéril.

Una vez lista la solución se vierte en el reactor, se agita, y luego se agregan los 2 ml de suspensión del microorganismo correspondiente.

TOMA DE MUESTRA.

Las muestras se toman en frascos color caramelo estériles que contienen 250 µl de Tiosulfato de sodio 0.1 N y 500 µl de catalasa al 0.01%. Ambas concentraciones fueron calculadas cuantitativamente para inhibir la acción de los agentes oxidantes y no dañar la concentración bacteriana. Luego de 10 minutos se procedió a sembrar en placas de Eosina Azul de Metileno (EMB) y Cetrimide, según correspondió, en flujo laminar (Nuare, Un 425-400E). El diseño del ensayo experimental para los dos microorganismos empleados, con las distintas concentraciones de APA utilizado se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Descripción de los diseños experimentales que se realizaron en los ensayos con APA y las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Número de corridas	Cepa	Concentración de agente oxidante	Concentración de microorganismo (CFU/ ml)	Tiempo de toma de muestra en segundos
3	<i>E. coli</i>	4 ppm	10 <sup>7</sup>	0,10, 15,30,45, 60, 90, 120, 150, 165, 180, 240
3	<i>E. coli</i>	8 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 10, 15, 30, 45, 75, 105
3	<i>E. coli</i>	12 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50
3	<i>E. coli</i>	16 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40
3	<i>P. aeruginosa</i>	4 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 30, 60, 90, 180, 240
3	<i>P. aeruginosa</i>	8 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180
3	<i>P. aeruginosa</i>	12 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 10, 30, 50, 80, 90, 100, 120
3	<i>P. aeruginosa</i>	16 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

---

### RECUESTO DE MICROORGANISMOS VIABLES

Se realizó el recuento de microorganismos viables con el mismo procedimiento que se describe en el CAPITULO 1.

---

### INDICE DE INACTIVACION

Se calculó el índice de inactivación de igual forma que la detallada en el CAPÍTULO 1, para los ensayos con UVC.

---

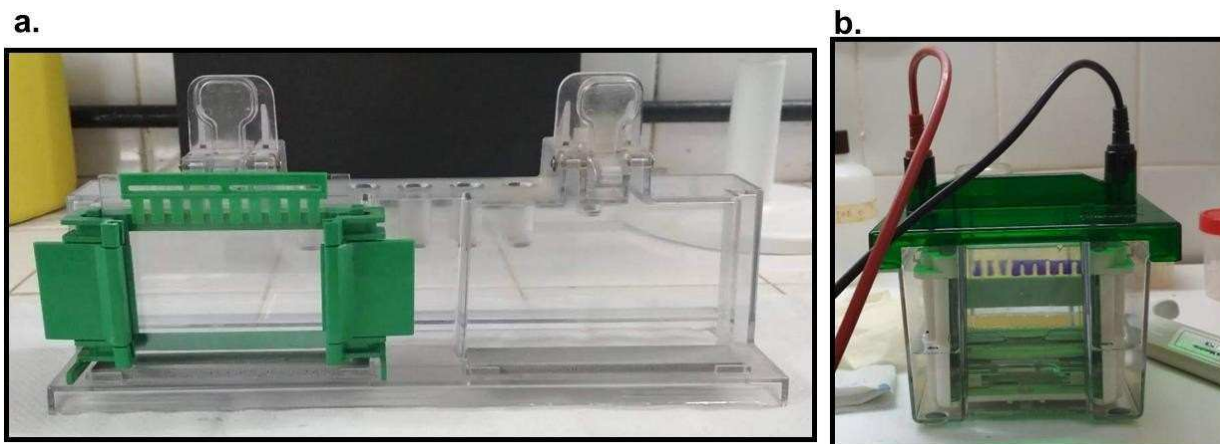
### ANALISIS MOLECULAR

Se procedió a detectar el daño producido en el ADN a través de la técnica de ERIC-PCR detallada en el CAPÍTULO 1.

---

### ANALISIS DE DAÑO A PROTEINA MEDIANTE SDS- PAGE

Para poder obtener un perfil de proteínas que nos permitiera aproximarnos a la observación del daño que produce el agente desinfectante a este grupo de moléculas, se realizó la técnica de SDS-PAGE sobre *Escherichia coli* expuestas a 16 ppm de APA. Comenzamos concentrando las muestras mediante múltiples centrifugaciones al igual que para las muestras utilizadas para hacer ERIC-PCR (se realizaron tandas de centrifugaciones durante 10 minutos a 10000 rpm en tubos eppendorff de 1.5 ml). A continuación, luego de un lavado con solución fisiológica estéril, se colocaron 50 µL de Buffer Muestra (Tris pH 6,8 50 mM, Glicerol 10%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,1%) en cada tubo y se hirvieron durante 5 minutos. Se prepararon los geles, primero el gel separador con un 15% de acrilamida y luego, el gel apilador con 8% de acrilamida. Una vez solidificados los geles se procedió a la corrida electroforética durante aproximadamente 1:30 horas a 20 mA constantes (Figura 38). Al finalizar la electroforesis, se revelaron las bandas obtenidas mediante tinción con Nitrato de Plata (1 g. L<sup>-1</sup>).



**Figura 38.** Fotografías de los elementos utilizados para (a) gelificar y formar los geles de poliacrilamida (cassettes) y (b) cuba para electroforesis vertical, ambos de BioRad.

#### PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

El procedimiento de tinción de plata que se utilizó fue modificado de Bassán y col, 1991 [114] que previamente lo tomó y modificó de Merrill y col., 1981 [115] (Tabla 14). Todos los pasos se realizaron en recipientes de plástico y los líquidos se eliminaron por succión. El desarrollador y las soluciones de nitrato de plata se prepararon inmediatamente antes de su uso. La impregnación con nitrato de plata estaba bajo iluminación normal fluorescente de la sala. La solución del desarrollador se reemplazó si se formaba un precipitado oscuro durante el desarrollo de la imagen.

**Tabla 14.** Tabla modificada de Bassam y col., 1981 [114], para realizar la tinción de Nitrato de plata sobre un gel de poliacrilamida

Pasos	Procedimiento	Tiempo
Fijación	10% ácido acético	20 minutos
Lavado	Agua deionizada	Tres lavados de 5 minutos
Impregnación	AgNO <sub>3</sub> (1g.L <sup>-1</sup> ), 1.5 ml 37% HCOH/L	30 minutos
Lavado	Agua deionizada	Tres lavados de 1 minuto
Revelado	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (30 g. L <sup>-1</sup> ); 1.5 ml 37% HCOH.L <sup>-1</sup> , Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (2 mg.L <sup>-1</sup> )	Se cambió el contenido apenas la mezcla se oscureció las veces que fueron necesarias hasta la observación de bandas definidas

#### ENSAYOS AGUDOS DE TOXICIDAD A 48 HS CON *DAPHNIA MAGNA*

Los cladóceros y copépodos pertenecen al grupo de los microcrustáceos del zooplancton y dada su gran sensibilidad, son los más utilizados en estudios ecotoxicológicos si se los compara con otros miembros de dicha comunidad. Además, su pequeño tamaño, cortos períodos generacionales y facilidad para los cultivos les otorgan relevancia y practicidad para estudios experimentales y de impacto ambiental. En este sentido, permiten evaluar no sólo los efectos directos, sino también el impacto indirecto de los contaminantes o estresores ambientales, otorgando mayor representatividad a los resultados obtenidos y estimaciones a largo plazo [116].

Para los ensayos se utilizó un sistema estático sin renovación [117]. En todos los casos se prosiguieron los procedimientos delineados por United States Environmental Protection Agency (EPA) [118].

No se adicionó alimento durante el período del ensayo. La medida considerada fue la inmovilidad y ausencia de respuesta al ser estimulados con una varilla de vidrio.

---

#### PROCEDIMIENTO

Durante los experimentos, todas las especies fueron cultivadas en envases de vidrio de 150 ml con filtrado (12 µm) y aireado. Se midieron las características fisicoquímicas del agua del estanque de acuerdo con Standard methods of the Examination of Water and Wastewater (2000): nitratos < 0.1 mg .L<sup>-1</sup>; nitritos: 0.01 mg .L<sup>-1</sup>; amonio: 0.29 mg .L<sup>-1</sup>; cloruros: 3.5 mg .L<sup>-1</sup>; sulfatos: 8.3 mg .L<sup>-1</sup>; alcalinidad total: 77 CaCO<sub>3</sub> mg .L<sup>-1</sup>; bicarbonatos: 94 mg .L<sup>-1</sup>; sodio: 7.7 mg .L<sup>-1</sup>; magnesio: 6.8 mg .L<sup>-1</sup>; calcio: 12.9 mg .L<sup>-1</sup>; potasio: 1.8 mg .L<sup>-1</sup>; demanda química de oxígeno: 10 mg .L<sup>-1</sup>; demanda biológica de oxígeno: 0.08 mg .L<sup>-1</sup>. El oxígeno disuelto fue de 6.4 (± 0.8) ppm; pH: 8.39 (± 0.24); conductividad: 245.33 (± 28.18) IS cm<sup>-1</sup>.

Se realizaron test toxicológicos con concentraciones de 1-5 ppm de APA comercial y se hicieron diluciones de estas concentraciones iniciales al 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 50% con 3 réplicas por condición más el control.

Previamente a los ensayos, se seleccionaron las hembras ovígeras del cultivo stock del laboratorio (microcrustáceos, INALI CONICET-UNL) y se aislaron en recipientes de vidrio de 100 ml en el medio control. Luego de la eclosión de los huevos, se removieron las

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

---

hembras y los neonatos se aislaron aleatoriamente en grupos de 5 individuos, en similares recipientes (de 100 ml) conteniendo el medio control (medio *Daphnia*) o los tratamientos. El medio "Daphnia" se preparó de la siguiente manera: Por cada 10 L de agua destilada, se agregó: 0.26 g  $K_2SO_4$ ; 2.24  $CaCl_2$ ; 2 g  $NaHCO_3$ .

Durante su mantenimiento, los organismos fueron alimentados ad libitum con un concentrado de *Chlorella sp* día por medio (densidad algal de 2.89105 células. $ml^{-1}$ ). Dichas algas fueron cultivadas según Borowitzka, 1988 [119].

---

### ANALISIS ESTADISTICOS

La sensibilidad de los organismos a cada tóxico se expresó como la concentración a la cual no se perciben movimientos para el 50% de los individuos, luego de 24 y 48 h de exposición ( $DL_{50}$ ).

A fin de estimar estos valores y su intervalo de confianza de 95% (IC;  $\alpha = 0,05$ ), se utilizó el análisis Probit basado en Finney, 1971 [116]. La validez del modelo para cada grupo de datos se determinó a través de la prueba de  $X^2$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

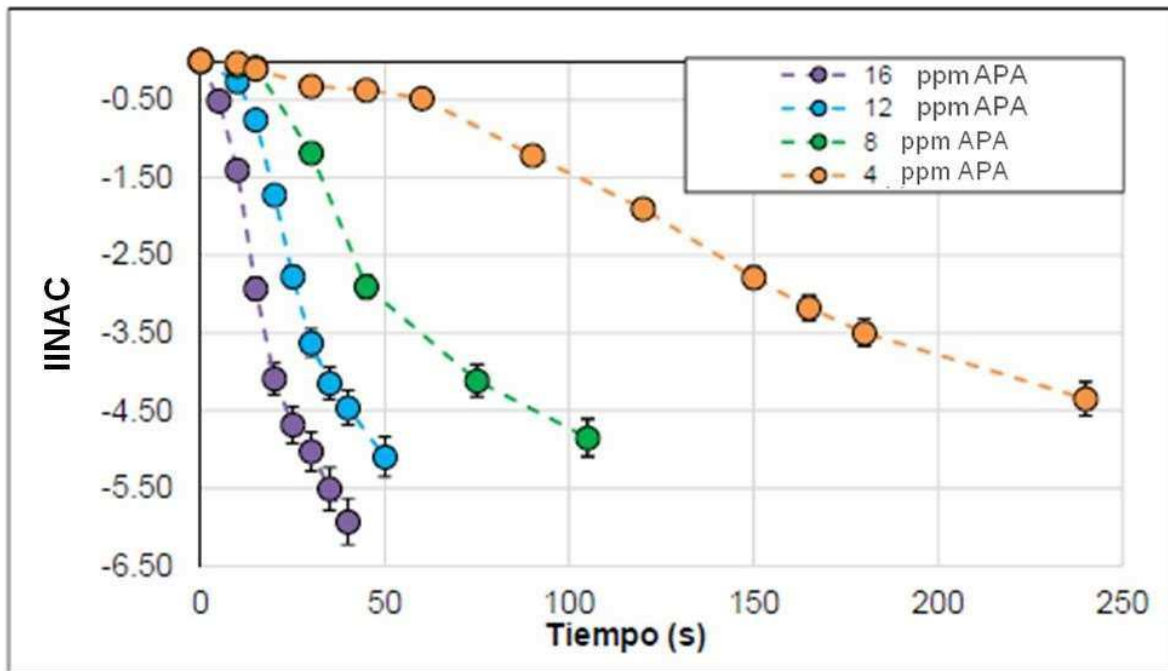
---

### INACTIVACION DE *ESCHERICHIA COLI*

En los ensayos experimentales de inactivación utilizando APA, representados en la Figura 39 se puede notar cómo a medida que aumenta la concentración empleada de oxidante aumenta la velocidad de desinfección y se observan cambios en el comportamiento de las curvas. Para concentraciones menores a 12 ppm se obtuvieron curvas típicas con 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, para concentraciones mayores a 12 ppm las curvas de inactivación son lineales, lográndose un  $IINAC=5$  en tiempos de contacto de 50 y 30 segundos para 12 ppm y 16 ppm de APA respectivamente. Rattanukul y Oguma, 2018 [87], modelaron la fase hombro y lineales de sus curvas utilizando el modelo de Geeraerd y col., 2000 [80] (detallado en CAPITULO 1, Tabla 6). Este modelo plantea términos que describen el hombro y la cola que se forman en las típicas curvas de desinfección donde la población microbiana es heterogénea y

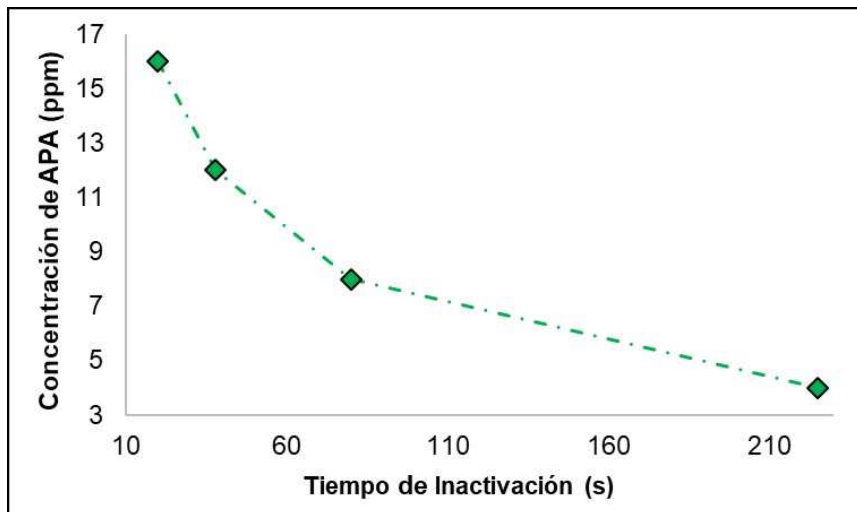
## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

reacciona en diferentes etapas al agente desinfectante. Luukkonen y col., 2014 [97], utilizó el modelo S para describir el comportamiento de la inactivación de *E. coli* utilizando una concentración de APA de 1.5 ppm.



**Figura 39.** Gráficas de inactivación para la cepa de *Escherichia coli* sometida a distintas concentraciones de APA.

En la Figura 40 es posible ver cómo a medida que aumenta la concentración de APA disminuye el tiempo en que se alcanza el 99.99% (IINAC= 4) de desinfección para la bacteria *E. coli*. La efectividad del proceso de desinfección aumenta de 2.75 a 11 veces al crecer la concentración de ácido de 8 a 16 ppm, respectivamente, respecto de la de 4 ppm. Otros autores han comprobado también la efectividad del APA como desinfectante en lo que respecta a tratamiento de efluentes terciarios y secundarios con tiempos más prolongados de contacto (10 a 15 minutos) y con menores cargas iniciales de microorganismos [49,97,108].



**Figura 40.** Representación del tiempo (segundos) que tarda cada una de las cuatro concentraciones de APA: 4, 8, 12, 16 ppm empleadas, para lograr un índice de inactivación de 4 log para *E. coli*.

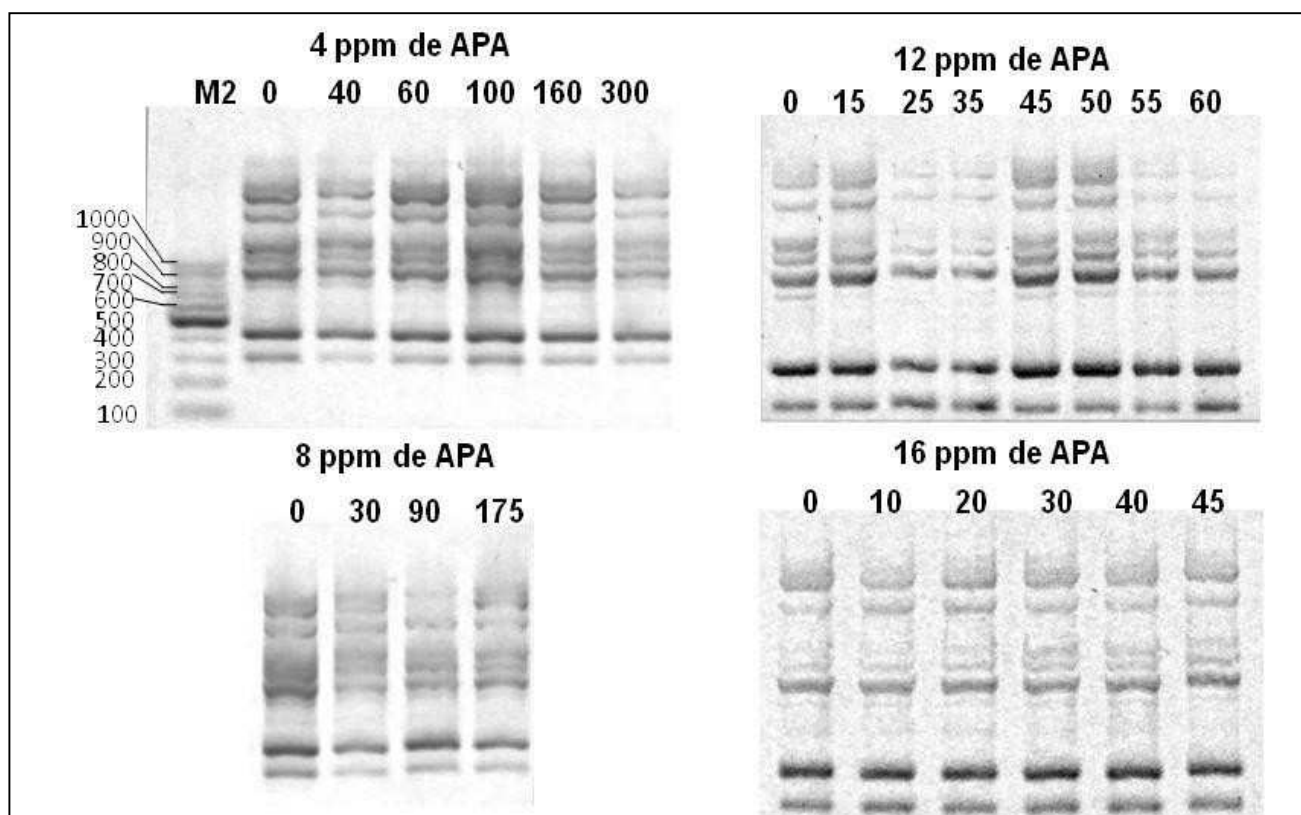
#### ANÁLISIS DEL DAÑO AL ADN PARA *ESCHERICHIA COLI*

El estudio del nivel del daño molecular utilizando APA se realizó con el objetivo de comparar el grado de afectación de este biocida con el de la radiación UVC en el ADN. Esta elección responde a una amplia selección bibliográfica que señala al APA como agente causante de daño al ADN [89, 100, 103, 120, 121].

Para nuestro sistema de estudio, en cuanto a la desinfección con APA en sus diferentes concentraciones (Figura 41), no se observó ninguna alteración del patrón de bandas de los geles de agarosa realizados a partir de la ERIC-PCR para *E. coli* (Figura 41).

Estos resultados estarían en coincidencia con la recopilación bibliográfica realizada por el European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) [122] que concluye que el APA no posee actividad mutagénica. Esto podría ser explicado por el hecho de que el principal punto de ataque del ácido son los enlaces disulfuro y gruposulfhidrilos de proteínas, además de promover la inestabilidad quimiosmótica de lipoproteínas [98].





**Figura 41.** Imágenes de las electroforesis en geles de agarosa al 1.5% para los perfiles de ERIC-PCR de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 luego de ser expuestas a las cuatro concentraciones de APA. M2 es el marcador de tamaño molecular 100 Marker. Los números sobre las calles indican los tiempos, en segundos, a los cuales fueron tomadas las muestras.

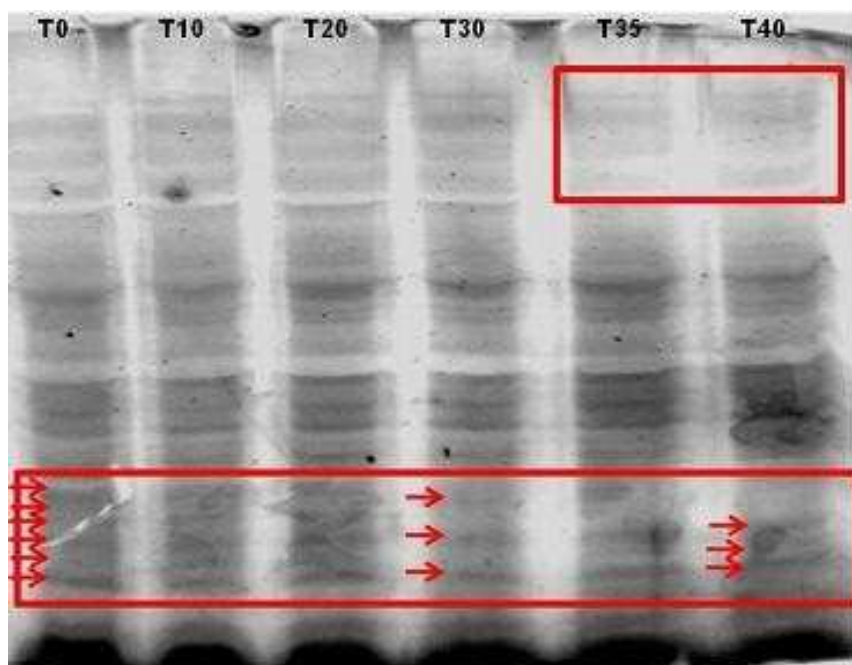
Que no se haya expresado en los geles de agarosa un daño hacia el ADN por parte del APA, indica que la relación entre el IINAC y el IDADN, es igual a 0, por consiguiente, el parámetro  $\zeta$  tiende a cero. Este comportamiento puede indicar la presencia de otro target molecular distinto al ADN celular que está produciendo el decaimiento de la población microbiana. Otro posible punto de ataque, que fue tratado en la introducción, podría ser la proteína de las bacterias. Es por este motivo que se inició la exploración de este posible daño mediante geles de poliácridamida desnaturizantes (SDS-PAGE) y se detallaron los resultados en la próxima sección.

#### ANALISIS DEL DAÑO A PROTEINA EN *ESCHERICHIA COLI*

Para el estudio de proteína se trabajó con 16 ppm de APA. En el gel de poliácridamida (Figura 42), se puede observar posibles alteraciones (desplazamientos de bandas, aparición de nuevas y desaparición de otras, etc) que podrían deberse a la acción del

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

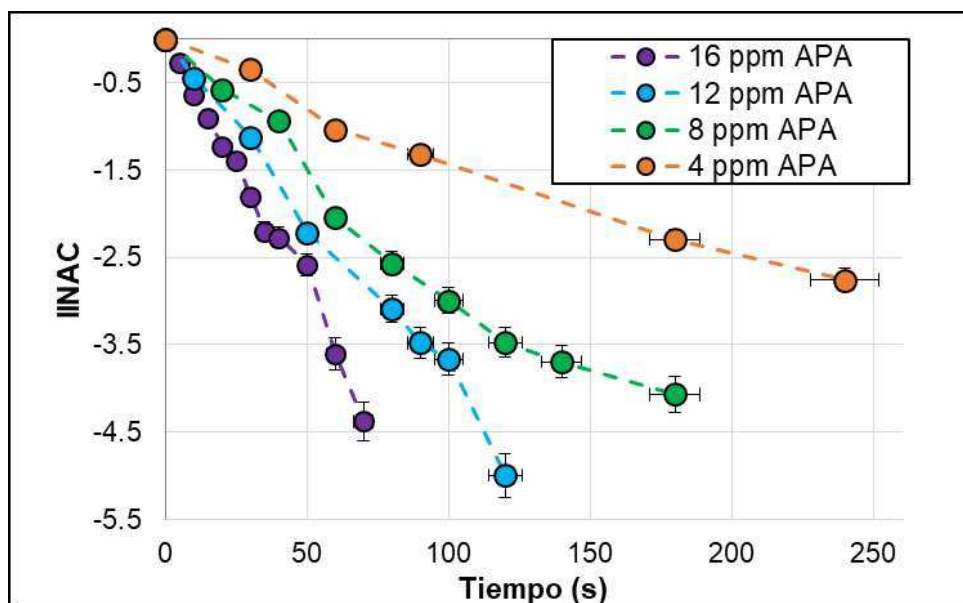
agente desinfectante utilizado hacia las proteínas que componen las células microbianas. Estas alteraciones comenzaron a manifestarse en la parte superior del gel a los 35 segundos de contacto y para las que se localizan en la parte inferior (péptidos de menor tamaño) a partir de los 30 segundos. Estos resultados estarían de acuerdo con los reportados por Du y col, 2018 [123] que comprobaron alteraciones de la metionina, cisteína e histidina luego de someterlas a la acción del ácido. Bradly y Frase, 1988 [101] reportaron que el daño por APA, al ser un oxidante fuerte, se produciría a nivel de elementos químicos como los grupos sulfhidrilos o enlaces disulfuros de proteínas. Estas oxidaciones que llevarían a la pérdida de grupos funcionales serían críticas para la viabilidad celular.



**Figura 42.** Gel heterogéneo de poliacrilamida al 15 % con tinción de nitrato de plata para *E. coli* tratada con 16 ppm de APA. 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.

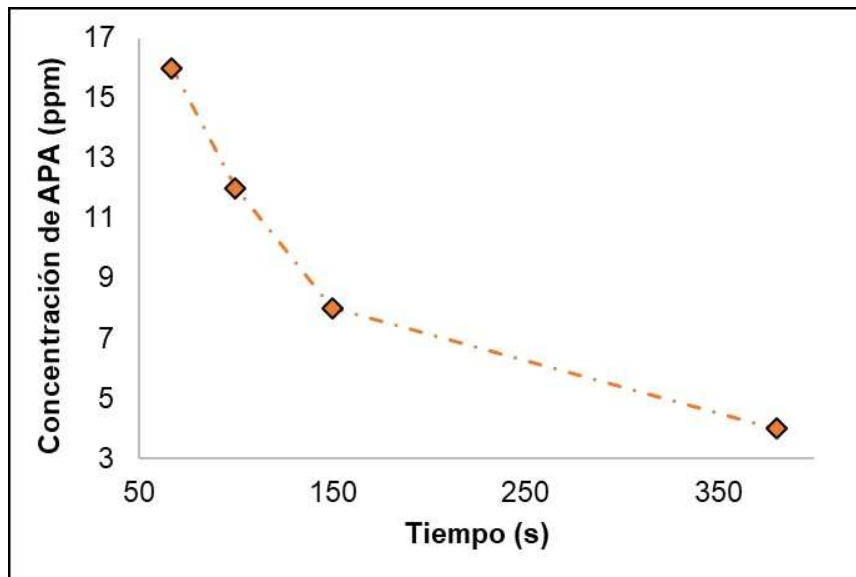
INACTIVACION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

En este apartado se muestran los resultados de los ensayos de inactivación con diferentes concentraciones de APA utilizando la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15442. Los resultados se expresaron en la gráfica de la Figura 43, como el IINAC ( $\log(C/C_0)$ ) vs tiempo (segundos).



**Figura 43.** Gráficas de inactivación para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* sometida a distintas concentraciones de APA.

Las curvas obtenidas tras estos ensayos presentan un comportamiento lineal para todas las concentraciones trabajadas, 4, 8, 12 y 16 ppm de APA. Se puede notar cómo a medida que incrementa la concentración de ácido aumenta la velocidad de reacción. Si observamos la gráfica de la Figura 44, donde se representa el tiempo de contacto que se necesitó en cada ensayo para lograr un IINAC=4, se puede ver cómo a medida que la concentración de APA aumenta disminuye el tiempo requerido para lograr ese grado de inactivación microbiana. También es posible notar que las concentraciones entre 8 y 16 ppm son de 2.5 a 5.6 veces más efectivas que la menor concentración empleada (4 ppm). Lambert y col, 1999 [124], obtuvieron resultados diferentes al que nosotros conseguimos, ya que sus datos formaron curvas no lineales y con cola, al trabajar con concentraciones de ácido de entre 0.76 y 6.8 ppm de APA aproximadamente, sobre una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Estos autores pudieron ajustar sus resultados experimentales con el modelo experimental de Hom. En nuestro caso este modelo no parecería ser el apropiado ya que las curvas comienzan en forma lineal y no se observa ninguna formación evidente de cola en los tiempos trabajados. Por otro lado, Sagripanti y col, 2000 [125], obtuvieron un muy buen descenso logarítmico (8 log) usando una alta concentración de APA durante la inactivación de *P. aeruginosa*.



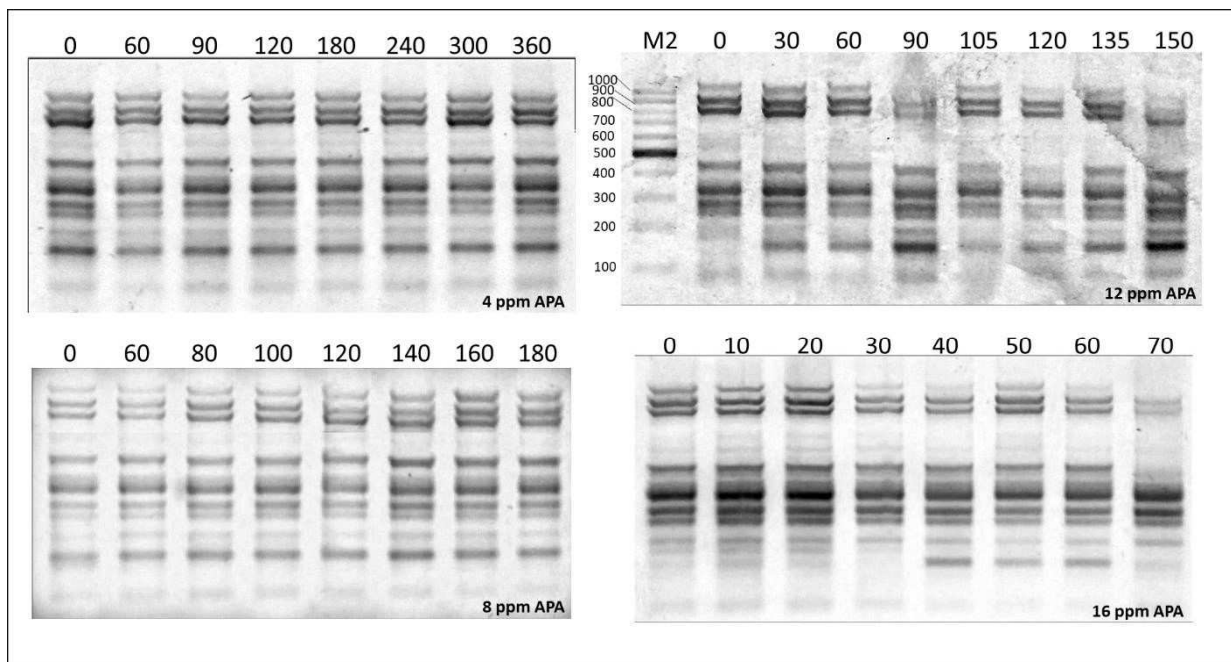
**Figura 44.** Representación del tiempo (segundos) que tarda cada una de las cuatro concentraciones de APA: 4, 8, 12, 16 ppm, empleadas, para lograr un índice de inactivación de 4 log cuando se trabajó con *P. aeruginosa*.

#### ANÁLISIS DEL DAÑO AL ADN PARA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

En la Figura 45 se muestran las imágenes de los geles de agarosa obtenidos de la amplificación por ERIC-PCR del ADN de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, luego de ser sometida a 4, 8, 12 y 16 ppm de APA. Los resultados de las amplificaciones muestran cómo en el caso en el que se aplicó una concentración de 4 y 8 ppm de APA, el ADN bacteriano no sufrió alteraciones detectables por nuestra herramienta de estudio. En cambio, cuando se usó 12 y 16 ppm de ácido, se vieron modificaciones en los tiempos finales de muestreo. En cuanto al ensayo de 12 ppm se puede ver que sólo es afectada la banda de 1100 pb (la de mayor tamaño para el patrón de *Pseudomonas*), a los 150 segundos de contacto. Si se analiza el patrón de bandas que se generó para la corrida de 16 ppm, se puede advertir que el daño comienza a manifestarse a los 60 segundos para la banda de 1100 pb que desaparece completamente del gel a los 70 segundos de reacción. También se puede ver cómo al mismo tiempo ya no amplifica la banda de 600 pb. Si enfocamos el análisis al final del gel donde se encuentran las bandas de menor tamaño, se puede apreciar cómo aumenta la amplificación de la banda de 200 pb a partir de los 40 segundos, hasta que se pierde completamente a los 70 segundos. Se ha comprobado que a altas concentraciones de APA con 20 a 60 segundos de exposición se activan ciertos genes de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y otros suprimen su actividad. Bajo la

CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

influencia de este desinfectante el grupo de genes que corresponde a la “adaptación, protección y regulación negativa” están sobre expresados. El grupo funcional de genes que sufren una regulación negativa es la de “reguladores transcripcionales” y los genes encargados del transporte de glucosa. Los genes de la catalasa, más específicamente el KatB, se ven sobre expresados debido a que están involucrados con la resistencia a peróxidos [126,127]. Este trabajo indica que existe, por lo menos alteraciones funcionales a nivel de transcripción de genes, al ser sometidas las bacterias a la acción del APA. Coyle y col, 2014 [100], afirmaron que, si la descomposición del ácido se produce a un pH inferior a 8.2, como es el caso de este sistema de trabajo, entonces la reacción que predomina es la de formación de hidroxilos. Estos agentes altamente oxidantes probablemente posean acción directa sobre la molécula de ADN, ya que ésta se encuentra cargada negativamente al igual que la pared celular microbiana, este hecho podría explicar las alteraciones que se expresan en los geles de agarosa para la cepa en estudio.



**Figura 45.** Geles de agarosa al 2 % de los productos de ERIC-PCR para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 después de ser sometidas a desinfección con ácido peracético (4, 8, 12 y 16 ppm). Los números indican el tiempo de muestra en segundos. M2: marcador de tamaño molecular, 100 Marker.

#### RESULTADOS PRUEBAS DE TOXICIDAD CON *DAPHNIA MAGNA*

El valor de DL<sub>50</sub> para *D. magna* fue la concentración de 2 ppm de solución comercial de APA diluida al 35%, es decir a una concentración de 0.7 ppm de ácido. La DL<sub>50</sub> 24-48 h (concentración eficaz que inmoviliza del 50% de las *Daphnias* después de 24 a 48 horas de ensayos) se calculó utilizando el método estadístico de Litchfield – Wilcoxon [128]. Los ensayos toxicológicos utilizando el mismo organismo para cloro residual resultaron en una DL<sub>50</sub> de 0.014 ppm [129], esto indica que la tolerancia de este microcrustacio es 50 veces mayor para APA que para cloro.

Según información ecológica de la hoja de seguridad del hipoclorito de sodio la concentración residual en agua de bebida es de 0.2 a 6 ppm, lo que es mucho más alto a los valores de DL<sub>50</sub> reportados para este compuesto. Esto refiere a tener un cuidado especial al ser vertida el agua clorada en cursos de agua naturales ya que impactaría de forma negativa en el zooplancton de este ecosistema.

Sería interesante, para completar este estudio realizar análisis adicionales, como ensayos de toxicidad crónica, pruebas de movilidad, etc.

---

#### ANALISIS COMPARATIVO ENTRE *ESCHERICHIA COLI* Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

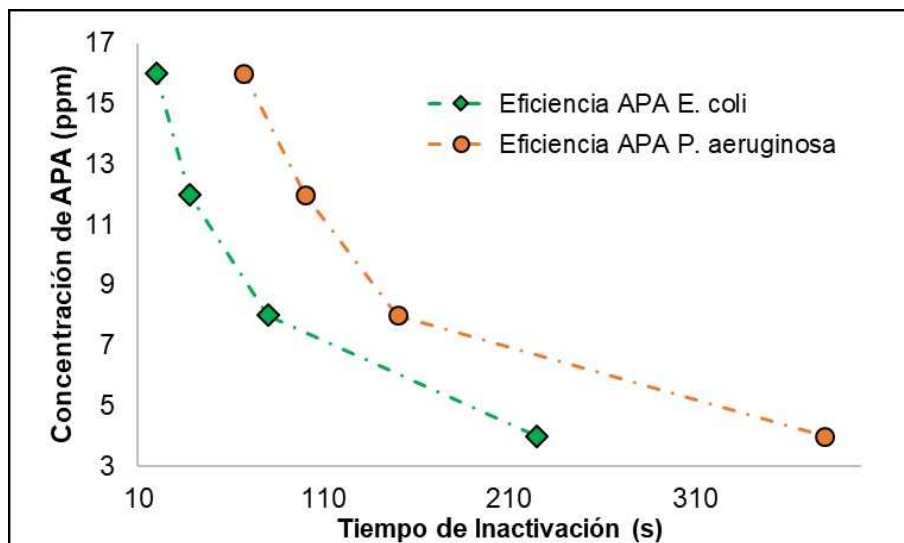
Para empezar con el análisis comparativo de los microorganismos estudiados respecto a la inactivación con APA, en la Figura 46, se muestra una gráfica que contiene el tiempo que tomó para cada concentración de agente químico empleada lograr un 99.99% de inactivación para *E. coli* y *P. aeruginosa*. Aquí se puede ver que los datos de *P. aeruginosa* están desplazados hacia la derecha con respecto a los de *E. coli*. Esto implica que la cepa de *E. coli* empleada es más sensible al ácido en todas las concentraciones usadas. Falsini y col, 2006 [130] y Mezzanotte y col., 2007 [131], comprobaron en sus ensayos que la cepa de *E. coli* que utilizaron, fue más sensible que los coliformes totales a la exposición con APA.

La diferencia en los tiempos de inactivación entre los microorganismos empleados va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de APA, siendo de 155 segundos cuando se utilizó 4 ppm de ácido y de 47 segundos cuando se trabajó con 16 ppm. Azzellino y col, 2011 [132] demostraron que la desinfección con APA depende más de la dosis que

## CAPITULO 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO

del tiempo de contacto. Esto indica que el concepto tradicional de  $C t$  (cantidad de dosis x tiempo de contacto) puede necesitar un coeficiente de ponderación para el término  $t$ .

Coyle y col, 2014 [100] afirmaron que para que la desinfección con APA sea un proceso eficiente debe ocurrir un descenso del 99,99% de los microorganismos viables en menos de 10 min de contacto con el ácido, lo que ocurre en todas las concentraciones empleadas en este trabajo.



**Figura 46.** Gráfica que muestra las eficiencias de los procesos de desinfección con APA para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizadas.

Por otro lado, se comprueba que la radiación UV es más eficiente que la administración de APA (siempre y cuando se trabaje en aguas claras) para la desinfección de *E. coli*. Esto se evidencia en el hecho de que para lograr un  $\ln NAC = 5$  utilizando ácido en el mismo rango de tiempo que el transcurrido para la radiación UV (Figura 19 del capítulo 1) fueron necesarias altas dosis de desinfectante (12 y 16 ppm) (Figura 39). Para *P. aeruginosa* sucede algo similar, sólo que con ninguna concentración de ácido se logra un nivel de inactivación semejante al que produce la radiación UV en sus tres intensidades (Figura 26 del capítulo 1 y Figura 43 del capítulo 2). Estos resultados concuerdan con los reportados por de Souza y col., 2015 [133] que obtuvieron mayor descenso logarítmico cuando utilizaron UV en vez de APA.

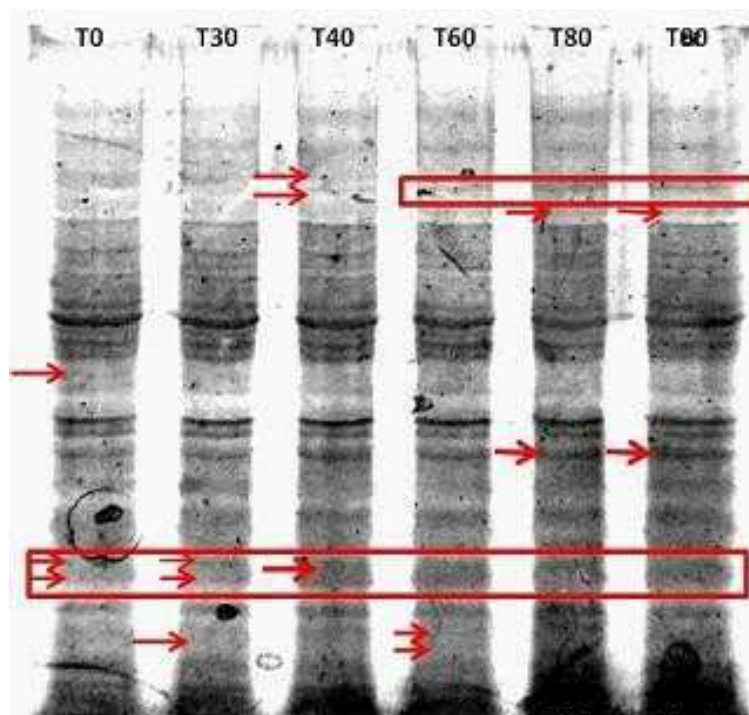
Con respecto al daño al ADN pudimos obtener al amplificarlo mediante ERIC-PCR que sólo se manifestó daño físico, o sea que se detuvo el progreso de la ADN polimerasa, en las

cepas de *P. aeruginosa*. Este daño, es menor al que se produjo con la radiación UV en estas cepas y no permitió el seguimiento del proceso a través de esta herramienta molecular cómo si lo permite el daño logrado por la radiación UVC.

Estos resultados sobre el ADN indicarían que el parámetro  $\zeta$ , que refleja la relación que existe entre la funcionalidad del IINAC y el IDADN, tiende a 0 ya que no hay relación entre ambos. Debido a este hallazgo, que determina un target de ataque del APA diferente al ADN, se tomó la decisión de corroborar la existencia de daño hacia otra molécula muy importante y abundante en la composición celular como son las proteínas. Para llevar a cabo este primer análisis exploratorio, se recurrió a los geles desnaturalizantes de poliacrilamida en matriz heterogénea. Para la cepa de *E. coli* obtuvimos modificaciones en los péptidos generados tras la desnaturalización. Esto abre la puerta a la aplicación de técnicas con mayor sensibilidad y resolución (geles en 2D, análisis por MALDI-TOFF, entre otros) que confirmarían y darían más detalle sobre la existencia de estas alteraciones producidas durante el proceso de desinfección.

A modo de comparación y para explorar lo que sucedía a nivel del proteoma con la cepa de *E. coli* sometida a UV, se realizó en forma consecuente el mismo análisis en gel de SDS-PAGE. Para esto se tomaron las muestras de células sometidas a 100% de radiación, el resultado se muestra en la Figura 47. Se puede ver en esta figura como se manifiestan alteraciones en los péptidos marcados en líneas rojas. Estas alteraciones se encuentran dispersas por todo el gel indicando un daño global pero sutil hacia los péptidos. Estas zonas dañadas comienzan a notarse a partir de los 40 segundos de exposición a la radiación.





**Figura 47.** Imagen del gel de poliacrilamida obtenido para la cepa de *E. coli*, luego de ser sometida a radiación UVC. Los números precedidos por una letra T, indican el tiempo de muestreo en segundos.

#### CONCLUSION PARCIAL

En resumen, en este capítulo se pudo demostrar una alta efectividad del APA para la desinfección de aguas claras de dos microorganismos Gram negativos indicadores de calidad de agua: *P. aeruginosa* y *E. coli*. Las concentraciones empleadas de ácido demostraron ser más eficientes para *E. coli* en los tiempos tratados. Además, se pudo demostrar que el ADN de esta bacteria no se vio afectado a nivel estructural, lo contrario que ocurre con *P. aeruginosa* que sí sufre cambios estructurales en su ADN que impiden la progresión de la polimesasa y que se evidencia, por lo tanto, como la ausencia de bandas en el gel de agarosa. La falta de evidencia de daño al ADN estaría indicando que existe otro punto de ataque por parte del agente desinfectante, esto se demuestra analizando el parámetro  $\zeta$  que tiende a 0 cuando se relacionan los datos de IINAC e IDADN para estos estudios. Este hecho fue el puntapié para el abordaje del estudio del daño a la proteína mediante los ensayos de SDS-PAGE que arrojaron indicios de que existen alteraciones en los péptidos que conforman el pool proteico de la cepa de *E. coli* expuestos a APA.

CAPITULO 3:

**ESTUDIO DEL PROCESO  
DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO  
PERACETICO EN COMBINACION CON  
RADIACION UVC**



CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

INTRODUCCION

DESINFECCION DEL AGUA MEDIANTE PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACION

Los procesos avanzados de oxidación (PAOs) se encuentran incluidos dentro de los procesos de oxidación química más efectivos para el tratamiento de agua [18]. Estas tecnologías están basadas en procesos fisico-químicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. Son definidas como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, especialmente el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) [23]. Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía. Se ha sugerido que su alta eficiencia es debida a su viabilidad termodinámica y a una velocidad de reacción incrementada por la participación de radicales libres [134]. Estas tecnologías tienen ciertas ventajas sobre las convencionales al permitir la mineralización de los contaminantes a través de transformaciones químicas que involucran la acción de especies altamente oxidantes. Además, usualmente no generan barros ni subproductos de reacción o lo hacen en baja concentración. Mejoran las propiedades organolépticas del agua luego de los tratamientos convencionales para la desinfección y reaccionan con contaminantes a bajas concentraciones. Funcionan como un pretratamiento sobre contaminantes refractarios, para luego poder ser aplicado uno más económico como, por ejemplo, el biológico [134,135].

Los radicales OH son especies extraordinariamente reactivas, atacan la mayor parte de las moléculas orgánicas con constantes de velocidad generalmente del orden de  $10^6$ - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [136]. La formación de este radical libre del oxígeno puede darse a través de varios procesos, los cuales pueden involucrar o no la acción fotoquímica como se muestra en la Tabla 15.

El tratamiento del agua por medio de PAOs constituye un tema central de investigación que cubre áreas tales como:

**CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC**

- 1) tratamiento de efluentes industriales que incluye, entre otros, destilería, agroquímicos, blanqueamiento de kraft, pulpa y papel, tinte textil, yacimientos petrolíferos y desechos de chapado de metales;
- 2) tratamiento de efluentes peligrosos, incluido hospitalarios y de desechos de mataderos;
- 3) eliminación de patógenos y residuos farmacéuticos persistentes y disruptores endocrinos de los efluentes de la planta municipal de tratamiento de aguas residuales (EDAR) (es decir, después del tratamiento secundario);
- 4) eliminación de micro contaminantes orgánicos como pesticidas y metales pesados tales como el arsénico y cromo;
- 5) acondicionamiento y estabilización de lodos biológicos de las PTAR [137].

**Tabla 15:** Tecnologías avanzadas de oxidación que involucran o no reacciones fotoquímicas (modificado de Domenech y col, 2015 ) [134]

<b>Procesos no fotoquímicos</b>	<b>Procesos fotoquímicos</b>
Ozonización en medio alcalino ( $O_3/OH^-$ )	Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV)
Ozonización con peróxido de hidrógeno ( $O_3/H_2O_2$ )	UV/peróxido de hidrógeno
Procesos Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ ) y relacionados	UV/ $O_3$
Oxidación electroquímica	Foto-Fenton y relacionadas
Radiólisis y tratamiento con haces de electrones	Fotocatálisis heterogénea
Plasma no térmico	
Descarga electrohidráulica - Ultrasonido	

**PROCESOS FOTOQUIMICOS**

Las tecnologías fotoquímicas presentan las ventajas de ser simples, limpias, relativamente económicas y generalmente más eficientes que los PAOs químicos. Además, pueden desinfectar las aguas y destruir los contaminantes. En consecuencia, las radiaciones UV se han combinado con oxidantes potentes como  $O_3$ ,  $H_2O_2$  y APA, que incluyen, en algunos casos, una catálisis con  $Fe^{3+}$  o  $TiO_2$ , lo que resulta en varios tipos de PAOs fotoquímicos importantes. Estos procesos fotoquímicos pueden degradar y / o destruir contaminantes mediante tres posibles reacciones, incluida la fotodescomposición, basada en la radiación UV, la excitación y la degradación de las moléculas contaminantes, la oxidación por acción directa de los oxidantes empleados y la oxidación por fotocatalisis (con  $Fe_3^+$  o  $TiO_2$ ), induciendo la formación de radicales  $\bullet OH$ . [138].

**CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC**

Las características especiales de las tecnologías de tratamiento UV del agua y el aire se muestran en la Tabla 16. De la observación de esta tabla es evidente que existe una diferencia notable en el manejo numérico de las técnicas de desinfección UV y oxidación fotoiniciada, es decir, la primera se analiza en términos de la fluencia  $H_0 / J m^{-2}$  de la radiación germicida UV, mientras que los últimos procesos dependen inequívocamente de la fluencia de fotones absorbidos  $H_{p,0} / mol m^{-2}$ . En este caso, un fotón absorbido se trata como un reactivo selectivo utilizado para la escisión de enlaces químicos que permite los cálculos estequiométricos.[139].

**Tabla 16.** Características especiales de las tecnologías de tratamiento UV del agua y el aire (modificado de Oppenländer, 2003) [139]

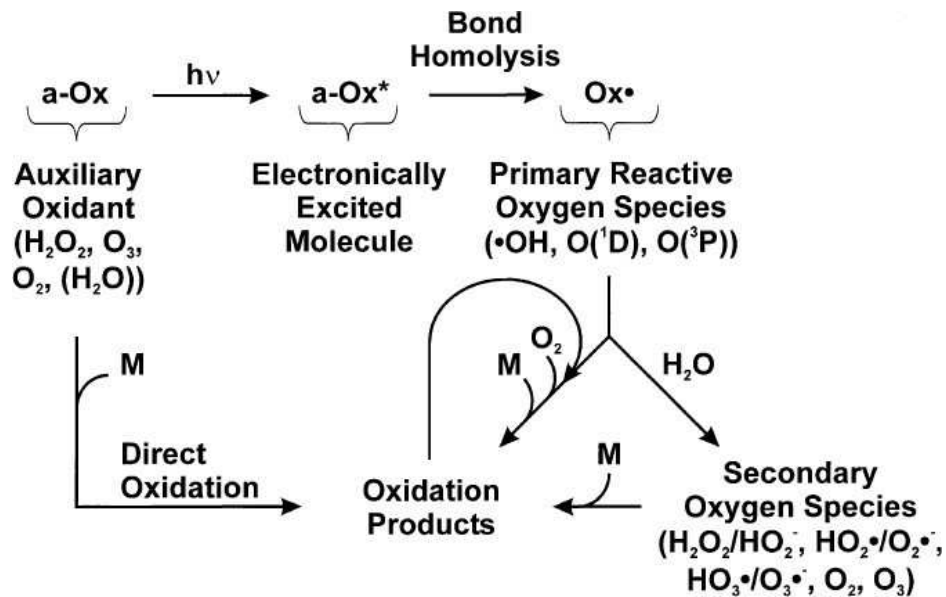
<b>Desinfección UV</b>	<b>Técnicas de oxidación foto-iniciada</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivación de una amplia gama de microorganismos con una fluencia adecuada (<math>H_0/Jm^{-2}</math>)</li> <li>• Desinfección simple y de confianza con una alta performance, segura y de fácil manipulación, almacenado y traslado</li> <li>• Permite la no acumulación de virus, bacterias y otros microorganismos</li> <li>• Mínima formación de químicos tóxicos y ausencia de sustancias mutagénicas o carcinogénicas</li> <li>• No influye sobre el olor o sabor del agua o aire</li> <li>• No se expone al personal a utilizar químicos peligrosos</li> <li>• Sistemas de punto de uso a escala doméstica o para campamentos</li> <li>• Aplicaciones en zonas de riesgo para la salud como hospitales</li> <li>• Usado en industrias de procesamiento de alimentos</li> </ul> <p>La ingeniería modular facilita el escalado y es fácilmente automatizable. Sistemas continuos o cerrados y tratamientos de grandes volúmenes de flujo Bajo mantenimiento preventivo y requerimientos de operación con seguridad confiable durante la operación Una instalación remota y descentralizada es posible</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clivaje de enlaces químicos con una adecuada fluencia de fotones (<math>H_{p,0}/mol m^{-2}</math>)</li> <li>• Degradación oxidativa compuestos bactericidas o no biodegradables y un amplio espectro de contaminantes tóxicos acompañantes, disminuyendo la toxicidad del agua</li> <li>• La oxidación parcial generalmente produce la formación de productos de bajo peso molecular inocuos y biodegradables, como ácidos carboxílicos y aldehídos.</li> <li>• Detoxificación de contaminantes orgánicos persistentes. No produce efecto de hipersalinización.</li> <li>• No hay formación de lodos, mínimo tratamiento de residuos que no requieren disposición final</li> <li>• Implementación del concepto de tratamientos sinérgicos con tecnologías convencionales (sistema híbrido), ejemplo: carbón activado, tratamiento biológico</li> <li>• Muchas alternativas para la selección del oxidante auxiliar (<math>H_2O_2</math>, <math>O_3</math>, o sus mezclas)</li> <li>• Alta eficiencia en la remoción de micro contaminantes por oxidación o mineralización</li> </ul>

OXIDACIONES FOTOINICIADAS

### CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

En la Figura 48 se presenta una situación idealizada de reacciones de oxidación fotoiniciadas que es la base de todos los PAOs en presencia de un oxidante auxiliar, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{O}_3$ . El oxidante auxiliar (a-Ox) que contiene átomos de oxígeno debe absorber la radiación electromagnética con la formación de una molécula excitada electrónicamente (a-Ox \*). Posteriormente, la escisión homolítica de un enlace químico conduce a la formación de especies de oxígeno reactivo primario (Ox •) que son principalmente radicales hidroxilo, o átomos de oxígeno en sus estados base (3P) o excitado (1D). Debido a la gran reactividad de estas especies transitorias, su concentración suele ser muy baja. La reacción inmediata con las moléculas de sustrato M en presencia de oxígeno inicia predominantemente una serie compleja de reacciones radicales que incluyen la química de los radicales peroxilo [140,141]. En agua o aire, las especies de oxígeno reactivas primarias pueden transformarse mediante radicales, transferencia de electrones o reacciones ácido / base a especies de oxígeno secundarias que pueden oxidar nuevamente las moléculas de sustrato. Además, la reacción de los radicales hidroxilo con iones carbonato o bicarbonato conduce eficazmente a la formación de aniones radicales  $\text{CO}_3 \bullet - / \text{HCO}_3 \bullet -$ , que se conocen como oxidantes terciarios selectivos. Este esquema de reacciones es sustancialmente complicado por el hecho de que los oxidantes auxiliares pueden oxidar ciertos contaminantes del agua por oxidación directa relacionada con su potencial de reducción. Este es especialmente el caso de los PAOs basados en ozono porque  $\text{O}_3$  tiene un alto potencial de reducción E de 2.07 V para la pareja  $\text{O}_3, \text{H}^+ / \text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$ . Además, los productos de oxidación se acumulan durante el curso de la oxidación y, por lo tanto, se introducen en el ciclo de oxidación hasta que finalmente todos los átomos de carbono orgánicos se transforman en dióxido de carbono (mineralización) [139].



**Figura 48.** Situación idealizada de reacciones de oxidación fotoiniciadas que es la base de todos los PAOs en presencia de un oxidante auxiliar (modificado de Oppenländer, 2003) [139]

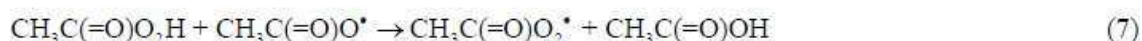
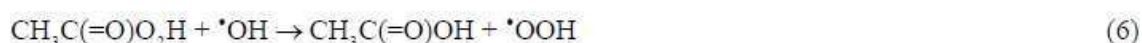
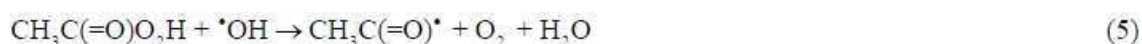
#### PROCESO APA/UV

El ácido peracético (APA,  $CH_3C(=O)OOH$ ) es un peroxiácido orgánico conocido como agente antimicrobiano de amplio espectro. Las soluciones comerciales de APA, sintetizadas por reacción catalizada por ácido del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con ácido acético ( $CH_3C(=O)OH$ ), son típicamente una mezcla de APA,  $H_2O_2$ ,  $CH_3C(=O)OH$  y agua. El potencial de oxidación de APA es mayor que el de  $H_2O_2$  (1.96 vs. 1.78 Vs) al igual que su efecto antimicrobiano, aunque también se han informado efectos sinérgicos de APA y  $H_2O_2$  en la solución comercial de APA para la inactivación de bacterias. La especie no disociada de APA ( $APA^0$ ) a un pH inferior a 8.2 ( $pK_a$ , APA,  $25^\circ C$ ) se considera la forma biocida en lugar de la especie disociada ( $APA^-$ ).

El APA puede activarse mediante radiación UV o ciertos catalizadores para generar radicales (Figura 49); así, el proceso UV / APA puede clasificarse como un proceso de oxidación avanzada (PAO). Bajo irradiación UV, se produce la escisión homolítica del enlace O-O del APA para generar un radical acetiloxilo ( $CH_3C(=O)O\bullet$ ) y  $\bullet OH$  (Figura 49 ecuación 1). Posteriormente,  $CH_3C(=O)O\bullet$  se disocia rápidamente a radical metilo ( $\bullet CH_3$ ) y  $CO_2$ , y  $\bullet CH_3$  puede combinarse con oxígeno para producir un radical peroxi débil ( $CH_3O_2$

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

•) (Figura 49 ecuaciones 2-3). Mientras tanto, el •OH puede atacar la molécula de APA (Figura 49 ecuaciones 4-6).  $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}^\bullet$  también puede reaccionar con APA para producir radical acetilperoxilo ( $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}_2^\bullet$ ) (Figura 49 ecuación 7). Los diversos radicales formados en el proceso UV / APA pueden exhibir diferentes reactividades. Además, debido a que algunas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  siempre están presentes en las soluciones de APA, el PAO UV /  $\text{H}_2\text{O}_2$  coexiste en el proceso UV / APA [142].



Es bien conocido que •OH puede reaccionar rápidamente con muchos microcontaminantes ( $k = 10^6 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

**Figura 49.** Sistema de ecuaciones de fotoactivación del APA (modificado de Cai y col, 2017) [142]

AVANCES EN EL USO DE LA COMBINACION APA/UV

Algunos autores han avanzado en la investigación de la combinación de luz UV y APA (es decir, UV / APA) para la desinfección de aguas residuales, y reportaron beneficios sinérgicos y una mayor eficiencia de inactivación para los microorganismos entéricos en comparación con los tratamientos individuales de APA, UV,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y UV /  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La aplicación de rayos UV y APA fue más eficiente cuando la introducción de APA fue antes que de la irradiación UV, no siendo lo mismo en el orden opuesto. El efecto sinérgico de UV / APA para la desinfección puede atribuirse a la formación de radicales hidroxilo (•OH) y oxígeno "activo" de la fotólisis de APA, como fue detallado anteriormente. Por lo tanto, la aplicación de UV y APA combinados para la desinfección de aguas residuales puede reducir considerablemente la dosis de desinfectante, el tiempo de contacto y los costos [142].



### CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

Formisano y col., 2016 [143] observaron una inactivación total de *E. coli* por el proceso de luz solar / APA (8 mg APA L<sup>-1</sup>) después de 120 minutos de tratamiento (QUV ¼ 7.42 kJ L<sup>-1</sup>) en aguas residuales, con una densidad inicial de *E. coli* de 10<sup>5</sup> UFC/ml. Lubello y col., 2002 [109] en su trabajo sobre desinfección de aguas residuales por proceso UVC / APA, observaron la inactivación de *E. coli* de 3.6 y 4.5 unidades logarítmicas para 2 y 4 ppm de APA, respectivamente, y una dosis de UVC de 120 mW s cm<sup>2</sup>.

El proceso UV / APA ha sido investigado recientemente en la reducción de contaminantes de preocupación emergente (o conocidos como CEC por sus siglas en inglés) [144] en aguas residuales. En particular, se demostró que es altamente eficiente a un pH casi neutro para la degradación de los productos farmacéuticos, ya que el valor de pKa de APA (8.2) cae dentro del pH inherente de las aguas residuales. El efecto sinérgico de la combinación de UV y APA también se ha atribuido a la formación de HO• y oxígeno activo por la fotólisis del APA. Recientemente se han propuesto mecanismos de destrucción donde HO• daña progresivamente las estructuras de la superficie celular que conducen a la liberación de material / moléculas intracelulares. Por lo tanto, es probable que los mecanismos de inactivación bacteriana y la degradación de CEC, cuando ocurre la fotólisis del APA se deba a una combinación de tres fenómenos ocurriendo simultáneamente: el ataque de los fotones, la oxidación por parte del agente químico y por la formación de OH• [145,146].

#### OBJETIVOS

- ➔ Estudiar la desinfección de agua con *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante la combinación de APA/UV como proceso avanzado de oxidación.
- ➔ Analizar la presencia de daño hacia el ADN producido por el proceso de desinfección con la técnica de ERIC-PCR.
- ➔ Analizar el proceso de desinfección desde el enfoque de cuantificación de daños sobre los microorganismos, a partir de los resultados experimentales obtenidos y la utilización de los índices y parámetros definidos.

#### MATERIALES Y METODOS

---

#### MATERIALES Y DISPOSITIVO UTILIZADOS

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

Los microorganismos utilizados fueron las cepas de *Escheria coli* ATTC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, descritas en el CAPITULO 1. Los reactivos que se utilizaron en esta parte del trabajo para el cultivo de microorganismos y para realizar la técnica de biología molecular, fueron descritos en el CAPÍTULO 1 y 2. El dispositivo experimental utilizado es el mismo al utilizado en los dos capítulos anteriores y detalladamente descrito en el CAPÍTULO 1.

ENSAYOS EXPERIMENTALES Y TECNICAS ANALITICAS

El diseño del ensayo experimental para los dos microorganismos empleados, con las distintas concentraciones de APA utilizado se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Descripción de los diseños experimentales que se realizaron en los ensayos con APA/UV sobre las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Número de corridas	Cepa	UVC Gw (W/cm <sup>2</sup> )	Concentración de APA	Conc. de microorganismos (CFU/ ml)	Tiempo de toma de muestra (segundos)
3	<i>E. coli</i>	0,00105	4 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30
3	<i>E. coli</i>	0,00105	8 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21
3	<i>E. coli</i>	0,00105	12 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50
3	<i>P. aeruginosa</i>	0,00105	4 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 30, 60, 90, 180, 240
3	<i>P. aeruginosa</i>	0,00105	16 ppm	10 <sup>7</sup>	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70

Los ensayos se llevaron a cabo colocando la solución de trabajo en el reactor con la concentración de ácido correspondiente. Una vez que se añadió el microorganismo, y éste se homogeneizó en el reactor, se procedió a encender la lámpara y a tomar las muestras. La muestra a tiempo cero se realizó con la lámpara apagada.

La preparación previa del inóculo se llevó a cabo como se encuentra descrito en el CAPÍTULO 1. La determinación y la preparación de las soluciones de trabajo de APA se realizaron de la misma manera que en el CAPÍTULO 2. La toma de muestra se realizó de la misma manera como fue especificado en el (CAPÍTULO 2). Se realizó el recuento de microorganismos viables con el mismo procedimiento que se describe en el CAPITULO 1.

### CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

Finalmente, se procedió a detectar el daño producido en el ADN a través de la técnica de ERIC-PCR detallada en el CAPÍTULO 1, y se calculó el índice de inactivación de igual forma que la detallada en el CAPÍTULO 1 para los ensayos con UVC.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

##### INACTIVACION DE *ESCHERICHIA COLI*

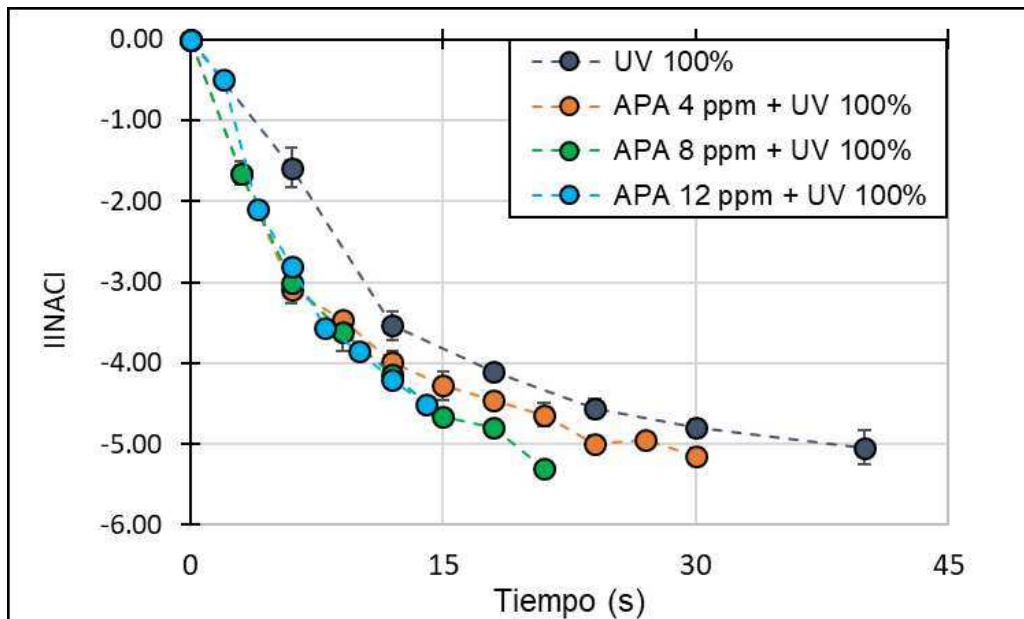
---

En la Figura 50 se observan las curvas de inactivación para *E. coli* utilizando diferentes concentraciones de ácido peracético (4 a 12 ppm) en combinación con el 100% de radiación UVC. Se puede apreciar que las curvas generadas de los dos agentes combinados no son lineales y obedecen principalmente al comportamiento de la curva obtenida cuando se trabajó solo con radiación. Cuando se administró 12 ppm de ácido se obtuvo un hombro al comienzo de la inactivación. Se puede notar en la Figura 50 cómo el agregado de ácido mejora el rendimiento del proceso de desinfección. En la Tabla 18 se muestran los tiempos de operación para alcanzar un IINAC=4, es decir el 99.99% de desinfección, cuando se trabajó solo con radiación UVC, APA solo y la combinación de ambos. Se puede apreciar en esta tabla que se tardó 18 segundos en llegar al descenso de 4 log para el tratamiento de UVC (al 100%), mientras que cuando se agregó 4, 8 y 12 ppm de APA en combinación con UV, se tardó 12 segundos para las tres concentraciones en lograr ese mismo descenso logarítmico. Mientras que, en comparación, cuando se usó oxidante sólo, la diferencia en los tiempos de inactivación fue mucho mayor, de 20 a 55 veces menos efectiva que para la combinación de ácido y radiación. Se puede concluir entonces, que el proceso de oxidación avanzada es más eficiente que la utilización de ambos agentes por separado para la inactivación de *E. coli*.

Estos resultados concuerdan con los reportados por de Souza y col., 2015 [133], quienes obtuvieron mejores valores de desinfección cuando usaron combinaciones de APA y UV que cuando utilizaron estos desinfectantes por separado. Por otra parte, Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005 [108] observaron un aumento en la eficiencia de desinfección de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* y colifago MS2 mediante el uso combinado de APA/UV. Sun y col., 2018 [147] trabajaron con efluentes de aguas municipales y aplicaron la combinación de APA/UV en forma secuencial para inactivar *E. coli*. Detectaron que un pretratamiento de exposición con APA de 2 minutos hacía dos veces

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

más eficiente el proceso de desinfección. Una explicación de este resultado es que el APA se adsorbe a la superficie celular mediante los exopolisacáridos y que luego son activados por la aplicación de radiación UV que produce la liberación de radicales hidroxilos que causan la acción letal.



**Figura 50.** Curvas de inactivación para la cepa de *E. coli* ATCC 8739 luego de ser sometidas a tratamientos aplicando el 100% de la radiación UVC en combinación con APA en tres concentraciones diferentes: 4, 8 y 12 ppm.

**Tabla 18.** Tiempo en segundos en los se alcanzó un valor de IINAC=4 para cada proceso de desinfección llevado a cabo con radiación UV al 100%, APA solo en sus tres concentraciones (4, 8 y 12 ppm) y la combinación de ambos desinfectantes.

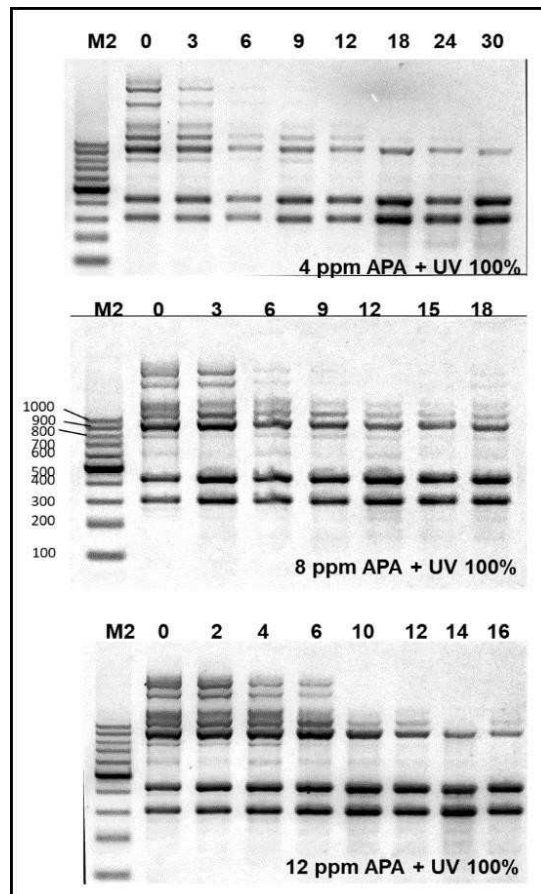
	UV		APA (ppm)			APA (ppm)+UV (100%)		
	100%	4	8	12	4	8	12	
Tiempo (segundos) que tomó lograr un descenso 4 log	18	225	75	45	12	12	12	

ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE *ESCHERICHIA COLI*

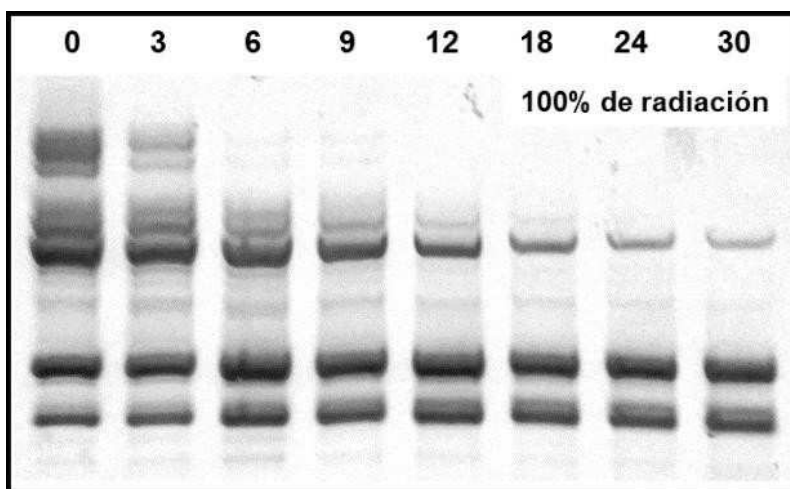
Como se puede observar en la Figura 51, en las bandas obtenidas por ERIC-PCR, existen diferencias cualitativas entre los geles correspondientes a los tratamientos cuando se aplicó UV 100% con 4, 8 y 12 ppm de APA. Se puede ver cómo a medida que aumenta la

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

concentración de ácido, disminuye el daño causado hacia el ADN, y esto se manifiesta por una mayor permanencia en los geles, durante el tiempo que transcurre el proceso de desinfección, de las bandas de mayor tamaño molecular. Si nos situamos en el gel de UV 100% + 4 ppm de APA, podemos ver cómo a los 6 segundos, prácticamente ya no se revelan en el gel las bandas de 2000, 1500, 1200 y 1000 pb. Esto mismo ocurre en el gel de la Figura 52, que representa el daño hacia el ADN cuando se aplicó el 100% radiación UV sola, lo que implica que la aplicación de 4 ppm de APA no influye en el ADN de manera detectable. Cuando se observa, en cambio, los geles generados después de que la cepa fue sometida a UV 100% + 8 y 12 ppm de APA, se nota cómo las bandas de 2000 y 1500 pb dejan de ser amplificadas a los 9 y 10 segundos respectivamente.



**Figura 51.** Geles de agarosa al 1.5 % obtenidos luego de la amplificación con ERIC-PCR de la cepa *E. coli* tras ser sometida a 4, 8 y 12 ppm de APA. Los números indican el tiempo de toma de muestra en segundos y M2 indica el marcador de tamaño molecular 100 Marker.

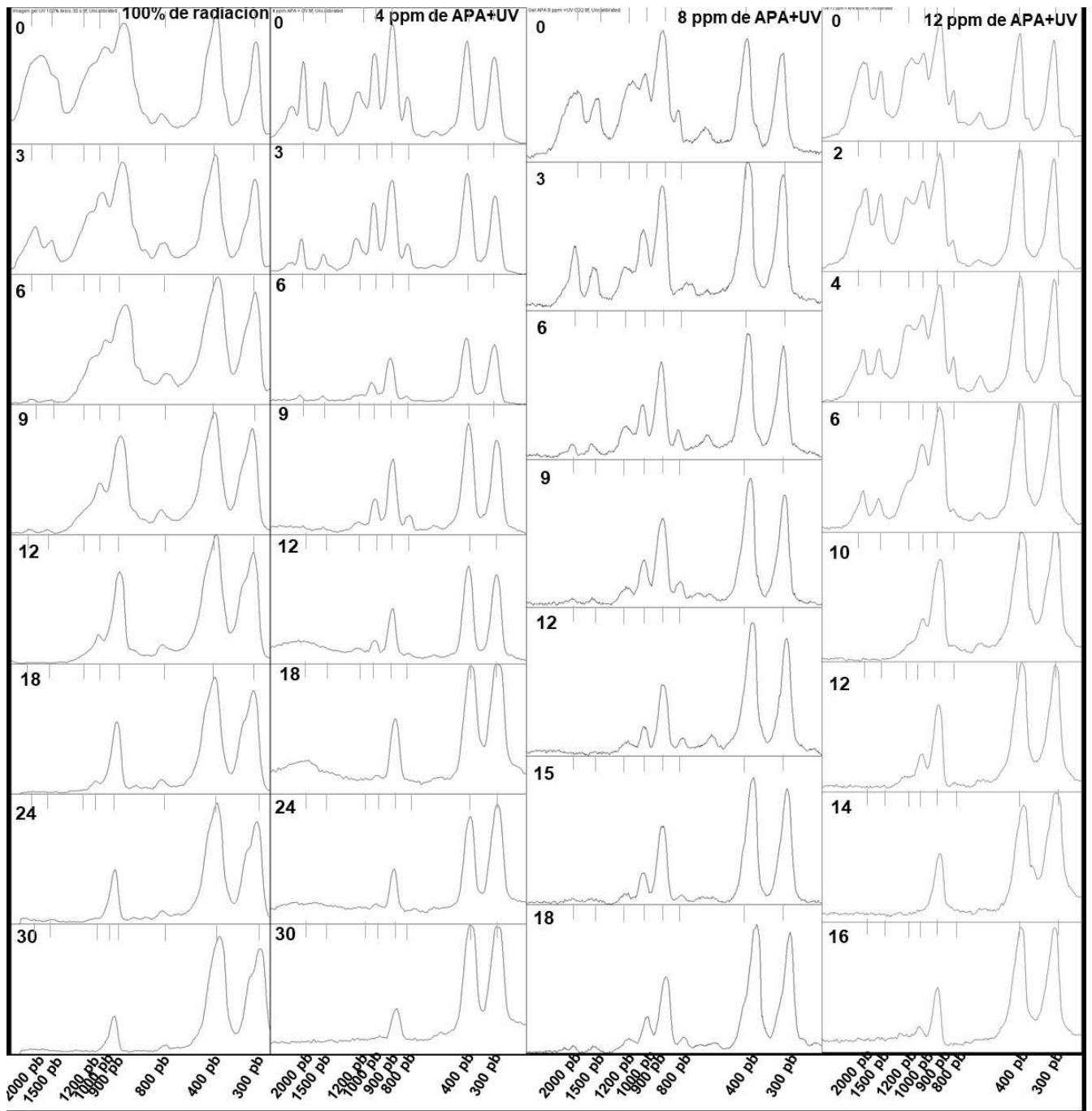


**Figura 52.** Gel de agarosa al 1,5% que presenta el perfil de bandas obtenido para *E. coli* después de ser sometida a 100% de radiación UVC durante 30 segundos. Los números indican el tiempo de muestreo en segundos.

#### ANALISIS DE RESULTADOS PARA *ESCHERICHIA COLI*

Para poder continuar con el análisis del comportamiento de las bandas se procedió a obtener los datos de áreas que se realizaron de las densitometrías sobre los geles de agarosa con el programa ImageJ/FIJI (Figura 53). Una vez obtenidos estos datos se procedió al cálculo de las varianzas para las áreas de las bandas de los geles de agarosa a través del proceso de desinfección (Tabla 19). Del análisis de varianza se pudo extraer que las bandas que variaron significativamente en todos los procesos de desinfección fueron las de 900 y 1000 pb. Cuando se analizaron las varianzas de las bandas después de someter a los microorganismos a tres niveles de radiación UVC diferentes (en el capítulo 1), obtuvimos que las bandas que presentaron variación significativa en todos los ensayos fueron las de 900 y 1500 pb. Los resultados obtenidos en este apartado presentan consistencia en el hecho de que la banda de 900 pb de base sigue siendo adecuada para poder seguir un proceso de desinfección en *E. coli* cuando se ve involucrado el uso de radiación UVC.

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC



**Figura 53.** Densitometría generada con el programa ImageJ/FIJI, a partir de los geles de agarosa con el patrón de amplificación de ERIC-PCR para la cepa de *E. coli* luego de los tratamientos con APA/UVC y el control con UVC sola. Los números indican los tiempos de muestreo en segundos.

En la Figura 54 se representa la variación del área densitométrica de las bandas desarrolladas en los geles de agarosa para los ensayos de desinfección UV/APA realizados

## CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

en comparación a la de UV sola. Se puede distinguir entre las bandas la existencia de tres comportamientos en común para todos los casos estudiados: i) las bandas de menor tamaño molecular (300 y 400 pb) (en negro) permanecen prácticamente sin alteraciones durante los procesos de desinfección; ii) la banda de 900 y 1000 pb (en rojo) parecen ser la más afectadas en su comportamiento, ya que varían en su forma y decaimiento según el tratamiento aplicado, esto concuerda con lo arrojado por el análisis estadístico de varianza y iii) por último se encuentran las bandas de mayor peso molecular (2000, 1500 y 1200 pb) que presentan una rápida desaparición en los primeros segundos de reacción. Centrándonos en las bandas del grupo (ii), podemos decir que su pendiente disminuye a medida que fue aumentada la concentración de APA en la mezcla de reacción, hasta llegar a 12 ppm donde sus áreas permanecen inalteradas (sus pendientes tienden a 0) hasta los 10 segundos para la banda de 900 pb y 6 segundos para la de 1000 pb y a partir de allí se produce una brusca caída de su densidad óptica (tal y como se ve en los geles de la Figura 51).

**Tabla 19.** Cálculo de las varianzas de las áreas de las bandas de los geles de agarosa obtenidas de los procesos de desinfección estudiados mediante ERIC-PCR para *E.coli*.

Tratamiento	Varianzas de las áreas de las bandas (x10 <sup>5</sup> )							
	300 pb	400 pb	800 pb	900 pb	1000 pb	1200 pb	1500 pb	2000 pb
UV 100%	128.34	51.81	3.38	865.68	518.52	336.30	51.85	895.22
4 ppm APA/UV	77.03	23.75	4.47	65.44	50.96	10.98	9.49	12.16
8 ppm APA/UV	4.80	7.08	4.02	44.04	26.03	59.89	17.83	98.53
12 ppm APA/UV	30.54	22.16	3.02	59.09	46.33	26.51	32.99	119.37

En base a los resultados obtenidos, fue realizada una comparación de los índices de niveles de inactivación (IINAC) con los índices de nivel de daño (IDADN), a lo largo del proceso de desinfección para cada condición estudiada, como se muestra en la Figura 55.

Como pudimos analizar en el capítulo 1 para la cepa de *E. coli*, y como se muestra aquí en el gráfico de la Figura 55, para el ensayo donde se utilizó 100% de radiación UV, ambos índices tienen el mismo comportamiento frente a la radiación presentando la misma funcionalidad respecto a esta. Para los ensayos de inactivación donde se añadió al proceso APA, es posible notar como a medida que se aumenta la concentración de ácido en combinación con radiación, la funcionalidad respecto al daño al ADN va cambiando. Los



CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

dos índices van tomando caminos diferentes de manera semejante a los que sucedió para *P. aeruginosa* cuando fue sometida a diferentes niveles de UVC. Este hecho nos podría permitir decir que al igual que *Pseudomonas*, la diferencia en la incidencia de fotones altera la respuesta en el ADN. En este caso en vez de existir una barrera física para controlar la llegada de los fotones, se cuenta con una barrera química como es el APA, que actuaría cómo sumidero de fotones, impidiendo en cierta medida que estos alcancen su objetivo celular principal que es el ADN. Los autores de Souza y col, 2015 [133], utilizaron una sucesión de procesos de desinfección, ya que emplearon un pretratamiento donde exponían las células de *E. coli* durante 10 minutos a APA y luego aplicaban el proceso avanzado de oxidación APA/UV. Ellos determinaron que este proceso fue más eficiente debido a que el APA inicial quedaba adsorbido a la superficie celular (membrana externa) y que al ser aplicado en sistema combinado el APA adsorbido reaccionaría con los fotones produciendo radicales libres que destruirían las estructuras celulares con más eficiencia. Para demostrar el cambio de funcionalidad se hizo el gráfico de correlación entre ambos índices para todos los ensayos de desinfección y se representaron en el gráfico de la Figura 56.

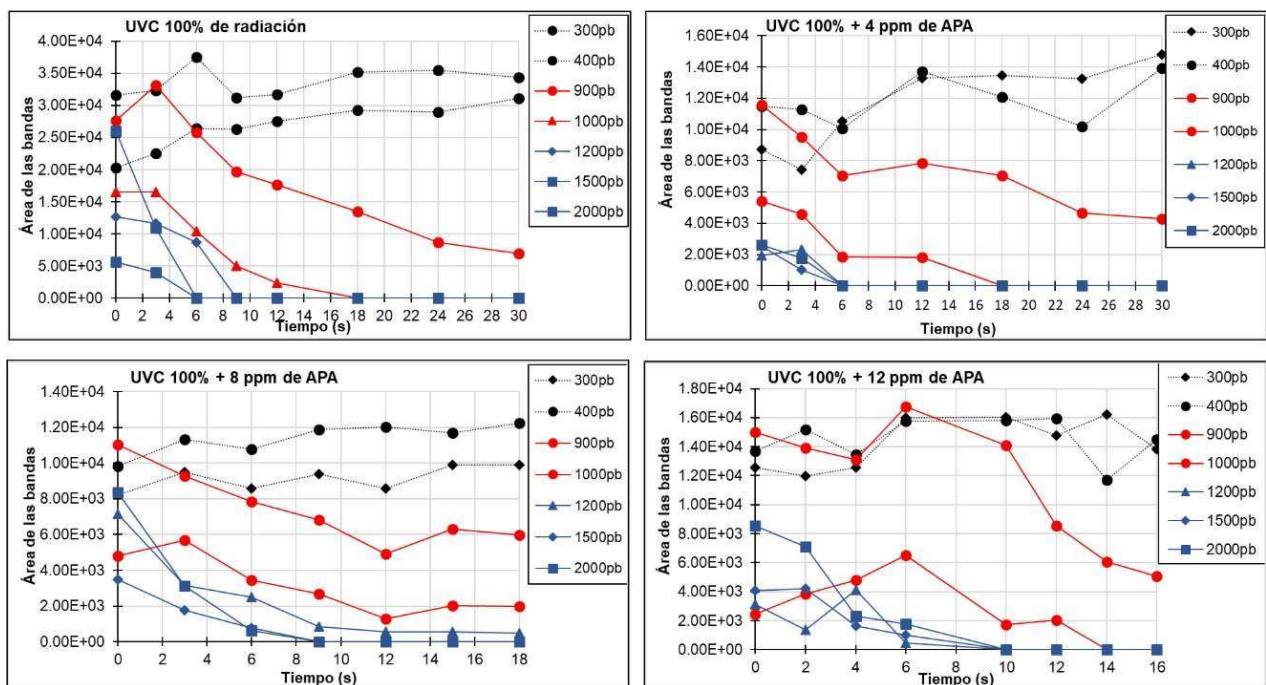


Figura 54. Gráficas que representan el cambio del área de las bandas de los gels de agarosa durante el proceso de desinfección para *E. coli*.

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

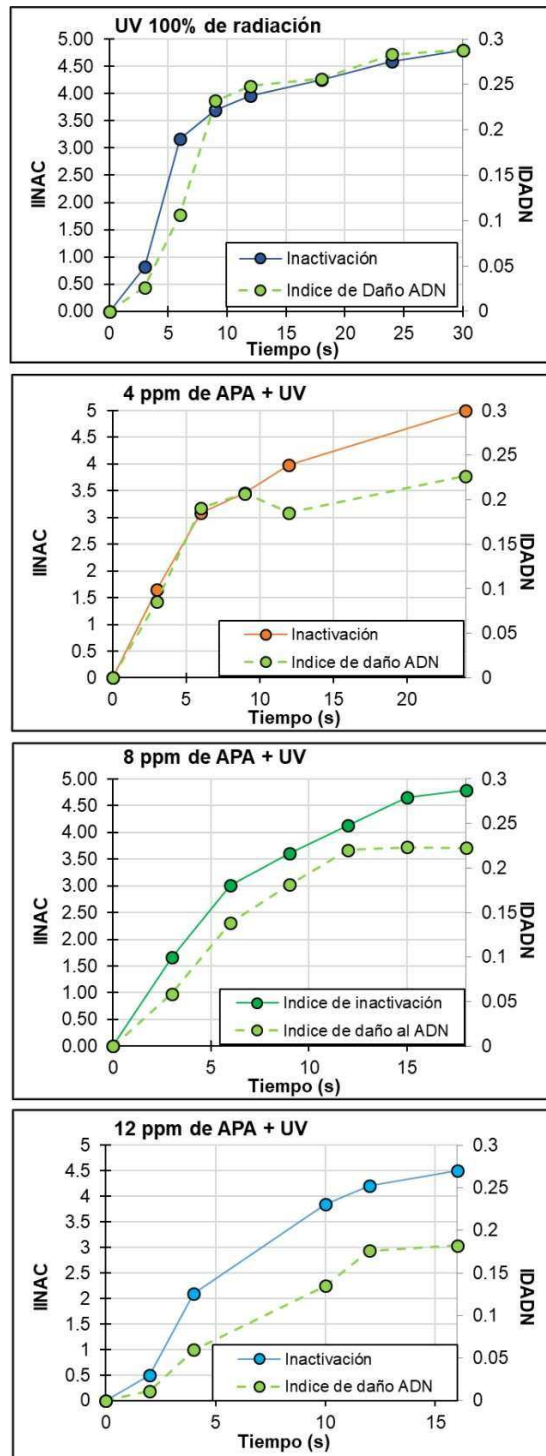


Figura 55. Representación de los índices de inactivación microbiana (IINAC) y los índices de daño al ADN (IDADN) para *E. coli* después de realizados los procesos de desinfección con radiación UVC y UV/APA.

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

En la gráfica de correlación obtenida se puede observar cómo a medida que aumenta la concentración de ácido empleada la pendiente de la línea de tendencia comienza a disminuir. Se ve claramente que sigue habiendo una fuerte correlación lineal entre ambos índices donde el parámetro de ajuste  $R^2$  es mayor que 0.91, en todos los casos. En este grupo de ensayos podemos notar cómo el parámetro  $\zeta$ , o sea la relación entre ambos índices, se ve afectado por la presencia del ácido (Tabla 20).

Para llevar a cabo un modelado cinético preliminar se deben tener en cuenta en principio 3 mecanismos de ataque presentes en el proceso:

1- La presencia de UV, genera daño al ADN (como cuando actúa el UV solo), este mecanismo es importante aquí y puede detectarse por método ERIC-PCR.

2- La presencia del APA genera daño per se a la membrana (como cuando actúa el APA solo). Por los resultados obtenidos (Tabla 20), puede verse que este mecanismo no tiene incidencia, cuando los dos agentes UV/APA están presentes.

3- La presencia combinada UV/APA, como se mencionó, genera especies muy activas que atacan la membrana. Este mecanismo es importante aquí y no puede ser cuantificado por el método ERIC-PCR.

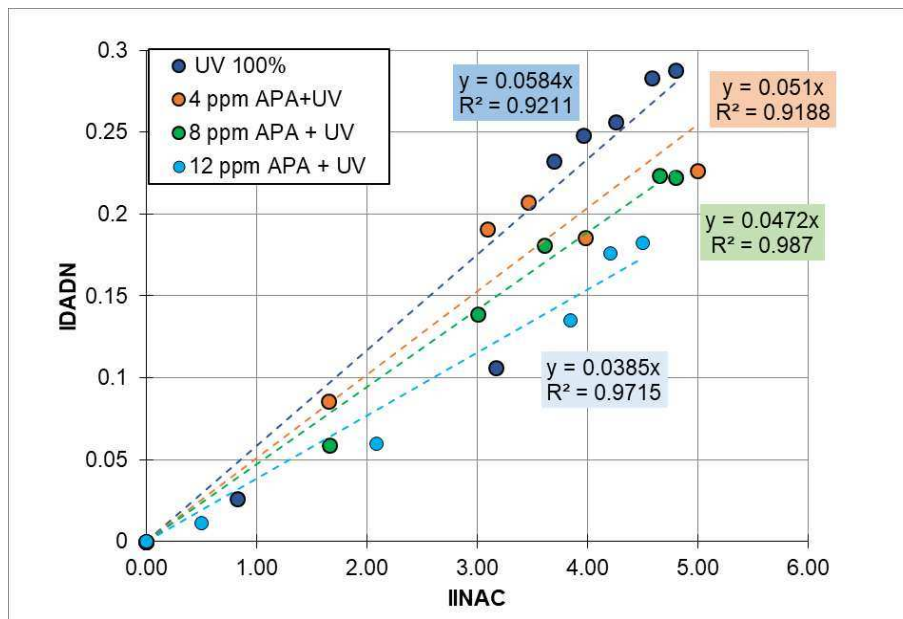
A los tres mecanismos, se suma el efecto de atenuación del campo de radiación dentro del reactor por la presencia de la mezcla comercial de APA, que absorbe radiación UV y que influye directamente sobre los mecanismos 1 y 3, en forma contrapuesta ya que promueve la disminución de la efectividad del proceso.

Como se menciona, el segundo mecanismo se puede despreciar frente a los otros dos, por lo tanto, se puede plantear para los primeros segundos de reacción un balance de materia para el microorganismo, dentro del reactor, considerando los dos mecanismos preponderantes:

$$\frac{dC_{Ec}}{dt} = -r_{Ec,UV} - r_{Ec,APA/UV} \quad \text{Ec. 26}$$

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

Donde  $r_{EC,UV}$  representa la velocidad de inactivación por el efecto directo del UV sobre el ADN y  $r_{EC,APA/UV}$  representa la velocidad de inactivación por el ataque de especies activas a la membrana.



**Figura 56.** Grafica donde se representa la correlación entre el IINACI y el IDADN para los ensayos de desinfección realizados sobre *E. coli*.

Como nos estamos restringiendo a los primeros segundos de reacción tomamos la parte lineal de la curva de inactivación, donde tenemos una cinética de pseudo-primer orden.

Por otro lado, podemos considerar que la cinética de acción del UV es proporcional a la radiación incidente elevada a un coeficiente  $\gamma$  y en el caso de la expresión cinética de la acción del APA irradiado por UV, podemos proponer que sea directamente proporcional a la concentración del agente químico y de la radiación incidente. Cabe aclarar que la radiación incidente dentro del reactor está influenciada por la atenuación que produce la absorción de UV de la mezcla comercial del APA. Por lo tanto, se puede proponer:

$$\frac{dC_{Ec}}{dt} = -\left[ k_{Ec,UV} \langle G \rangle^\gamma \right] C_{Ec} - \left[ k_{Ec,APA/UV} \langle G \rangle C_{APA} \right] C_{Ec} = -\left[ k'_{Ec,UV} + k'_{Ec,APA/UV} \right] C_{Ec} = -k' C_{Ec} \quad \dots Ec. 27$$

## CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

Para analizar cuantitativamente cómo intervienen los mecanismos, pueden calcularse las pseudo-constantes globales de inactivación ( $k'$ ) de la Figura 50 para los primeros 12 segundos de reacción. Por otro lado de la Figura 56 pueden extraerse los valores resultantes de los ajustes del valor de  $\zeta$ . La manera más práctica de evaluar cómo interviene cada mecanismo es trabajar con los valores relativos a cuando se utiliza radiación UV sola. En la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 20.** Evaluación de mecanismos de ataque en los ensayos de combinación APA/UV para *E. coli*.

$C_{APA}$ (ppm)	$\zeta$	$\zeta/\zeta_0$	$k'$ (s <sup>-1</sup> )	$k'/k'_0$
0	0.0584	<b>1.0000</b>	-0.290	<b>1.0000</b>
4	0.0510	<b>0.8733</b>	-0.460	<b>1.5862</b>
8	0.0472	<b>0.8082</b>	-0.460	<b>1.5862</b>
12	0.0385	<b>0.6592</b>	-0.460	<b>1.5862</b>

De los valores de la tabla puede concluirse que con respecto al ataque directo al ADN del UV, la velocidad del proceso disminuye a medida que se va aumentando la concentración de APA, con 12 ppm el ataque al ADN es un 66% de cuando no hay APA. Esto se explica fácilmente por el fenómeno de atenuación de radiación que produce la presencia del APA.

A nivel de ataque global, pueden hacerse dos observaciones importantes: que la presencia de APA con UV, mejora un 58.6% el proceso con respecto a cuando hay solo UV y por otro lado para el rango de concentraciones de 4 a 12 ppm utilizado en los ensayos, la velocidad de inactivación es independiente de la concentración del APA.

Finalmente, puede verse por diferencia el efecto contrapuesto de la presencia de APA, por un lado disminuyendo la velocidad de inactivación por daño al ADN por la atenuación generada y por otro lado el rol del ataque a la membrana (3<sup>er</sup> mecanismo) que compensa claramente la disminución por el primer mecanismo, ya que a nivel global la inactivación mejora con la combinación UV/APA.

---

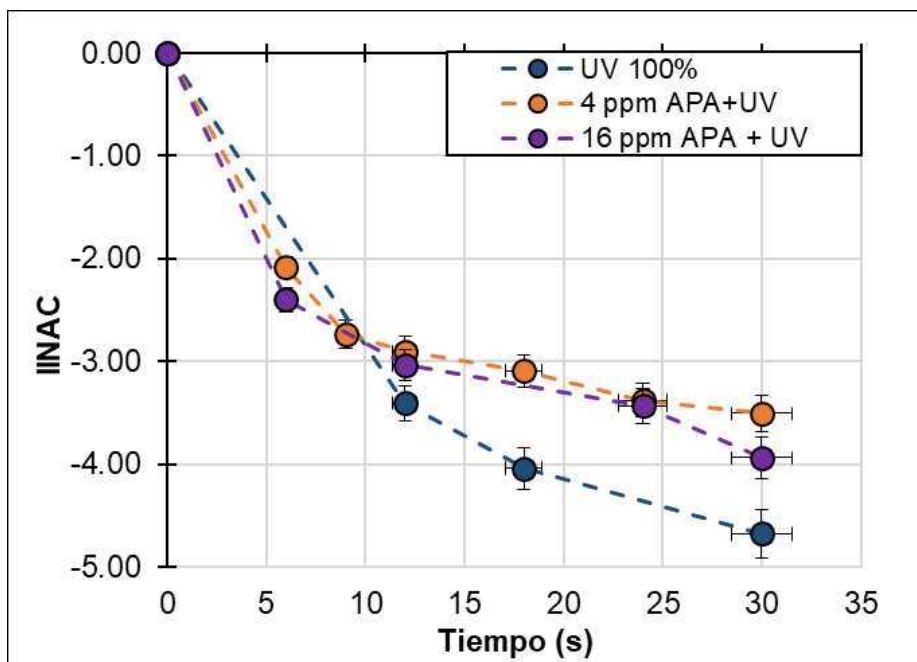
 INACTIVACION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

En la Figura 57 podemos ver cómo cambia en el tiempo la viabilidad (IINAC) de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* sometida a 4 y 16 ppm de APA en combinación con 100% UVC y utilizando sólo 100% radiación UVC. Se puede ver que el tratamiento UV/APA aplicando

## CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

las dos concentraciones sigue la funcionalidad de curva no lineal al igual que cuando se aplica sólo radiación.

En la Tabla 21 se pueden ver los tiempos cuando se logró un descenso logarítmico de 3.5 log para todos los tratamientos aplicados a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en este trabajo. Teniendo estos datos en cuenta se puede decir que el tratamiento más efectivo fue cuando se aplicó el 100% de la radiación UVC, y que con la combinación 4 y 16 ppm de APA más UV, fue el segundo tratamiento más efectivo contra esta cepa ya que se logró llegar a 3.5 log de inactivación en 12, 30 y 24 segundos, respectivamente. Para el tratamiento de oxidación avanzada se ve un aumento en la eficiencia de 6 segundos al aumentar la concentración de ácido presente en la mezcla.



**Figura 57.** Representación del índice de inactivación (IINAC) vs tiempo de inactivación para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 sometidas a tratamiento UV y UV/APA.

Muchos autores obtuvieron una eficiencia mayor al realizar ensayos de combinación UV/APA [108,109,148], que fue el doble respecto a cuándo utilizaron el oxidante solo para tratamiento de efluentes. En este estudio la eficiencia aumentó de 2 a 11 veces respecto cuando se utilizó 4 y 16 ppm de APA solo y su posterior combinación con radiación UV

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

**Tabla 21.** Tiempo que tomó para cada tratamiento aplicado a *Pseudomonas aeruginosa* en lograr un descenso de 3.5 log.

	Tratamientos aplicados				
	UV	APA (ppm)		APA(ppm)+UV (100%)	
	100%	4	16	4	16
<b>Tiempo (segundos) que tomó lograr un descenso 3.5 log</b>	12	330	60	30	24

ANALISIS DEL DAÑO AL ADN DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

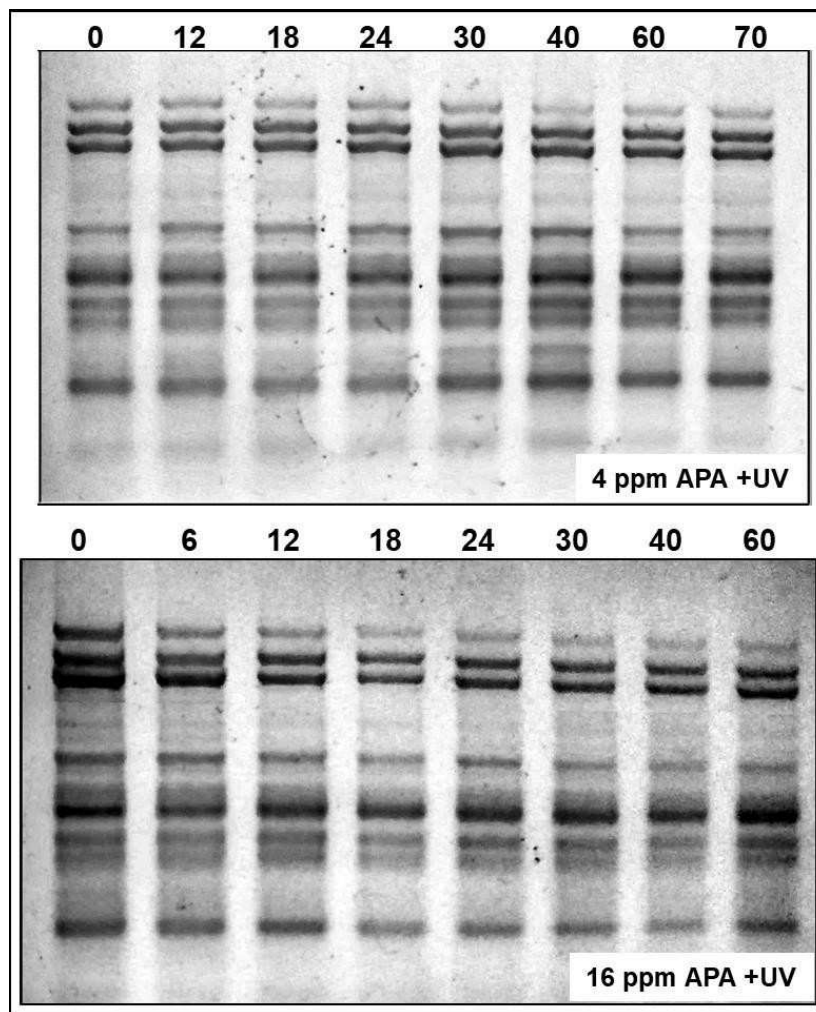
En los geles de la Figura 58 se pueden ver las amplificaciones mediante ERIC-PCR del ADN de *P. aeruginosa* luego de ser sometida a 4 y 16 ppm de APA más UV. Puede verse que el ADN prácticamente no sufre alteraciones en su amplificación ya que el patrón de ERIC no se modifica. Sólo en el gel que pertenece al tratamiento empleando la dosis más alta de APA se puede notar una leve pérdida de densidad óptica de la banda de mayor tamaño (1200 pb). Si comparamos estas imágenes incluso con las obtenidas en los ensayos donde se utilizó sólo radiación (Figura 27), es posible notar que incluso hay una inhibición del daño hacia el ADN muy marcada. Este hecho podría explicar por qué las curvas de APA/UV obtenidas para esta cepa pasan por encima de la que se obtuvo utilizando 100% de radiación UVC sola.

Como se mencionó anteriormente, existen tres mecanismos de ataque presentes en el proceso APA/UV, donde dos son los que prevalecen: i) La presencia de UV, genera daño al ADN (como cuando actúa el UV solo), este mecanismo puede detectarse por método ERIC-PCR (mecanismo 1) y (ii) la presencia combinada UV/APA, genera especies muy activas que atacan la membrana (mecanismo 3). Este último mecanismo no puede ser cuantificado por el método ERIC-PCR. A estos mecanismos se suma el efecto de atenuación del campo de radiación dentro del reactor por la presencia de la mezcla comercial de APA, que absorbe radiación UV y que influye directamente sobre los mecanismos mencionados.

En este caso el mecanismo que prevalece en la desinfección sería la presencia combinada UV/APA. Esto queda demostrado por los resultados obtenidos en los geles ERIC-PCR

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

donde prácticamente el ADN no ha sufrido alteraciones, por lo que existe otro target molecular que es atacado en el momento de combinarse el APA con el UV generando especies altamente reactivas. Por lo expuesto, se puede concluir que el proceso APA/UV es menos eficiente que cuando se utiliza UV sola, pero es más efectivo que la utilización del ácido solo como agente desinfectante para la *P. aeruginosa*.



**Figura 58.** Geles de agarosa al 2% obtenidos de la amplificación mediante ERIC-PCR de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 después de ser expuestas a los tratamientos de desinfección con APA/UV.



CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

ANALISIS COMPARATIVO ENTRE *ESCHERIACHIA COLI* Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Teniendo en los resultados obtenidos hasta el momento en esta sección, con respecto al proceso avanzado de oxidación combinando APA/UV, es posible afirmar que éste fue más eficiente para la cepa de *E. coli* que para la de *P. aeruginosa*. En ambas cepas los resultados obtenidos respetaron formas funcionales semejantes a las curvas que se generaron cuando se trabajó con radiación UV sola. La diferencia fue que ninguna condición tuvo hombro al comienzo del proceso de desinfección, pero sí la tendencia a formar cola. Para *E. coli*, la cola en las curvas se va perdiendo a medida que aumenta la concentración de ácido, de la misma forma que ocurrió cuando se trabajó con APA solo. Rizzo y col. 2015 [145], obtuvieron curvas parecidas a las descritas en este trabajo cuando utilizó diferentes concentraciones de APA en combinación con radiación UVC. Se consiguieron buenos rendimientos en cuanto a eficiencia de desinfección, lográndose para *E. coli* un descenso de 4 log a los 12 segundos de comenzado el proceso de desinfección para las tres concentraciones de APA/UV empleadas. Mientras que para *P. aeruginosa* se obtuvieron un descenso de 3.5 log para las combinaciones con 4 y 16 ppm de ácido en 30 y 24 segundos respectivamente. Gonzales y col., 2012 [149], también reportaron en su trabajo un buen rendimiento cuando utilizaron la combinación APA/UV logrando un descenso de 5 log después de aplicar el tratamiento de desinfección. Otros autores determinaron una alta eficiencia de la combinación APA/UV para eliminar *E. coli* de agua [133].

En cuanto a la manifestación del daño sobre el ADN se obtuvo evidencia de disminución de la actividad de la enzima Taq polimerasa sólo para la cepa de *E. coli*. El daño hacia el ADN se analizó de la misma forma que fue planteado para los tratamientos con radiación UVC sola. En este caso se logró obtener geles de agarosa que manifestaron un comportamiento diferente a cuando las cepas fueron solo irradiadas. Cuando fue agregado APA al sistema de desinfección lo que se obtuvo fue una disminución del daño manifestado hacia el ADN a medida que se fue incrementando la concentración de APA proporcionada, que al igual que ocurrió cuando se trabajó en el capítulo 1 con radiación sola, lo pudimos evidenciar mediante la utilización de ERIC PCR, que resultó consistente y útil para identificar el daño al ADN producido por radiación UVC. Gracias a esto se pudo realizar el estudio cuantitativo del daño hacia el ADN bacteriano y obtener índices con los cuales poder dar explicación al fenómeno. La presencia de APA indica un daño oxidativo, como se trató en el capítulo 2,

### CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

que no implica un daño estructural sobre el ADN, por lo que no se manifiesta en la amplificación por ERIC-PCR. Esto último implica otro target molecular al cual va dirigido el ataque oxidativo, probablemente proteínas u otros elementos de la membrana y pared celular. En este caso de la combinación APA/UVC, parecen ser de menor importancia debido a la forma que adoptan las curvas de desinfección y a que los parámetros obtenidos de la ERIC-PCR permiten el seguimiento del daño a través del ADN y acompañan al fenómeno en curso. En este caso surge un tercer fenómeno como se mencionó previamente, que es la activación del APA mediante fotólisis [142], que genera especies reactivas del oxígeno. Estos radicales libres tienen como principal punto de ataque molecular los grupos reducidos que forman parte de proteínas y estructuras de membrana y pared celular (dobles enlaces, anillos aromáticos, grupos tiol y sulfhidrilo) [94,123]. Este tipo de daño no es posible detectarlo mediante amplificación con PCR convencional a punto final, y para el daño a membrana se debe recurrir a técnicas más adecuadas como ser epifluorescencia, PCR-PM o citometría [25]. Para lograr la activación del APA y la generación de radicales libres, es necesario que la molécula absorba fotones UV y se produzca así la reacción fotoquímica. Este hecho hace que el APA sea un sumidero de fotones UV, que no llegan a su blanco celular, que es el ADN bacteriano, y esto se ve reflejado, como se puede observar en la Figura 51, en un menor impacto del daño UV en el ADN tras ser amplificado luego del proceso de desinfección [133].

#### CONCLUSION PARCIAL

Como resumen podemos decir que el proceso APA/UV es más eficiente que la desinfección con APA solo en las dos cepas y que supera la eficiencia de desinfección del UV cuando se aplicó sobre *E. coli* únicamente. Además, evidenciamos cómo sólo en la cepa de *E. coli* hubo cambios sustanciales en el patrón de ERIC-PCR durante el proceso de desinfección y que el mismo cambia a medida que aumenta la concentración de ácido empleada. Además, pudimos identificar gracias a esto, que existen tres tipos de ataques a la célula y un efecto negativo del APA sobre el daño al ADN. Por otro lado, a pesar de tener una sustancia química en el medio que capta fotones, el proceso de desinfección mejora para *E. coli*, esto indicaría la presencia de otro punto de ataque en la célula microbiana susceptible a la presencia de oxidante.

CAPITULO 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE DESINFECCION DE AGUA CON ACIDO PERACETICO EN COMBINACION CON RADIACION UVC

---

Gracias a los resultados obtenidos de la amplificación del ADN por ERIC-PCR se pudo desarrollar un modelo cinético simplificado que nos permitió hacer el seguimiento de la desinfección tanto a nivel global (población microbiana) como a nivel del daño al ADN (por amplificación mediante ERIC-PCR). Uno de los parámetros obtenidos fue sigma ( $\zeta$ ), el cual fue calculado en el capítulo 1 cuando se trabajó con radiación UVC sola y que nos permite evaluar la sensibilidad del ADN al tratamiento, cuando está involucrada la radiación en el proceso. Para cuando se trabajó con APA/UV se pudo determinar además una pseudoconstante global que nos indica la sensibilidad de la población en general al tratamiento cuando se ve involucrado el agente oxidante. Esto determinó el desarrollo de una cinética de desinfección simple, que nos permite ver y evaluar los dos fenómenos más importantes que ocurren: el daño al ADN y el daño producido a las células completas. Existen dos comportamientos en este caso para *E. coli* ya que su ADN se ve menos comprometido a medida que se aumentó la concentración de ácido y por lo contrario el nivel de inactivación aumenta a medida que es añadida mayor cantidad de ácido. Para *P. aeruginosa*, en cambio, tenemos que el proceso de inactivación mediante la combinación APA/UV es menos efectiva y a su vez el ADN prácticamente no sufrió daño. Podemos finalizar diciendo que para la cepa de *E. coli* los procesos de inactivación predominantes son la acción de la radiación y el proceso avanzado de oxidación, mientras que para *P. aeruginosa*, sucede que sólo predomina el ataque oxidativo provocado por la combinación APA/UV.

## CONCLUSIONES FINALES

### CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones finales que derivan de este trabajo de tesis se detallan a continuación:

- Todos los procesos de desinfección ensayados (UVC, APA y APA/UV) aplicados sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* resultaron altamente efectivos con un requerimiento de poco tiempo de contacto para producir una inactivación del 99.99% de desinfección.
- El proceso de desinfección que resultó más eficiente fue el de APA/UV para la cepa de *E. coli* y el de radiación UVC sola para *P. aeruginosa*. Por otro lado, resultó ser el menos eficiente el APA solo, para ambas bacterias.
- 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. Además, los análisis desarrollados permiten proporcionar información completa sobre la integridad del ADN bacteriano durante los distintos procesos de desinfección.
- 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 llamamos *sigma* ( $\zeta$ ), que nos permite intercambiar un índice por otro. Esto es novedoso y de importante aplicación práctica ya que permite 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 usa UV sola.
- Cuando se usó el proceso con radiación UVC sola para la cepa de *E. coli*, la relación entre los índices reflejó que ambos poseen la misma funcionalidad respecto a la radiación, lo que implica que  $\zeta$  es independiente del valor de la intensidad de radiación. Para *P. aeruginosa* en cambio, el IDADN posee diferente funcionalidad que el IINAC respecto a los niveles de la radiación, por lo tanto, esto significa que  $\zeta$  depende de la radiación incidente ( $G_w$ ) y por consiguiente se desarrolló un simple modelo matemático que posibilita relacionar y hacer inter-convertibles estos índices.
- En el proceso de desinfección utilizando APA solo, bajo las condiciones experimentales ensayadas, no se produjeron cambios en el patrón de banda del ADN durante el proceso de desinfección. Se determinó que estos resultados podrían

## CONCLUSIONES FINALES

---

analizarse y entenderse de dos maneras diferentes: 1) el APA puede no causar daño en el ADN, o 2) el daño puede no afectar la enzima polimerasa y, por lo tanto, ERIC-PCR no lo detecta.

- Para el análisis del proceso utilizando APA solo como agente desinfectante 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 cuando se trabajaron con muestras de *E. coli* expuestas a APA y UVC por separado. Esto da un claro indicio de que es posible detectar un daño al igual que se hizo para el ADN. En el caso de proteína sería necesario aplicar técnicas más sofisticadas y sensibles para lograr un análisis más profundo de lo que sucede con estas moléculas cuando son atacadas por la acción oxidativa del ácido.
- Se realizaron ensayos de toxicidad para el ácido, como dato complementario a la utilización de éste en un sistema de desinfección de agua. La  $DL_{50}$  calculada para *Daphnia magna* indica que, comparado a las concentraciones a la que se utiliza el cloro para desinfección, el APA resultó menos letal para estos organismos.
- Para los ensayos donde se usó APA/UV contra *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 pseudo-constantes cinéticas de primer orden ( $k'$ ) en la parte lineal de las curvas de inactivación. Estos parámetros nos dan la información sobre cómo afecta al proceso global la concentración de APA adicionada al sistema y de esta forma nos permitió cuantificar el sinergismo que en este caso ocurre entre los dos agentes desinfectantes empleados, obteniendo un 56% de aumento en la velocidad de inactivación. Al realizar la comparación entre los  $\zeta$  de los procesos con y sin agregado de APA se pudo obtener cómo influye éste en la solución de trabajo respecto al daño en el ADN por UVC. En este punto, la relación entre los  $\zeta$  arrojó una disminución del IDADN a medida que la concentración de APA fue mayor. Esta disminución puede ser atribuida al fenómeno de atenuación del campo de radiación, por la absorción de fotones por parte del APA. Para el caso de *P. aeruginosa* el agregado de APA hizo que el efecto predominante sobre estas bacterias sea el de ataque por los radicales libres formados durante el proceso de oxidación avanzado, ya que el daño detectado en el ADN prácticamente fue despreciable (los  $\zeta$ , tienden

## CONCLUSIONES FINALES

---

a cero en presencia de APA). Además, mediante el cálculo de parámetros cinéticos, pudo determinarse la ausencia a nivel global de un efecto sinérgico.

- Como conclusión final es posible afirmar que en esta tesis se logró cumplir con todos los objetivos planteados. 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 permitieran determinar lo que sucede durante los procesos de desinfección a nivel de target molecular específico.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] HS Vuorinen, PS Juuti, TS Katko (2007), History of water and health from ancient civilizations to modern times, 28–30.
- [2] V Yevjevich (1992), Water and Civilization, *Water Int.*, 17: 163–171.
- [3] MA Córdoba, V Fernanda, D Coco, JA Basualdo (2010), Agua y salud humana *Water & Public Health*, 105–119.
- [4] UNICEF, Día Mundial del Agua: 1000 niños mueren cada día por falta de agua potable,.
- [5] MC Apella y PZ Araujo, Microbiología de agua Conceptos básicos, in: : pp. 33–50.
- [6] CE Boyd (2015), Water Quality, Springer International Publishing, Cham.
- [7] N Graham (1999), Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edition, Addendum to Volume 1 – Recommendations, World Health Organisation, Geneva, 1998, 36 pages, *Urban Water*, 1: 183.
- [8] M Beltrán Ávila (2006), Capítulo XII, *Sucesos La Guerr. La Indep. Del Año 1810 / Capítulos La Hist. Colon. Oru.*, 301–318.
- [9] NC Chulluncuy Camacho (2011), Tratamiento de agua para consumo humano, in: : pp. 153–170.
- [10] D Rios (2006), Riesgos biológicos y subproductos de la desinfección en el agua de bebida.
- [11] KP Cantor (1994), Water chlorination, mutagenicity, and cancer epidemiology, *Am. J. Public Health*, 84: 1211–1213.
- [12] SD Richardson, TA Temes (2018), Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, *Anal. Chem.*, 90: 398–428.
- [13] A Zafra (2008), Efectos de los trihalometanos sobre la salud, *Hig. y Sanid. Ambient.*, 8: 280–290.
- [14] Y Du, X Lv, Q Wu, D Zhang, Y Zhou, L Peng, H Hu (2017), Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review, *J. Environ. Sci.*, 58: 51–63.
- [15] C Pablos, R Van Grieken, J Marugán, B Moreno (2011), Photocatalytic inactivation

BIBLIOGRAFIA

---

- of bacteria in a fixed-bed reactor: Mechanistic insights by epifluorescence microscopy, *Catal. Today*, 161: 133–139.
- [16] H Lin, C Ye, S Chen, S Zhang, X Yu (2017), Viable but non-culturable E coli induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable, *Environ. Pollut.*, 230: 242–249.
- [17] ME Torres Olave (2014), Inactivación de *Cryptosporidium* spp y *Giardia lamblia* sp en agua mediante luz UV de bajo voltaje con un concentrador solar casero, *Tecnociencia Chihuahua*, 8: 183–189.
- [18] ER Bandala, B Corona-vásquez, R Guisar, M Uscanga (2007), Aplicación de Procesos Avanzados de Oxidación en la Desactivación Secuencial de Microorganismos Resistentes en Agua , 52–63.
- [19] O Legrini, E Oliveros, AM Braun (1993), Photochemical processes for water treatment, *Chem. Rev.*, 93: 671–698.
- [20] CP Huang, C Dong, Z Tang (1993), Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment, *Waste Manag.*, 13: 361–377.
- [21] JR Bolton, CA Cotton (2008), The ultraviolet disinfection handbook.
- [22] WH Glaze (1987), Drinking-water treatment with ozone, *Environ. Sci. Technol.*, 21: 224–230.
- [23] WH Glaze, J-W Kang, DH Chapin (1987), The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation, *Ozone Sci. Eng.*, 9: 335–352.
- [24] M Ben Said, O Masahiro, A Hassen (2010), Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Q $\beta$  phage, *Ann. Microbiol.*, 60: 121–127.
- [25] JB Emerson, RI Adams, CMB Román, B Brooks, DA Coil, K Dahlhausen, HH Ganz, EM Hartmann, T Hsu, NB Justice, IG Paulino-lima, JC Luongo, DS Lymperopoulou, C Gomez-silvan (2017), Schrödinger ' s microbes : Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems, 1–23.
- [26] L Nizri, D Vaizel-Ohayon, H Ben-Amram, Y Sharaby, M Halpern, H Mamane (2017), Development of a molecular method for testing the effectiveness of UV systems on-
-



BIBLIOGRAFIA

---

- site, *Water Res.*, 127: 162–171.
- [27] A Trombert, H Irazoqui, C Martín, F Zalazar (2007), Evaluation of UV-C induced changes in *Escherichia coli* DNA using repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (REP-PCR), *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 89: 44–49.
- [28] J Versalovic, T Koeuth, R Lupski (1991), Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Res.*,
- [29] K Oguma, H Katayama, H Mitani, S Morita, T Hirata, S Ohgaki (2001), Determination of Pyrimidine Dimers in, *Society*, 67: 4630–4637.
- [30] K Rudi, I Hagen, BC Johnsrud, G Skjefstad, I Tryland (2010), Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7: 3376–3381.
- [31] LA Wilson, PM Sharp (2006), Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR, *Mol. Biol. Evol.*, 23: 1156–1168.
- [32] E Dolezalova, P Lukes (2015), Bioelectrochemistry Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet, *Bioelectrochemistry*, 103: 7–14.
- [33] S Callejón, I Pardo, S Ferrer (2007), Empleo del Kit de Fluorescencia LIVE/DEAD para el seguimiento de la viabilidad de cultivos iniciadores inoculados en vino, *X Congr. Nac. Investig. Enológica*, 138–139.
- [34] D Wang, JR Bolton, SA Andrews, R Hofmann (2015), Science of the Total Environment Formation of disinfection by-products in the ultraviolet / chlorine advanced oxidation process, *Sci. Total Environ.*, 518–519: 49–57.
- [35] W Kowalski (2009), Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [36] KE O'Brien, W.J; Hunter, G.L; Rosson, J.J; Hulsey, R.A; Carns (1996), Ultraviolet system design: past, present, and future, p.2-11-2-22.
- [37] Elio Pietrobon Tarrán (2002), Desinfección por Desinfecção por Luz Ultravioleta, *Agua Latinoam.*, 8.
- [38] AE Cassano, CA Martin, RJ Brandi, OM Alfano (1995), Photoreactor Analysis and
-

BIBLIOGRAFIA

---

- Design: Fundamentals and Applications, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34: 2155–2201.
- [39] B Albert, T Durfort i Coll, Merce, T Llobera i Sande, Miquel (1996), Biología molecular de la célula, Omega.
- [40] AC Kneuttinger, K Heil, G Kashiwazaki, T Carell (2013), The radical SAM enzyme spore photoproduct lyase employs a tyrosyl radical for DNA repair, *Chem. Commun.*, 49: 722–724.
- [41] RP Rastogi, Richa, A Kumar, MB Tyagi, RP Sinha (2010), Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair, *J. Nucleic Acids*, 2010:.
- [42] Y Jing, J-S Taylor, JF-L Kao (1998), Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT, *Nucleic Acids Res.*, 26: 3845–3853.
- [43] M Lukin, C de los Santos (2006), NMR Structures of Damaged DNA, *Chem. Rev.*, 106: 607–686.
- [44] S Fendrihan, A Bérces, H Lammer, M Musso, G Rontó (2011), Trial/prison, 9: 3 min.
- [45] DP Häder, RP Sinha (2005), Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: Potential environmental impact, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 571: 221–233.
- [46] P Setlow (2007), I will survive: DNA protection in bacterial spores, *Trends Microbiol.*, 15: 172–180.
- [47] Código Alimentario Argentino Bebidas hídricas,. - Google Académico,.
- [48] MD Labas, RJ Brandi, CS Zalazar, AE Cassano (2009), Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> A comparative study, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8: 670–676.
- [49] MJ Flores, RJ Brandi, AE Cassano, MD Labas (2016), Kinetic model of water disinfection using peracetic acid including synergistic effects, *Water Sci. Technol.*,.
- [50] A Villarino, MN Rager, PAD Grimont, OMM Bouvet (2003), Are UV-induced nonculturable *Escherichia coli* K-12 cells alive or dead?, *Eur. J. Biochem.*, 270: 2689–2695.
- [51] KB Mullis (1990), The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Sci. Am.*, 262: 56–65.
-

BIBLIOGRAFIA

---

- [52] CV Tamay de Dios , C Ibarra (2013), Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, *Investig. En Discapac.*, 2: 70–78.
- [53] K Vasco (2014), " Standardization of melting curve analysis for the detection of Babesia in ticks using nucleotide polymorphisms ",.
- [54] GP Pfeifer, R Drouin, AD Riggs, GP Holmquist (1991), In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 1374–1378.
- [55] FA Atienzar, P Venier, AN Jha, MH Depledge (2002), Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations, *Genet. Toxicol. Eviromental Mutagen.*, 521: 151–163.
- [56] J Süß, S Volz, U Obst, T Schwartz (2009), Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection, *Water Res.*, 43: 3705–3716.
- [57] AF El-Yazbi, GR Loppnow (2014), Detecting UV-induced nucleic-acid damage, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 61: 83–91.
- [58] SL. Murov, I Carmicael, GL Hug (1993), Handbook of Photochemistry.
- [59] J Katara, R Deshmukh, N K. Singh, S Kaur (2012), Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58: 83–94.
- [60] K Wolska y, P Szweda (2009), A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *Polish J. Microbiol.*, 58: 255–260.
- [61] A Cassano, O Alfano, R Brandi, CM-F Heterogénea, U Capítulo, U 2001 (2001), Diseño de reactores para fotocatalisis: conceptos fundamentales.
- [62] HA Irazoqui, J Cerdá, AE Cassano (1973), Radiation profiles in an empty annular photoreactor with a source of finite spatial dimensions, *AIChE J.*, 19: 460–467.
- [63] MD Labas, CS Zalazar, RJ Brandi, AE Cassano (2008), Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide, *Biochem. Eng. J.*, 38: 78–87.
- [64] ER Blatchley (1997), Numerical modelling of UV intensity: Application to collimated-

BIBLIOGRAFIA

---

- beam reactors and continuous-flow systems, *Water Res.*, 31: 2205–2218.
- [65] WAM Hijnen, EF Beerendonk, GJ Medema (2006), Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review, *Water Res.*, 40: 3–22.
- [66] MD Labas, RJ Brandi, CA Martín, AE Cassano (2006), Kinetics of bacteria inactivation employing UV radiation under clear water conditions, *Chem. Eng. J.*, 121: 135–145.
- [67] JL Clancy, TM Hargy, MM Marshall, JE Dyksen (1998), UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts, *J. Am. Water Works Assoc.*, 90: 92–102.
- [68] AM Johnson, K Linden, KM Ciociola, R De Leon, G Widmer, PA Rochelle (2005), UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in cell culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2800–2802.
- [69] DH Bergey, RS Breed (1957), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed., (Ed. American Society for Microbiology), Williams & Wilkins Co., Baltimore,.
- [70] RJ Brandi, OM Alfano, AE Cassano (2000), Evaluation of Radiation Absorption in Slurry Photocatalytic Reactors 1 Assessment of Methods in Use and New Proposal, *Environ. Sci. Technol.*, 34: 2623–2630.
- [71] H Chick (1908), An investigation of the laws of disinfection, *J. Hyg. (Lond)*, 8: 92–158.
- [72] HE Watson (1908), A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant, *J. Hyg. (Lond)*, 8: 536–542.
- [73] LA coord Daniel (2001), *Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável*, 2:.
- [74] H Collins, R Selleck (1972), Process kinetics of wastewater chlorination,.
- [75] LW Hom (1972), Kinetics of Chlorine Disinfection in an Ecosystem, *J. Sanit. Eng. Div.*, 98: 183–194.
- [76] M Cho, H Chung, J Yoon (2003), Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2284–2291.
- [77] BF Severin (1982), *Kinetic Modeling of Microbial Inactivation by Ultraviolet Light*,.
-

BIBLIOGRAFIA

---

- [78] W Harm (1980), Biological effects of ultraviolet radiation, *Cambridge Cambridge Univ. Press.*, 1:.
- [79] SA Craik, DW Smith, M Belosevic, M Chandrakanth (2002), Use of *Bacillus subtilis* spores as model micro-organisms for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water treatment, 186: 173–186.
- [80] AH Geeraerd, CH Herremans, JF Van Impe (2000), Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment, 59: 185–209.
- [81] OM Lee, HY Kim, W Park, TH Kim, S Yu (2015), A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process, *J. Hazard. Mater.*, 295: 201–208.
- [82] R Gehr, M Wagner, P Veerasubramanian, P Payment (2003), Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater, *Water Res.*, 37: 4573–4586.
- [83] Y Pang, J Huang, J Xi, H Hu, Y Zhu (2016), Effect of ultraviolet irradiation and chlorination on ampicillin-resistant *Escherichia coli* and its ampicillin resistance gene, *Front. Environ. Sci. Eng.*, 10: 522–530.
- [84] M Wagner, D Brumelis, R Gehr (2014), Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent, *Water Environ. Res.*, 74: 33–50.
- [85] BR Yaun, SS Sumner, JD Eifert, JE Marcy (2003), Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy, *J. Food Prot.*, 66: 1071–1073.
- [86] S Zhang, C Ye, H Lin, L Lv, X Yu (2015), UV Disinfection Induces a Vbnc State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.
- [87] S Rattanakul, K Oguma (2018), Inactivation kinetics and efficiencies of UV-LEDs against *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, and surrogate microorganisms, *Water Res.*, 130: 31–37.
- [88] P Maris (1995), Modes of action of disinfectants, 14: 47–55.
- [89] AD Russell (2003), Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides, *J. Antimicrob. Chemother.*, 52: 750–763.

BIBLIOGRAFIA

---

- [90] E Ortega Morente, MA Fernández-Fuentes, MJ Grande Burgos, H Abriouel, R Pérez Pulido, A Gálvez (2013), Biocide tolerance in bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, 162: 13–25.
- [91] SP Denyer (1995), Mechanisms of Action of Antibacterial Biocides, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 227–245.
- [92] CE Cabrera; RF Gómez; AE Zúñiga (2007), La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, Abril-Junio, .
- [93] M Kitis (2004), Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review, *Environ. Int.*, 30: 47–55.
- [94] MGC Baldry (1983), The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid, *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 417–423.
- [95] LA Meyer-Reil (1978), Autoradiography and epifluorescence microscopy combined for the determination of number and spectrum of actively metabolizing bacteria in natural waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 506–512.
- [96] T Luukkonen, J Teeriniemi, H Prokkola, J Rämö, U Lassi (2014), Chemical aspects of peracetic acid based wastewater disinfection, *Water SA*, 40: 73–80.
- [97] T Luukkonen, J Teeriniemi, H Prokkola, J Rämö, U Lassi (2014), Chemical aspects of peracetic acid based wastewater disinfection, 40: 73–80.
- [98] MJ Flores, MR Lescano, RJ Brandi, AE Cassano, MD Labas (2014), A novel approach to explain the inactivation mechanism of *Escherichia coli* employing a commercially available peracetic acid, *Water Sci. Technol.*,.
- [99] D Santoro, R Gehr, TA Bartrand, L Liberti, M Notarnicola, A Dell'Erba, D Falsanisi, CN Haas (2007), Wastewater Disinfection by Peracetic Acid: Assessment of Models for Tracking Residual Measurements and Inactivation, *Water Environ. Res.*, 79: 775–787.
- [100] EE Coyle, LE Ormsbee, GM Brion (2014), Peracetic Acid as an Alternative Disinfection Technology for Wet Weather Flows, *Water Environ. Res.*, 86: 687–697.
- [101] M Baldry, J Fraser (1988), Disinfection with peroxygens In: Payne KR Editor Industrial biocides,.
-

BIBLIOGRAFIA

---

- [102] L Liberti, A Lopez, M Notarnicola (1999), Disinfection With Peracetic Acid for Domestic Sewage Re-Use in Agriculture, *Water Environ. J.*, 13: 262–269.
- [103] A Dell'Erba, D Falsanisi, L Liberti, M Notarnicola, D Santoro (2007), Disinfection by-products formation during wastewater disinfection with peracetic acid, *Desalination*, 215: 177–186.
- [104] R Crebelli, L Conti, S Marchini, S Monarca, D Feretti, I Zerbini, C Zani, E Veschetti, D Cutilli, M Ottaviani (2003), [Genotoxic and ecotoxic effects of urban waste water disinfected with sodium hypochlorite or peracetic acid], *Ann. Ig.*,
- [105] S Monarca, SD Richardso, D Feretti, M Grottolo, AD Thruston, C Zani, G Navazio, P Ragazzo, I Zerbini, A Alberti (2002), Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid, *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 309–318.
- [106] RK Chhetri, E Klupsch, HR Andersen, PE Jensen (2018), Treatment of Arctic wastewater by chemical coagulation , UV and peracetic acid disinfection, 32851–32859.
- [107] S Stampi, G De Luca, F Zanetti (2001), Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents, *J. Appl. Microbiol.*, 91: 833–838.
- [108] J Koivunen, H Heinonen-Tanski (2005), Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments, *Water Res.*, 39: 1519–1526.
- [109] C Lubello, C Caretti, R Gori (2018), Comparison between PAA / UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / UV disinfection for wastewater reuse, 205–212.
- [110] R Morris (1993), Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectants, *Water Sci. Technol.*, 27: 387–393.
- [111] D Falsanisi, R Gehr, D Santoro, A Dell'Erba, M Notarnicola, L Liberti (2006), Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewaters, *Water Qual. Res. J. Canada*, 41: 398–409.
- [112] W D'ans, J., Frey (1913), Untersuchungen über die Bildung von Persäuren aus organischen Säuren und Hydroperoxyd, *Z. Anorg. Allg. Chem*, 84: 145–164.
- [113] DG Greenspan, F.P; MacKellar (1951), The application of peracetic acid germicidal
-

BIBLIOGRAFIA

---

- washes to mold control of tomatoes, *Food Technol.*, 5: 95–97.
- [114] BJ Bassam, G Caetano-Anolles, PM Gresshoff (1991), Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 196: 80--3.
- [115] MHE CARL R. MERRIL, DAVID GOLDMAN, SYLVIA A. SEDMAN (1981), Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins, *Backhouse A. R. Woodhill, South Pac. Comm. Tech. Circ*, 23: 323.
- [116] MF Gutierrez, JC Paggi, AM Gagneten (2012), Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity, *Ecotoxicology*, 21: 428–438.
- [117] S and P Walter, Hopkin (1997), Principles of Ecotoxicology, 2º, (Ed. T. and F.E.U.O.R. UK).
- [118] WZ Tang, M Sillanpää (2015), Bacteria sensitivity index of UV disinfection of bacteria with shoulder effect, *J. Environ. Chem. Eng.*, 3: 2588–2596.
- [119] MA Borowitzka (1999), Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters, *Prog. Ind. Microbiol.*, 35: 313–321.
- [120] BK Biswal, R Khairallah, K Bibi, A Mazza, R Gehr, L Masson, D Frigon (2014), Impact of UV and peracetic acid disinfection on the prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in uropathogenic *Escherichia coli* in wastewater effluents, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80: 3656–3666.
- [121] M Ceragioli, M Mols, R Moezelaar, E Ghelardi, S Senesi, T Abee (2010), Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of bacillus cereus to various disinfectant treatments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3352–3360.
- [122] ECETOC (2001), Peracetic Acid (CAS No 79-21-0) and its Equilibrium Solutions, 40th ed., (Ed. ECETOC), Brussels.
- [123] P Du, W Liu, H Cao, H Zhao, C Huang (2018), Oxidation of amino acids by peracetic acid: Reaction kinetics, pathways and theoretical calculations, *Water Res. X*, 1: 100002.
- [124] RJW Lambert, MD Johnston, EA Simons (1999), A kinetic study of the effect of hydrogen peroxide and peracetic acid against *Staphylococcus aureus* and
-



BIBLIOGRAFIA

---

- Pseudomonas aeruginosa* using the Bioscreen disinfection method, *J. Appl. Microbiol.*, 87: 782–786.
- [125] JL Sagripanti, A Bonifacino (1996), Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 545–551.
- [126] DA Small, W Chang, F Toghrol, WE Bentley (2007), Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite , peracetic acid , and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*, 1093–1105.
- [127] HL Chan, PR Gaffney, MD Waterfield, H Anderle, H Peter Matthiessen, HP Schwarz, PL Turecek, JF Timms (2006), Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis, *FEBS Lett.*, 580: 3229–3236.
- [128] J Silva, G Torrejón, E Bay-Schmith, A Larrain (2003), Calibración Del Bioensayo De Toxicidad Aguda Con *Daphnia Pulex* (Crustacea: Cladocera) Usando Un Tóxico De Referencia, *Gayana (Concepción)*, 67: 87–96.
- [129] WA Brungs (1973), Effects of residual chlorine on aquatic life, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45: 2180–2193.
- [130] D Falsanisi, R Gehr, D Santoro, AD Erba, M Notarnicola, L Liberti (2018), Kinetics of PAA Demand and its Implications on Disinfection of Wastewaters, 41: 398–409.
- [131] V Mezzanotte, M Antonelli, S Citterio, C Nurizzo (2007), Wastewater Disinfection Alternatives: Chlorine, Ozone, Peracetic Acid, and UV Light, *Water Environ. Res.*, 79: 2373–2379.
- [132] A Azzellino, M Antonelli, R Canziani, F Malpei, M Marinetti, C Nurizzo (2011), Multivariate modelling of disinfection kinetics: A comparison among three different disinfectants, *Desalin. Water Treat.*, 29: 128–139.
- [133] JB De Souza, F Queiroz Valdez, RF Jeranoski, CM De Sousa Vidal, GS Cavallini (2015), Water and Wastewater Disinfection with Peracetic Acid and UV Radiation and Using Advanced Oxidative Process PAA/UV, *Int. J. Photoenergy*, 2015:.
- [134] X Domènech, WF Jardim, MI Litter (2015), Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes, *Elimin. Contam. Por Fotocatálisis Heterogénea*, 3–26.
- [135] SA Bradford, H Kim, B Headd, S Torkzaban (2016), Evaluating the Transport of
-

BIBLIOGRAFIA

---

- Bacillus subtilis Spores as a Potential Surrogate for Cryptosporidium parvum Oocysts,.
- [136] R Andreozzi, V Caprio, A Insola, R Marotta (1999), Advanced oxidation processes ( AOP ) for water purification and recovery, 53: 51–59.
- [137] C Cominellis, A Kapalka, S Malato, SA Parsons, I Poulios, D Mantzavinos (2008), Advanced oxidation processes for water treatment : advances and trends for R & D, 776: 769–776.
- [138] MA Oturan, J Aaron (2014), Advanced Oxidation Processes in Water / Wastewater Treatment : Principles and Applications A Review in Water / Wastewater Treatment : Principles and Applications A Review, 3389:.
- [139] T Oppenländer (2002), Photochemical Purification of Water and Air, Wiley-VCH.
- [140] C von Sonntag, H -P Schuchmann (1991), The Elucidation of Peroxyl Radical Reactions in Aqueous Solution with the Help of Radiation-Chemical Methods, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 30: 1229–1253.
- [141] ZB Alfassi, P Neta, B Beaver (1997), Radiolytic studies of the mechanism of autoxidation of triphenylphosphine and related compounds, *J. Phys. Chem. A*, 101: 2153–2158.
- [142] M Cai, P Sun, L Zhang, C Huang (2017), Article UV / Peracetic Acid for Degradation of Pharmaceuticals and Reactive Species Evaluation UV / Peracetic Acid for Degradation of Pharmaceuticals and Reactive Species Evaluation,.
- [143] F Formisano, A Fiorentino, L Rizzo, M Carotenuto, L Pucci, M Giugni, G Lofrano (2016), Inactivation of Escherichia coli and Enterococci in urban wastewater by sunlight/PAA and sunlight/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes, *Process Saf. Environ. Prot.*, 104: 178–184.
- [144] P Krzeminski, M Concetta, P Karaolia, A Langenhoff, CMR Almeida, E Felis, F Gritten, H Rasmus, T Fernandes, CM Manaia, L Rizzo, D Fatta-kassinos (2019), Science of the Total Environment Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread : A review, *Sci. Total Environ.*, 648: 1052–1081.
-

BIBLIOGRAFIA

---

- [145] L Rizzo, T Agovino, S Nahim-Granados, M Castro-Alfárez, P Fernández-Ibáñez, MI Polo-López (2019), Tertiary treatment of urban wastewater by solar and UV-C driven advanced oxidation with peracetic acid: Effect on contaminants of emerging concern and antibiotic resistance, *Water Res.*, 149: 272–281.
- [146] L Rizzo, G Lofrano, C Gago, T Bredneva, P Iannece, M Pazos, N Krasnogorskaya, M Carotenuto (2018), Antibiotic contaminated water treated by photo driven advanced oxidation processes: Ultraviolet/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs ultraviolet/peracetic acid, *J. Clean. Prod.*, 205: 67–75.
- [147] P Sun, T Zhang, B Mejia-tickner, R Zhang, M Cai, C Huang (2018), Rapid Disinfection by Peracetic Acid Combined with UV Irradiation, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 5: 400–404.
- [148] E Vankerckhoven, B Verbessern, S Crauwels, P Declerck, K Muylaert, KA Willems, H Rediers (2011), Exploring the potential synergistic effects of chemical disinfectants and UV on the inactivation of free-living bacteria and treatment of biofilms in a pilot-scale system, 1247–1254.
- [149] R González, A., Gehr, R., Vaca, M., & López (2012), Disinfection of an advanced primary effluent with peracetic acid and ultraviolet combined treatment: a continuous-flow pilot plant study, *Water Environ. Res.*, 84(3): 247–253.