

LA CONTAMINACIÓN **INDUSTRIAL DE AGUAS**

UNA MIRADA MICROBIOLÓGICA
Y MOLECULAR

LA CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL DE AGUAS

UNA MIRADA MICROBIOLÓGICA
Y MOLECULAR

Compilador

Oscar Eduardo Rojas Álvarez

Autores

José Oñate Garzón, Iván Meléndez Gelvez, Ary Fabián Paruma Velasco, Margarita Zuleta, Héctor Hugo Cárdenas, Carlos Alberto Peláez, Fernando Bonilla Millán, Jhon Alexander Rodríguez Estrada, Oscar Eduardo Rojas Álvarez, Faustino Andreas Toba, Aura Falco, Carlos Andrés Aranaga, Guillermina Alonso, Sandra Patricia Rivera Sánchez, Liliana Flórez y Janeth Sanabria.



La contaminación industrial de aguas. Una mirada microbiológica y molecular / Oscar Eduardo Rojas Álvarez [y otros]. - Editor Edward Javier Ordoñez. -- Cali : Universidad Santiago de Cali, 2018.

182 páginas : fotografías ; 17 X 24 cm.
Incluye índice de contenido.

1. Contaminación del agua 2. Tratamiento del agua 3. Microbiología del agua 4. Análisis del agua. I. Rojas Álvarez, Oscar Eduardo, autor. II. Ordoñez, Edward Javier, editor. 628.16 cd 22 ed. A1618453

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arango



La contaminación industrial de aguas. Una mirada microbiológica y molecular.

© Universidad Santiago de Cali.

© **Autores:** José Oñate Garzón, Iván Meléndez Gelvez, Ary Fabián Paruma Velasco, Margarita Zuleta, Héctor Hugo Cárdenas, Carlos Alberto Peláez, Fernando Bonilla Millán, Jhon Alexander Rodríguez Estrada, Oscar Eduardo Rojas Álvarez, Faustino Andreas Toba, Aura Falco, Carlos Andrés Aranaga, Guillermina Alonso, Sandra Patricia Rivera Sánchez, Liliana Flórez y Janeth Sanabria.

1a. Edición **100 ejemplares**

Cali, Colombia - 2018

ISBN: 978-958-5522-37-4

ISBN (Libro digital): 978-958-5522-38-1

Fondo Editorial University Press Team

Carlos Andrés Pérez Galindo
Rector

Rosa del Pilar Cogua Romero
Directora General de Investigaciones
Edward Javier Ordóñez
Editor en Jefe

Comité Editorial Editorial Board

Rosa del Pilar Cogua Romero
Monica Chávez Vivas
Edward Javier Ordóñez
Luisa María Nieto Ramírez
Sergio Molina Hincapie
Saul Rick Fernández Hurtado
Sergio Antonio Mora Moreno
Francisco David Moya Chaves

Proceso de arbitraje doble ciego: "Double blind" peer-review

Recepción/Submission:
Octubre (October) de 2017

**Evaluación de contenidos/Peer-review
outcome:**
Febrero (February) de 2018

**Correcciones de autor/Improved version
submission:**
Junio (June) de 2018

Aprobación/Acceptance:
Septiembre (September) de 2018

Diseño y diagramación
Juan Diego Tovar Cardenas
Universidad Santiago de Cali
Tel. 5183000 - Ext. 322
Cel. 301 439 7925

Impresión
SAMAVA EDICIONES E.U.
Tel: (2) 8235737

**Distribución y Comercialización
Universidad Santiago de Cali**
Publicaciones
Calle 5 No. 62 - 00
Tel: 518 3000, Ext. 323 - 324 - 414



La editorial de la Universidad Santiago de Cali se adhiere a la filosofía del acceso abierto y permite libremente la consulta, descarga, reproducción o enlace para uso de sus contenidos, bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

CONTENIDO

Introducción 15

Capítulo 1

MUTAGENICIDAD Y GENTOXICIDAD DE AGUAS QUE
SURTEN UNA PLANTA DE POTABILIZACIÓN

José Oñate-Garzón

Iván Meléndez Gelvez

Ary Fabián Paruma Velasco

Héctor Hugo Cárdenas

Margarita Zuleta

Carlos Alberto Peláez 17

Capítulo 2

INTERACCIONES INTERMOLECULARES DE LA PROTEÍNA
DE MEMBRANA ARF*GTP CON POTASIO Y GLICEROL,
COMPONENTES MAYORITARIOS DE LA VINAZA DE
CAÑA DE AZÚCAR

Fernando Bonilla Millán

Jhon Alexander Rodríguez Estrada

Oscar Eduardo Rojas Álvarez 47

Capítulo 3

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS EN UN
RESERVORIO DE AGUA EN VENEZUELA. UNA
APROXIMACIÓN A LA MULTIRRESISTENCIA
BACTERIANA EN AMBIENTES NATURALES

Faustino Andreas Toba

Aura Falco

Carlos Andrés Aranaga

Guillermina Alonso 93

Capítulo 4

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA
CUANTIFICAR SALMONELLA SPP, PRESENTE EN AGUAS
TRATADAS CON FOTOFENTON**

Sandra Patricia Rivera Sánchez

Liliana Flórez

Janeth Sanabria 121

Acerca de los autores 169

Pares Evaluadores..... 177

ÍNDICE DE FIGURAS



- Figura 1.** Asociación lineal positiva entre la concentración de los extractos del afluyente y la planta, y el promedio de los índices mutagénicos (IM) exhibidos por ambos sitios de muestreo..... 28
- Figura 2.** Asociación lineal positiva entre longitud de cola y la concentración del extracto de dos sitios de muestreo: afluyente y la planta, promediado a partir de 300 datos por cada concentración..... 30
- Figura 3.** Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos por una hora a cinco concentraciones de los extractos de las aguas del afluyente (●) y del agua cruda al entrar a la planta (▲)..... 32
- Figura 4.** Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con cinco concentraciones de extractos de agua del afluyente (●) y de agua cruda al entrar a la planta (▲) mediante coloración con azul de tripan. 33
- Figura 5.** Interacciones de enlace de campo de fuerza de arriba hacia abajo: estiramiento, ángulo (bending), ϕ ángulo diedro y ángulo diedro impropio. Extraído de: Scarable Molecular Dynamics with NAMD; 2005 53
- Figura 6.** Ejemplo 2D de la distribución de carga q (círculo blanco) entre los nodos uniformes de la malla generada. Extraído de: Scalable Molecular Dynamics with NAMD; 2005..... 56
- Figura 7.** RMSD (Root Mean Squared Deviation, o Raíz de Desviación Estándar Cuadrada) de la proteína solvatada con respecto al tiempo. Siendo el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X. 58
- Figura 8.** Comparativo: RMSD de Proteína (curva rmsd_PROT.dat) y RMSD de los 3 gliceroles (curva rmsd_3gly.dat) respecto al tiempo. En este gráfico, se tiene en el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X. La curva superior corresponde al RMSD (Root Mean Squared Deviation) de los ligandos y la curva inferior al RMSD de la proteína. 59

Figura 9. RMSD de la proteína (*rmsd_prot.dat*) vs RMSD de los ligandos potasio (*rmsd_3KCL.dat*) con respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps), donde la curva superior representa los ligandos y la curva inferior representa la proteína. La curva de RMSD de la proteína nos muestra su alta estabilidad ante las perturbaciones que podría provocar la aplicación de energía al sistema y la presencia de los potasios, mientras que la curva de los potasios demuestra una tendencia a NO estar dentro de la zona de interacción (atracción) 61

Figura 10. RMSF comparativo del ligando MGLY 182 (curva *RMSF_182.dat*) con la proteína (curva *RMSF_prot.dat*) con respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando MGLY 182 y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps)..... 62

Figura 11. RMSF comparativo del ligando MGLY 183 (curva *RMSF_183.dat*) con la proteína (curva *RMSF_prot.dat*) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps). 63

Figura 12. RMSF comparativo del ligando MGLY 184 (curva *RMSF_184.dat*) con la proteína (curva *RMSF_prot.dat*) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps). 64

Figura 13. Comparativo de la raíz de las fluctuaciones cuadradas promedio del ligando MGLY 184 (curva *RMSF_184.dat*) y de la estructura primaria de la proteína (*RMSF_prot_BB.dat*), Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps). (a). Momento de deformación de la proteína y alejamiento de ligando por impedimento estérico formado. 65

Figura 14. RMSF comparativo de los tres ligandos de glicerol. La curva de menor fluctuación es la proteína representando las distancias en ångtröms en el eje Y y el tiempo en picosegundos en el eje X. La tendencia particular de los ligandos siendo el ligando 184 el más estable en fluctuación con la proteína..... 66

Figura 15. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 1. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en

ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 1 se pueden ver claramente 2 puntos de interés en la curva; inicialmente fluctúa hasta casi los 14 ångströms y alrededor de los 360 ps ocurre un desplazamiento significativo, Esta perturbación se ve fuertemente marcada durante casi la mitad de la dinámica (entre 400 y 1400 ps); otro punto de interés es entre los 1400 y casi 2300 ps, donde se ve una fluctuación no tan pronunciada como la anterior. El fenómeno de perturbación observado a partir de los 2400 ps no es de interés puesto que no depende de algún efecto directo ocasionado por la proteína o algún contraión. 68

Figura 16. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 2. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 2 se pueden ver claramente 3 puntos de interés en la curva; inicialmente presenta fluctuaciones que lo alejan de la zona de interés (210ps a 230 ps), de ahí mantiene un comportamiento parecido al potasio 1 durante toda la dinámica; entre los 722 ps y 740 ps se ve una marcada reducción por poco tiempo de las fluctuaciones y el otro punto de interés es entre los 2360 ps y 2450 ps, donde se ve una reducción de las fluctuaciones.....69

Figura 17. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 3 se puede ver claramente una total separación sin tendencia a acercarse a la proteína; se evaluaron entonces las condiciones iniciales (tiempo 0), identificando los posibles aminoácidos responsables de la repulsión y el tiempo alrededor de 2700 ps, donde las fluctuaciones decrecen de manera considerable.....70

Figura 18. Comparativo del RMSF de la proteína con los potasios 1, 2 y 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína. Se evidencia la tendencia particular y con respecto a los otros potasios de alejarse de su posición inicial y vibrar libremente dentro de la caja de estudio..... 70

Figura 19. RMSF del esqueleto proteínico respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia en ångströms; en el eje X el tiempo en picosegundos. Considerando solamente el movimiento de los átomos Carbono, Oxígeno y Nitrógeno de la estructura principal de la proteína, se ve cómo tendió a modificar su estructura tridimensional debido al efecto de la energía aplicada en forma de calor 71

Figura 20. Condición inicial del ligando MGLY 184 interacción a tiempo 0. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras..... 73

Figura 21. (a). Interacción a 400 ps y (b). A 600 ps teniendo 3 aminoácidos cercanos en distancias apropiadas. En el centro se encuentra el ligando (MGLY 184) en interacción y distancias apropiadas con respecto a sus aminoácidos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras. 74

Figura 22. (a). interacción a 700 ps con una particular cercanía con el ASP y (b). Interacción a 866 ps con solo dos aminoácidos cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras..... 75

Figura 23. Última interacción a 955 ps con dos acercamientos previos a la deformación de la proteína. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras. 76

Figura 24. Pérdida total de interacción, en 2503 ps, del ligando MGLY 184 con sus aminoácidos más cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras. 77

Figura 25. Capturas de las condiciones para el potasio 1 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 55$ ps (b). El potasio representado mediante esfera y los aminoácidos de la proteína mostrados en barras y esferas. En $t = 0$ picosegundos:
El potasio se encuentra a 3,26 Å de un hidrógeno de ILE155 (1), a 3,41 Å de un hidrógeno de PHE154 (2), a 3,77 Å de un hidrógeno de GLN156 (3) y a 2,70 Å de un oxígeno de ILE155. Los aminoácidos involucrados son entonces Isoleucina (ILE), Glutamina (GLN) y Fenilalanina (PHE) 80

Figura 26. Capturas de las torsiones del GLN155, reordenamiento posiblemente responsable de la repulsión del potasio en los tiempos $t = 50$ ps hasta $t = 58$ ps. Nitrógeno en azul, hidrógeno en blanco, oxígeno en rojo y carbono en bronce. Se puede apreciar la torsión del nitrógeno hacia abajo con el paso del tiempo de dinámica..... 81

Figura 27. Capturas de pantalla para el potasio 2 en tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 731$ ps (b). Se puede apreciar que la zona de interés presenta suficientes puntos de posible interacción, estando a distancias entre 2,39 y 3,78 con respecto a átomos electronegativos (oxígeno de la leucina LEU130 y oxígeno del ácido aspártico ASP129) y un electropositivo (hidrógeno de la Treonina THR161). Pasados 731 ps se observó un breve acercamiento sin generar un cambio significativo a la tendencia

del potasio de no realizar interacciones relevantes ion-dipolo. Potasio representado en esfera y aminoácidos representados en barras y esferas.82

Figura 28. Capturas de pantalla para el potasio 3 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 2690$ ps (b). Se evidencia que el potasio se sale de la zona de interés y empieza a moverse dentro de la caja de agua como ion libre, sin sentir ningún efecto electrostático después de ser empujado fuera del punto inicial..... 82

Figura 29. Potasios 1, 2 y 3 en tiempo $t=2279$ ps. Se muestra la estructura tridimensional de la proteína y los potasios representados mediante esferas; se ve claramente que no hay interacción de ningún tipo entre ion-proteína o ion-ion. 83

Figura 30. Comparativo de la estructura tridimensional de la proteína en los tiempos $t = 0$ ps (izquierda) y $t = 2700$ ps (derecha). Se pueden apreciar distintas características superficiales que evidentemente afectaron la capacidad de interacción de los ligandos..... 83

Figura 31. Mapa del Embalse Pao-Cachinche, mostrando las estaciones de muestreo. Se señalan los sitios de toma de muestras (E1, E2). [Tomado y modificado de González y colaboradores, 2004]..... 99

Figura 32. Registro fotográfico de la corrida electroforética del aislamiento de plásmidos. A: Aislamiento de ADN plasmídico empleando el método de lisis alcalina. Carril 1: Marcador de tamaño molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: *Pseudomonas cepacea*. B: Aislamiento de DNA plasmídico empleando el método de Kado y Liu. Carril 1: Marcador de peso molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: cepa de *E. coli* DH5a (control sin plásmidos), Carril 4: *Pseudomonas* sp, Carril 5: *Pseudomonas aeruginosa*, Carril 6: *Pseudomonas fluorescens*..... 108

Figura 33. Diagrama de Flujo del Proceso Metodológico para la Validación de la Técnica NMP..... 134

Figura 34. Diagrama de Flujo del Proceso Metodológico para la Validación de la Técnica NMP 135

Figura 35. Cuantificación de *Salmonella* TYPHIMURIUM, por los tres métodos, DVC-FISH, NMP y recuento en placa, en tiempo inicial y a los 10 minutos de aplicar el proceso de desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe^{2+} y 20ppm de H_2O_2) 137

Figura 36. Especificidad y sensibilidad del NMP y recuento en placa, comparados con el método de Referencia o Gold estándar, a los 10 minutos de desinfección con Foto-fenton (2ppm de F_2^+ y 20ppm de H_2O_2)..... 141

Figura 37. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, al realizarse Foto-fenton, (2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2), a través del tiempo (t_0 , t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h). 142

Figura 38. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, cuando son expuestas a la UV, sin el proceso Foto-fenton, a través del tiempo (t_0 , t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h). 145

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Valores del índice de mutagenicidad de acuerdo al sitio de muestreo, a la cepa, a la presencia y ausencia de enzimas metabólicas y a las Concentraciones. Los resultados son expresados como el promedio de 3 experimentos independientes, cada tratamiento por duplicado.</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 2. Longitud de cola como resultado de la fragmentación del ADN, inducida por los extractos de los dos sitios de muestreo e interacción entre concentración y sitio de muestreo. También se observa la F y la p de ANOVA para cada caso.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 3. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño en eritrocitos, inducido por los extractos de las aguas del afluente y de la planta a diferentes concentraciones evaluadas.</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 5. Títulos bacterianos obtenidos</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 6. Resistencia bacteriana a antibióticos</i>	<i>105</i>
<i>Tabla 7. Resistencia bacteriana a metales pesados</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 8. Definición de variables.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 9. Definición de variables DVC-FISH</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 10. Medidas de validez del método Recuento en Placa, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2ppm de F2+ y 20ppm de H2O2), para Salmonella serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición.....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 11. Medidas de validez del método NMP, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2 ppm de F2+ y 20 ppm de H2O2), para Salmonella serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición</i>	<i>140</i>

INTRODUCCIÓN

Los Grupos de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO) y Microbiología Industrial y Medio Ambiente (GIMIA) hacen parte del Centro de Estudios e Investigaciones en Ciencias Básicas Ambientales y Desarrollo Tecnológico (CICBA), adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali. Desde su nacimiento el CICBA, a propendido por estar a la vanguardia al interior de la Universidad en la investigación, conciencia por el medio ambiente y desarrollo tecnológico. Los grupos de investigación acordes con esta macrolínea, se han preocupado por aportar sus desarrollos investigativos y de innovación en un marco de responsabilidad social, es así como en este libro de investigación titulado “LA CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL DE AGUAS: Una Mirada Microbiológica y Molecular” se recopilan 4 trabajos de investigadores pertenecientes a los dos grupos de investigación con el fin de dar a conocer estudios realizados en Colombia y Venezuela sobre la problemática de la contaminación en cuerpos acuíferos.

En el primer capítulo el Dr. Oñate y colaboradores se enfocan en determinar la actividad mutagénica y genotóxica de un afluente de agua que alimenta una planta de potabilización de la ciudad de Medellín-Colombia. Ellos encuentran que las aguas que llegan a la planta contienen mutágenos, de acuerdo a la literatura estos compuestos podrían ser hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminos heterocíclicos, ftalatos, y benzotriazoles. Además, se evidenció que los compuestos que constituyen estas aguas, tienen la capacidad de interactuar con el ADN en linfocitos humanos, lo que indica que muchos de estos compuestos pueden ser potencialmente peligrosos.

En el Segundo capítulo el M.Sc. Oscar Rojas presenta un trabajo de modelamiento molecular de una proteína de membrana de la *Echoli* llamado Arf*GTP, con dos ligandos como potasio y glicerol mediante dinámica molecular utilizando un software llamado Dinámica Molec-

ular Escalable por sus siglas en inglés, NAMD. Los ligandos de potasio y glicerol con compuestos presentes en la vinaza, el cual es un desecho obtenido en la producción de caña de azúcar. Este estudio busca encontrar un mejor empleo para este desecho y de esta manera evitar su vertimiento a cuerpos acuíferos evitando su contaminación.

En el tercer capítulo la Dra. Aura Falco, el M.Sc. Carlos Aranaga y colaboradores realizaron la caracterización microbiológica de los cuerpos de agua del embalse Pao-Cachinche, ubicado en el centro norte de Venezuela, encontrando que el género predominante fue *Pseudomonas*. Adicionalmente se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, detectándose patrones complejos de resistencia a antibióticos y metales pesados.

En el último capítulo la M.Sc. Sandra Rivera y colaboradores evaluaron la presencia de *Salmonella sp* en aguas artificiales tratadas mediante el proceso de desinfección foto-fenton, empleando las técnicas recuento en placa y NMP frente al gold estándar DVC-FISH. En este estudio se encontró que el proceso de desinfección con foto-fenton, las bacterias no lograron ser inactivadas o inhibidas totalmente, debido a que presentaron daños reversibles que las hacen viables no cultivables en los métodos de recuento en placa presentando altos falsos negativos, pero en medios líquido como el método NMP se hizo cuantificable al tener bajas concentraciones de la bacteria.

En la actualidad existe una gran preocupación por los diversos factores que afectan la potabilidad de cuerpos acuíferos. En la literatura se encuentran múltiples trabajos en donde se advierten estas formas de contaminación y procedimientos para tratar de remediar esta situación, se espera que con este libro se aportan estrategias que se puedan adaptar como solución a los problemas de contaminación que se tienen en el presente.

Edwin Flórez López
Decano Facultad Ciencias Básicas
Universidad Santiago de Cali

MUTAGENICIDAD Y GENTOXICIDAD DE AGUAS QUE SURTEN UNA PLANTA DE POTABILIZACIÓN

José Oñate-Garzón

Iván Meléndez Gelvez

Ary Fabián Paruma Velasco

Hector Hugo Cardenas

Margarita Zuleta

Carlos Alberto Peláez

Abstract: Waters that supply waters treatment plants for human consumption are usually contaminated by industrial, agricultural and waste water, which contribute to the presence of compounds with mutagenic properties. In this work the mutagenic and genotoxic activity of water extracts obtained using XAD2 and XAD7 resins, from an affluent that supplies a water treatment plant and from the untreated water that arrives to the plant, were evaluated through the Ames test and the comet assay, respectively. A concentration-response effect between water extracts and mutagenic effect was evidenced, exhibiting that TA98 strain in presence of microsomal fraction S9 had the most number of revertants. Besides the mutagenic activity exhibited by the affluent and plant extracts was different being 12% more mutagenic than affluent water. The genotoxicity results showed that the different quantities of the extracts of the water samples can induce different levels of damage in the DNA of human lymphocytes, independently of the sample site. The most tail length of the Comet observed was 75.8 μm at 1.5mg, the maximum concentration evaluated. Results suggest that a con-

siderable amount of mutagenic and genotoxic contaminants that are discharged into the effluent can arrive to the plant.

Keywords: Mutagenicity, Genotoxicity, Raw water, Ames test, Comet assay.

Resumen: Las aguas que surten las plantas de potabilización para luego ser tratadas para el consumo humano, generalmente son contaminadas por desechos industriales, agrícolas y aguas negras, los cuales contribuyen a la presencia de compuestos con propiedades mutagénicas. En este trabajo se evaluó la mutagenicidad y genotoxicidad de extractos de aguas concentrados mediante resinas XAD2 y XAD7. Las aguas fueron tomadas de un afluente que abastece una planta de potabilización y del agua de dicha planta sin tratar. Las actividades mutagénicas y genotóxicas se estudiaron usando el ensayo de Ames y el ensayo cometa, respectivamente. Se evidenció un efecto concentración-respuesta entre los extractos de agua y el efecto mutagénico, prevaleciendo el número de revertantes en la cepa TA98 en presencia de enzimas metabólicas. Además, la actividad mutagénica exhibida por los extractos del afluente y de la planta fue diferente, siendo las aguas de la planta 12% más mutagénicas. Los resultados de genotoxicidad mostraron que las distintas cantidades de los extractos de las muestras de agua, pueden inducir diferentes niveles de daño en el ADN de linfocitos humanos, independiente del sitio de muestreo. La máxima longitud de cola observada fue de 75.8 μm en la máxima concentración de extracto de agua, 1.5mg.

Palabras claves: Mutagenicidad, Genotoxicidad, Aguas negras, Test de Ames, Ensayo cometa.

1. INTRODUCCIÓN

Un ambiente acuático, como un río, es un depositario de descargas antropogénicas, domésticas, agrícolas e industriales, constituyéndose así en reservorios potenciales de mutágenos, los cuales pueden ser usados para alimentar plantas de potabilización de aguas. Diversos estudios han revelado que las aguas superficiales pueden contaminarse con componentes genotóxicos y mutagénicos a través de diferentes fuentes como desechos industriales, aguas negras, lixiviados agrícolas con agroquímicos, entre otros [1, 2]. Consecuentemente, la contaminación del agua puede ser un serio problema para los ecosistemas acuáticos y para la salud humana, ya que muchos de estos compuestos son transportados por el agua y transformados en subproductos activos por los tratamientos de desinfección, hasta llegar a aguas domiciliarias [3, 4]. Compuestos mutagénicos como las aminas heterocíclicas (AHs), formadas en las partes quemadas de carnes fritas y asadas; hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados por la combustión incompleta del material orgánico, entre otros desechos, pueden llegar a los ríos por distintos tipos de desechos contaminantes [5].

Existen diversos tipos de desechos industriales que presentan efecto mutagénico y son frecuentemente vertidos a las aguas de quebradas y ríos. Por ejemplo, el benceno es ampliamente usado como materia prima en la síntesis de plásticos, hules, resinas, nylon, anilina, detergentes, medicamentos, colorantes e insecticidas, por lo tanto, está contenido en muchos residuos industriales y está asociado con un incremento en la incidencia de leucemias y aneuploidías en células madre hematopoyéticas [6]. Compuestos como los ftalatos también han mostrado ser mutagénicos [7], entre ellos están: dibutilftalato (DBP) y diidobutilftalato (DiBP), los cuales son usados para mejorar el procesamiento químico de materiales plásticos, de lacas, de cauchos, cosméticos, juguetes de niños y lubricantes. Las plantas de colorantes trabajan a base de arilaminas, que son compuestos mutagénicos y carcinogénicos [8] capaces de permanecer intactos por mucho tiempo en el agua cuando son arrojados a los ríos o pueden ser absorbidos por los sedimentos [9]. Los benzotriazoles, tales

como 2-fenil-benzotriazol, son productos de la industria de colorantes, pesticidas y caucho y se ha observado que inducen una alta mutagenicidad [10].

Las aguas negras, procedentes de domicilios, hospitales, fabricas, estaciones de gasolina, e.t.c contienen aminos heterocíclicas (AHs), con alta potencialidad mutacarcinogénica. Las AHs ya sea en forma libre o en mezclas complejas, llegan a las aguas negras por medio de la orina y heces fecales de personas que consumen dichos alimentos [11]. Dichas aminos se forman en la costra quemada de alimentos proteicos ricos en creatina, como carnes, pescado fritos y asados. Entre las AHs están las amino-imidazo azarenas (AIA) que han demostrado ser potentes mutágenos. Los niveles de producción de los AIA en la costra quemada varían en bajos rangos de p.p.b, dependiendo del tiempo de calor y temperatura, pero también son influenciados por el contenido de agua, proporción de aminoácidos y tipo de carne [1]. En general, las aminos heterocíclicas pueden dividirse en dos grupos: aminos polares que contienen el anillo imidazo y las aminos no polares que tienen en común una molécula Piridoindol o Dipiridoimidazol. La mayoría de aminos heterocíclicas son formadas de la mezcla creatinina, aminoácidos y carbohidratos, expuesta a altas temperaturas [12].

Investigaciones hechas con sistemas modelo, muestran que la creatina juega un papel importante en la formación de mutágenos que contienen el anillo imidazo como IQ, IQx (2-amino-3 metilimidazo [4,5-f] Quinolina), MeIQx (2-amino-3-metil-3h-imidazo(4,5f) quinolina), y DiMeIQx (2-amino-3,4-dimetil-3h-imidazo(4,5f)quinolina) [13]. Por la cocción de la carne también se pueden originar moléculas piridoindol tal como el 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4-5-b] piridina (PhIP). Estudios han demostrado que el PhIP incrementa la proliferación del receptor estrogénico ER, obteniendo una respuesta mitogénica por activación de proteínas kinasas (MAPK) [14], aumentando así la promoción y progresión de enfermedades neoplásicas. Todas las aminoarenas formadas en alimentos expuestos a altas temperaturas (fritos y asados) son potentes mutágenos y se ha evidenciado que pueden inducir cáncer en ratas, ratones y si-

mios en diferentes órganos como hígado, pulmón, estómago, mama, intestino, páncreas, colon, vejiga y próstata [15].

Las aguas negras también contienen hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que en su mayoría son también mutacarcinogénicos, por ejemplo, el benzo (a) pireno. Los HPA carcinogénicos se forman por combustión incompleta y pirolisis de material orgánico, por lo tanto se encuentran en el humo, cenizas, hollín y aceites quemados que son vertidos en el agua [16]. Los mutágenos del humo también llegan a las quebradas y ríos al ser arrastrados por el viento y precipitados a las aguas a través de la lluvia. La mayoría de los HPAs también son pre-mutágenos indirectos que requieren oxidación por citocromo p450 para ser convertidos en forma activa y tener efecto carcinogénico [17]. Existen HPAs que pueden transformarse en mutágenos directos por fotoreactivación en los cuerpos de agua [18].

Existe una estrecha relación entre la exposición crónica a bajas dosis de mutágenos y la incidencia de cáncer, a través de la fijación de mutaciones [19]. Debe tenerse en cuenta que la exposición crónica a pequeñísimas dosis de mutágenos puede resultar en la acumulación de mutaciones en células blanco, hasta convertirlas en iniciadoras del proceso carcinogénico. Aunque las dosis de mutágenos contenidas en el agua son muy pequeñas, del orden de partes por billón (p.p.b), al llegar continuamente al organismo y no causar muerte celular, el daño genético puede acumularse en una sola célula hasta convertirla en cancerosa. Por lo tanto, es de suma importancia conocer las vías por las cuales llegan los mutágenos al organismo y así poderlos evitar.

Una planta de potabilización, ubicada al suroriente de Medellín (Colombia), que distribuye agua potable a más de 1.500.000 habitantes de la parte sur de Medellín y municipios aledaños, potabiliza agua del afluente y de otros ríos que pueden estar contaminados con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras domiciliarias. El afluente, además recibe aguas negras provenientes de un corregimiento, de algunas veredas y de expendio de carnes fritas y asadas, así como de carpinterías ricas en solventes y de bombas de gasolina. Los mutágenos disueltos en el agua pueden encontrarse en pequeñas

concentraciones las cuales pueden ser imperceptibles por ensayos mutagénicos de rutina. Por lo tanto, es necesaria la extracción de la materia orgánica de estas aguas usando resina XAD. Esta resina es un copolímero de estireno-divenilbenzeno de baja polaridad que posee características macrorreticulares, esenciales para su alta capacidad de adsorción de químicos polares y apolares potencialmente efectivos en pruebas tóxicas y genotóxicas.

El ensayo de mutagenicidad de Ames, que consiste en usar cepas auxotrofas de *Salmonella typhimurium* con mutación en el operón histidina, determinan si algún compuesto o mezcla es mutagénica o no, dependiendo de la cantidad de colonias revertantes de his- a his+. Este ensayo, ha sido ampliamente usado para detectar actividad mutagénica en mezclas complejas ambientales, así como de agua de río. Cepas altamente sensibles responden a aminas aromáticas y/o nitrocompuestos que también han sido encontrados ambientalmente en algunas aguas superficiales [20]. El ensayo de cometa permite cuantificar la cantidad de daño en el ADN como resultado de la interacción con agentes genotóxicos contenidos en las aguas que se están evaluando. En este trabajo se logró determinar la actividad mutagénica y genotóxica de extractos de aguas que alimentan una planta de potabilización, cuyos resultados evidencian un potencial riesgo para los habitantes expuestos a estas aguas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras.

Las muestras de agua fueron colectadas en un afluente y en una planta de tratamiento de aguas antes de tratar, de acuerdo al *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water* [21]. 100 litros de agua fueron tomados en el afluente a 1 metro de profundidad, mientras que los 100L de agua antes de tratar se tomaron en el laboratorio de la planta de tratamiento de agua. Ambas muestras se

tomaron en 3 ocasiones distintas con igualdad de condiciones climatológicas. Posteriormente los 100L de agua de cada uno de los sitios muestreados se pasaron por un filtro de gasa con el fin de retener cualquier material sólido.

2.2. Extracción del material orgánico.

Las muestras de agua se ajustaron a un pH 7, muy similar al natural. Luego se procedió a concentrar el material orgánico de cada muestra; para esto, el agua (100L) se pasó por una columna de vidrio que contenía 100 gramos de resina XAD-7 y 100 gramos de resina XAD-2. El agua se pasó por gravedad a una velocidad aproximada de 15 ml/mm. El material orgánico de la columna fue consecutivamente eluído con 4 volúmenes de acetona seguida de tres volúmenes de dietil éter. Los solventes se retiraron por rota evaporación a baja presión y 50°C hasta alcanzar la sequedad para poder pesarlos y etiquetarlos. En la parte inferior y superior de la columna se colocó algodón que también se lavó con metanol. Las concentraciones que se trabajaron se obtuvieron diluyendo 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 y 3 mg de extracto en un mililitro de DMSO al 50%.

2.3. Mutagenicidad por el test de Ames.

El efecto mutagénico de los extractos del material orgánico del agua obtenidos por resinas se evaluó por medio del test de Ames, usando el protocolo descrito por Maron y Ames [22]. Se trabajó con dos cepas mutantes auxotrofas de *Salmonella typhimurium*, TA-98 y TA-100, con mutaciones en el operón histidina por pérdida/ganancia de bases y por sustitución de bases, respectivamente. Se evaluó la mutagenicidad de cada extracto usando concentraciones que no sean tóxicas o solo lleguen a $LC_{10} \cdot 10^8$ bacterias mutantes contenidas en caldo nutritivo fueron mezcladas con las distintas concentraciones de los extractos previamente mencionadas, en presencia o ausencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S9) de rata macho, con el fin de activar algunos mutágenos indirectos de manera metabólica. La mezcla se pre-incubó a 37°C por una hora y luego se sembró en agar mínimo. El conteo de colonias se realizó luego de 48 horas de incubación a 37°C. Para el control positivo se utilizó 2-aminofluoreno (2-AF). Como control negativo

se usaron agua desionizada y bi-destilada, y como control interno se usó DMSO al 7%. Para cuantificar la mutagenicidad se determinó el índice mutagénico (IM), el cual es la proporción entre el número de revertantes inducidas por el tratamiento con respecto a las revertantes espontáneas del control negativo. Los resultados de cada concentración se expresaron como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

2.4. Evaluación de la citotoxicidad por azul de tripán y de la genotoxicidad mediante el ensayo Cometa.

La muestra de sangre fue colectada de un voluntario (saludable, no fumador, de 22 años de edad) en vacuntainer estéril con heparina como anticoagulante. Los linfocitos fueron aislados de las muestras de sangre a base de ficoll, mediante centrifugación a 2000rpm por 30'. Fueron lavados con Buffer fosfato salino (PBS) y tratados independientemente a distintas concentraciones: 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5 mg/ml DMSO (1%). Las células fueron rutinariamente chequeadas por viabilidad celular mediante azul de tripan, antes y después de una hora de tratamiento. Posteriormente el ensayo cometa fue llevado a cabo y se procesó según la metodología propuesta por Singh et al., [23]. Las células tratadas, mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, se pipetearon sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca, por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200mM) a 4°C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio. Las células se observaron de manera manual en un microscopio marca Nikon con un filtro verde de una longitud de onda de 540nm, con un aumento de 400X y un micrómetro ocular de 20X con un valor máximo de medición de 100µm. Se hicieron tres experimentos independientes y se analizaron 100 células por cada tratamiento (50 células por placa) en cada

experimento. El daño del ADN se midió con base en la longitud en μm de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola, hay más fraccionamiento del ADN) [24]. Para medir el daño también se tiene en cuenta la frecuencia de células dañadas. Los linfocitos, cuyas colas sean mayores a dos veces la longitud promedio del control, se clasificaron como células dañadas.

2.5. Análisis estadístico.

Los resultados del test de Ames se analizaron mediante la variable de índice mutagénico (IM), que significa la cantidad de revertantes inducidas por el tratamiento sobre las revertantes espontáneas. El análisis se hizo mediante pruebas no paramétricas de Mann Whitney y análisis de correlación de Spearman. Para los datos de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo cometa solo se tomó el parámetro de (longitud de cola en μm) por que la lectura se hizo manual según Rajaguru, Vidya et al. [25], se promediaron (medianas) con base en los datos de 50 células por cultivo de linfocitos (unidad experimental) se analizaron mediante ANOVA factorial. El análisis se hizo con el programa estadístico SPSS 19.0 (IBM Software, NY, USA), con un nivel de significancia máximo de 0.05. En todas las tablas, N se refiere al número de platos o cajas de petri.

3. RESULTADOS

3.1. Ensayo de Salmonella.

En la Tabla 1 se resumen los resultados promedio (Media y desviación estándar) de la mutagenicidad expresada como índice mutagénico (IM) obtenida con el test de Ames, para cada uno de los cuatro factores incluidos en el estudio (*sitio de muestreo, cepa, activación metabólica y concentración del extracto*).

Los resultados demostraron que las aguas de la planta tuvieron una influencia significativamente mayor sobre el IM ($p < 0.05$) en comparación con las aguas del afluente, exhibiendo un incremento de la mutagenicidad alrededor del 12%. Por otro lado, la cepa de *S. typh-*

imurium TA-98 y la presencia de enzimas metabólicas, extracto S9, influyen significativamente en el IM con respecto al control negativo ($p < 0.05$). El incremento promedio del número de revertantes de la cepa TA-98 respecto a la cepa TA-100 es del 70%, mientras que el incremento promedio de la mutagenicidad de los extractos de agua en presencia de S9 es del 77%.

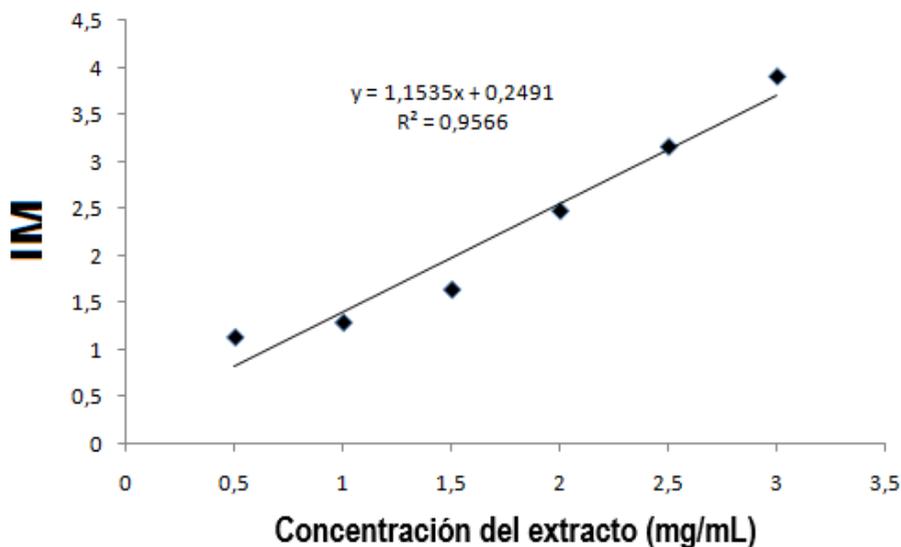
Se observó un efecto claro de concentración-respuesta entre los extractos y la actividad mutagénica mediante la prueba no paramétrica de correlación de Spearman, identificando una asociación lineal positiva, significativa estadísticamente ($p < 0.05$), entre las concentraciones del extracto y el IM (tabla 1). Desde la concentración más baja de extracto (0.5mg/mL) se observa una influencia significativa sobre el IM con respecto al control negativo ($p < 0.05$), y el IM incrementa dependiendo directamente de la concentración mostrando así, mayor promedio de IM en la concentración más alta (3mg/ml) y el menor promedio de IM es exhibido por la concentración más baja (0.5mg/ml).

Tabla 1. Valores del índice de mutagenicidad de acuerdo al sitio de muestreo, a la cepa, a la presencia y ausencia de enzimas metabólicas y a las Concentraciones. Los resultados son expresados como el promedio de 3 experimentos independientes, cada tratamiento por duplicado.

Índice de Mutación				
FACTORES		*X ± DE	N	Prueba; p = sig-nificancia es-tadística
SITIO	Afluente	2.029 ± 0.074	168	U = 11742.000 ^a p = 0.007
	Planta	2.145 ± 0.074	168	
CEPA	TA-98	2.622 ± 0.074	168	U = 10682.500 ^a p = 0.000
	TA-100	1.552 ± 0.074	168	
ACTIVACIÓN METABÓLICA	CON S-9	2.671 ± 0.074	168	U = 9422.000 ^a p = 0.000
	SIN S-9	1.503 ± 0.074	168	
CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO EN mg/mL	0.5	1.140 ± 0.037	56	Rho = 0.825 ^b p = 0.000
	1	1.296 ± 0.037	56	
	1.5	1.644 ± 0.037	56	
	2	2.476 ± 0.037	56	
	2.5	3.154 ± 0.037	56	
	3	3.896 ± 0.037	56	

En la Figura 1 se observa el análisis de regresión entre la concentración de los extractos de agua de ambos sitios y el IM, indicando que la concentración es directamente proporcional al IM. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.95$) permite inferir que la variabilidad observada en el índice de mutación depende en un 95% de la concentración de los extractos acuosos. El 5% restante, posiblemente depende de otros factores tales como el sitio de muestreo, de la cepa y de la activación metabólica.

Figura 1. Asociación lineal positiva entre la concentración de los extractos del afluente y la planta, y el promedio de los índices mutagénicos (IM) exhibidos por ambos sitios de muestreo.



3.2. Ensayo Cometa.

En la tabla 2, se resume el efecto genotóxico en linfocitos humanos por los extractos de agua de los dos sitios de muestreo, evaluado mediante el ensayo Cometa. El biomarcador de genotoxicidad es la “longitud de cola” en μm y entre mayor longitud más es el daño en el material genético. Mediante análisis de varianza factorial univariado, se detecta un débil incremento en la longitud de cola en los linfocitos tratados con el extracto del agua del afluente ($57.4 \pm 15.1 \mu\text{m}$) respecto de la longitud de cola de los linfocitos tratados con agua de la planta ($54.2 \pm 14.5 \mu\text{m}$); no obstante, la diferencia no alcanza a ser significativa al nivel del 5% ($p = 0.06$) (Ver tabla 2).

Tabla 2. Longitud de cola como resultado de la fragmentación del ADN, inducida por los extractos de los dos sitios de muestreo e interacción entre concentración y sitio de muestreo. También se observa la F y la p de ANOVA para cada caso.

Concentración (mg/mL)	Longitud de cola *X (µm) ± e. e.		Longitud en función de la concentración	
	Afluyente	Planta		
DMSO	31.1 ± 2.8	32.9 ± 2.8	32 ± 4.9	F= 53.8 p ^a = 0.00
0.5	48.9 ± 2.8	46.5 ± 2.8	47.7 ± 2.3	
0.75	58 ± 2.8	54.3 ± 2.8	56.1 ± 6.3	
1	59.5 ± 2.8	58.5 ± 2.8	59 ± 6.5	
1.25	70 ± 2.8	64.6 ± 2.8	67.3 ± 7.9	
1.5	75.8 ± 2.7	68.1 ± 2.8	72 ± 10.4	
Longitud en función del sitio	57.2 ± 15.1	54.2 ± 14.5	55.7 ± 14.8	
	F= 3.36; p ^b = 0.08		F= 0.71; p ^c = 0.6	

p^a= Significancia estadística al comparar las concentraciones.

p^b= Significancia estadística al comparar los sitios de muestreo.

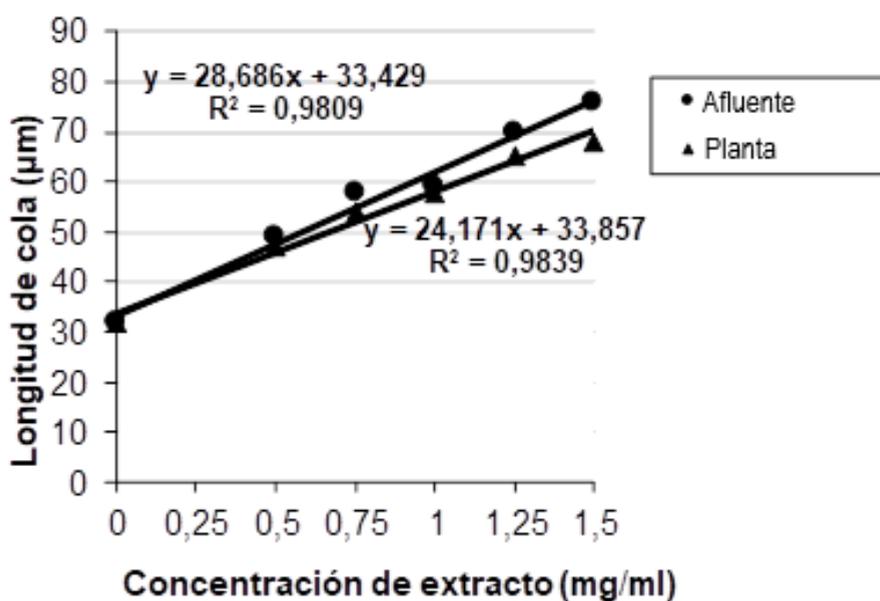
p^c= Significancia estadística de la interacción entre concentración y sitios de muestreo.

*Media ± error estándar (Tamaño de muestra)

En consecuencia, se puede afirmar que las aguas de ambos sitios se asemejan en función a la genotoxicidad. Cuando se comparan las medias de longitud de cola de las diferentes concentraciones, incluido el control negativo, se determina diferencia significativa de todas las concentraciones respecto al control negativo (F = 53.81; p < 0.05). La diferencia en el efecto genotóxico de los extractos de agua, resultó ser independiente del sitio de origen, pues la interacción entre los dos factores (sitio y concentración) no fue significativa estadísticamente (F = 0.71; p = 0.6). Ambos sitios de muestreo no presentaron diferencias significativas en función a la genotoxicidad (F = 3.36; p = 0.08). Mediante análisis de correlación y regresión se identificó una

asociación lineal positiva significativa estadísticamente (afluente: $r^2=0.98$, $p<0.05$; planta: $r^2=0.98$, $p<0.05$), entre la concentración de los extractos y la longitud de la cola de las 300 células evaluadas por cada concentración (figura 2). El coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que la variabilidad de la longitud de cola depende en un 98% de la concentración del extracto, para ambos sitios de muestreo.

Figura 2. Asociación lineal positiva entre longitud de cola y la concentración del extracto de dos sitios de muestreo: afluente y la planta, promediado a partir de 300 datos por cada concentración.



3.3. Ensayo de viabilidad celular mediante azul de tripan.

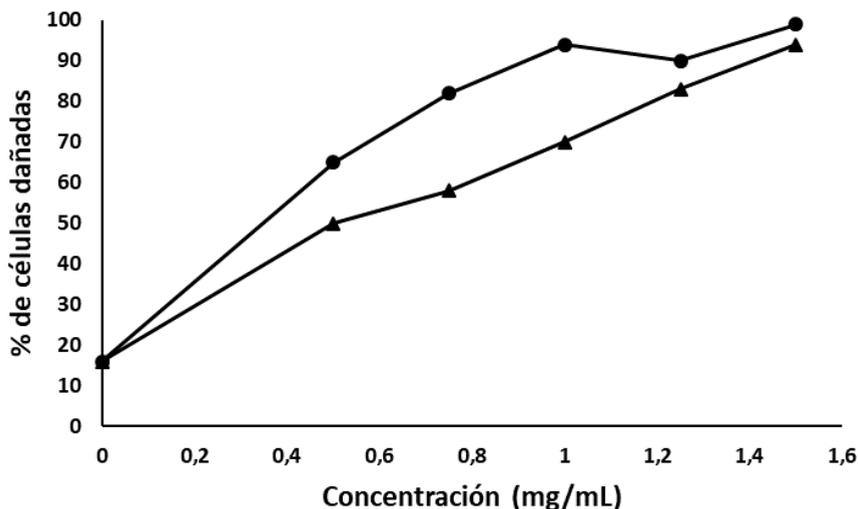
La viabilidad de los linfocitos humanos en el pre - tratamiento osciló entre 97 y 99%. En la tabla 3 y figuras 3 y 4, se presenta el porcentaje de viabilidad celular de los eritrocitos y el porcentaje de células dañadas (son las células con longitud de cola mayor al promedio del control) como resultado a más de una hora de exposición a los extractos de las aguas de ambos sitios. Se realizaron registros en 300 células por cada concentración, en cada sitio.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño en eritrocitos, inducido por los extractos de las aguas del afluente y de la planta a diferentes concentraciones evaluadas.

Sitio	Concentración (mg/ml)	% Viabilidad post-tratamiento	% de daño
Afluente	DMSO	96	16
	0.5	92	65
	0.75	87	82
	1	90	94
	1.25	86	90
	1.5	85	99
Planta	DMSO	96	16
	0.5	89	50
	0.75	85	58
	1	87	70
	1.25	85	83
	1.5	80	94

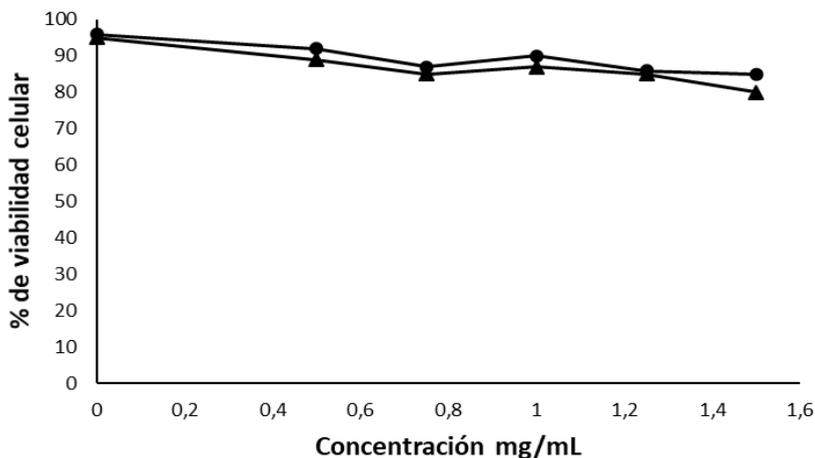
El porcentaje de células dañadas como consecuencia del efecto de los extractos de agua fue directamente proporcional a la concentración. De hecho en la figura 3, se puede observar un daño considerable a partir de las concentraciones más bajas para ambas muestras de agua. De manera general, las aguas del afluente mostraron un porcentaje de daño mayor en las concentraciones más bajas en comparación con las aguas de la planta. No obstante, en las concentraciones máximas de los extractos, el efecto genotóxico inducido por los dos sitios de muestreo es muy similar.

Figura 3. Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos por una hora a cinco concentraciones de los extractos de las aguas del afluente (●) y del agua cruda al entrar a la planta (▲).



La viabilidad de los linfocitos humanos post-tratamiento disminuyó en función del aumento de la concentración de los extractos de agua de ambos sitios de muestreo. Bajo la influencia de las aguas del afluente, la viabilidad disminuyó del 96% al 85% en forma dosis dependiente, mientras que las aguas de la planta disminuyeron la viabilidad desde el 96% hasta el 80% en la máxima concentración evaluada.

Figura 4. Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con cinco concentraciones de extractos de agua del afluyente (●) y de agua cruda al entrar a la planta (▲) mediante coloración con azul de tripan.



4. DISCUSIÓN.

Los estudios nacionales e internacionales sobre mutágenos en cuerpos de aguas contaminadas con residuos industriales, agroquímicos y aguas negras, demuestran una asociación lineal positiva entre el aumento de la concentración de los extractos de agua y el IM junto con la longitud de cola de los cometas [2, 26-29], en concordancia con nuestros resultados, en donde se evidenció un incremento del número de revertantes en las cepas TA 98 y TA 100 con y sin activación metabólica, mostrando predominancia de la actividad mutagénica en la TA98, debido a que la mayoría de las mezclas complejas ambientales a excepción del agua clorada, tienen mayor actividad en la cepa TA98 en comparación con la TA100 [30]. Diversos estudios han utilizado estas dos cepas para evaluar la mutagenicidad de distintas muestras complejas ambientales [31-34]

Los mayores valores de IM se evidenciaron en presencia de S9, indicando que estas aguas se encuentran influenciadas por desechos de zonas urbanas, zonas agrícolas e industriales (carpintería y bombas de gasolina), arrojando mutágenos al afluente y transportándolos hasta la planta. El agua de la planta mostró mayor efecto mutagénico que el agua del afluente. Este incremento en la mutagenicidad es debido a que en la planta se acumulan mutágenos provenientes del afluente y de otros cuerpos de agua que la surten. Según Vargas et al., [35], algunos mutágenos orgánicos polares desechados por las industrias, son transportados por el agua conservando sus características físicas y químicas.

La mayor actividad mutagénica observada en los dos sitios de muestreo fue de acción indirecta en presencia de enzimas metabólicas para ambas cepas analizadas, TA98 y TA100. Esto indica que en estas aguas hay mayor concentración de mutágenos indirectos ó sea que necesitan ser metabolizados para activarse y así poder interactuar con el ADN bacteriano. Entre estos compuestos, los más comunes que se han encontrado en estudios similares son: aminas heterocíclicas [36], hidrocarburos policíclicos aromáticos [37] y nitrosaminas [38]. Los mecanismos para que estos compuestos se activen son los siguientes: El primero es llevado a cabo por citocromo P450 (CYP1A2) y el segundo es llevado a cabo por o-acetyltransferasa y sulfotransferasa, ocasionando así especies altamente reactivas capaces de unirse al ADN [39, 40].

En este trabajo la mayor actividad mutagénica fue observada en la cepa TA98, la cual detecta mutágenos que actúan por pérdida y/o ganancia de bases. El incremento en el número de revertantes de esta cepa puede ser debido a la presencia de aminas heterocíclicas en estas aguas, ya que son mutágenos indirectos muy comunes en aguas negras residuales, que inducen mutación por pérdida o ganancia de bases [41]. Las aminas heterocíclicas son formadas en la costra quemada de alimentos proteicos fritos y asados [42] y pueden llegar a las aguas de los ríos por medio de la orina y heces fecales de las personas que las consumen. Las aminas más abundantes encontradas en los cuerpos de agua que presentan este tipo de contaminación son las arilaminas, las cuales son compuestos altamente mutagénicos y

eventualmente carcinogénicos [43]. Estas sustancias se encuentran generalmente en desechos industriales; que en el caso particular de las aguas de la planta y las del afluente, vienen en desechos de colorantes usados en la carpintería. Algunos colorantes, cuando son descargados dentro del río, pueden permanecer suspendidos en el agua o pueden ser absorbidos por el botón de sedimentos o bioconcentrados [44, 45].

Otros compuestos también son muy comunes en cuerpos de aguas tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), que provocan mutación por pérdida o ganancia de bases y son formados por la combustión incompleta de material orgánico [46]; pueden llegar a las aguas muestreadas por desechos industriales, residuos domiciliarios, lluvias, escorrentías o procesos atmosféricos [47, 48]. El benzo a pireno es uno de los HPA más comunes en el ambiente, ya sea libre o mezclado con otra sustancia [49] y por lo tanto uno de los más estudiados. El mecanismo de acción del benzo- a -pireno en la cepa TA 98 ha sido determinado [50] y consiste en una mutación inducida en una secuencia de bases repetidas consistente en la delección de bases (CG ó GC) en la secuencia CGCGCGCG.

La baja actividad mutagénica de la cepa TA100 con y sin activación metabólica, en comparación con la TA98, tanto en el afluente como en la planta, puede ser atribuido a varios procesos de interacción entre metabolitos y blancos genéticos en la cepa TA100 (*HisG46*, G-C) [51]. Las aguas estudiadas, son alimentadas principalmente con desechos domiciliarios y no han sido sometidas a procesos de cloración, por lo tanto, no hay productos de cloración como trihalometanos y furanonas, que son mutágenos que revierten la cepa TA100 [52].

En esta investigación se identificó una relación concentración-respuesta entre las concentraciones de los extractos de ambos sitios y la mutagenicidad (IM) y el daño genético (Longitud de cola). La asociación lineal positiva entre las concentraciones y los biomarcadores de mutagenicidad y genotoxicidad puede deberse a la sumatoria entre compuestos intrínsecos de cada extracto de agua como mezcla

compleja, que expresa las sumas de las respuestas mutagénicas con respecto al incremento proporcional de la concentración. Además, Taylor y colaboradores [53], afirmaron que las interacciones entre dos mutágenos similares no tienden a reaccionar entre sí por sus características electrofílicas, sino que reaccionan con otras moléculas presentes en el extracto, macromoléculas celulares o de la mezcla S9.

Los resultados del ensayo cometa, demuestran que los extractos acuosos del afluente y de la planta, inducen diferentes niveles de daño del ADN en linfocitos humanos. Generalmente, resultados así son relacionados con la presencia de mutágenos en el agua tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas y nitrosaminas, que forman aductos con el ADN [54-56], ocasionando sitiosapurínicos que fragmentan e incrementan la cola de los cometas [57].

Con respecto a la genotoxicidad los dos sitios, afluente y planta, no presentaron diferencia significativa estadísticamente, lo que sugiere que las sustancias genotóxicas que llegan a la planta son las mismas que aporta el afluente, omitiendo las contribuciones genotóxicas de otros afluentes y contrastando con los resultados obtenidos con la actividad mutagénica, en donde se observó que las aguas de la planta tenían un mayor efecto mutagénico en comparación con las del afluente. Se debe tener en cuenta que los principios fisiológicos y bioquímicos de ambos ensayos no son iguales, y que la tasa de revertancia en una célula procariota en función a un fenómeno de mutación, y la longitud de cola en una eucariota como resultado de un evento genotóxico, no deben ser necesariamente correlacionados, ya que un efecto genotóxico se origina primariamente y de no ser reparado se establece una mutación. De hecho, cada resultado del biomarcador obtenido es inherente al modelo biológico en el que se evalúa.

Además, no se puede ignorar que las aguas que llegan en la planta se encuentran represadas. Esto puede promover la sedimentación de algunas sustancias genotóxicas ya sea en forma libre o unidas al material orgánico tales como ácidos húmicos y fúlvicos [58], impidiendo así su solubilidad en las aguas superficiales de la planta que fue

en donde se tomó la muestra. La viabilidad disminuyó en presencia de los extractos de agua. Este efecto se debe a la presencia de varios contaminantes que pueden llegar a cuerpos de agua tales como pesticidas, metales, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros contaminantes orgánicos, los cuales tienen efectos tóxicos disminuyendo la viabilidad en varios tipos de células [59, 60].

CONCLUSIÓN

Con los resultados, se puede concluir que las aguas que llegan a la planta contienen mutágenos en su gran mayoría, aquellos que inducen pérdida o ganancia de bases en el ADN, y que además necesitan activación metabólica para su acción. De acuerdo a la literatura estos compuestos podrían ser hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas, ptalatos, y benzotriazoles, los cuales se han evidenciado estar presentes en aguas influenciadas por intervención antrópica. Las prácticas agrícolas, el estilo de vida y los procesos industriales de esta región colombiana, contribuyen a la contaminación de estos cuerpos de agua que surten una planta de potabilización de Medellín. Además, se evidenció que los compuestos que constituyen estas aguas, tienen la capacidad de interactuar con el ADN en linfocitos humanos, lo que indica que muchos de estos compuestos pueden ser potencialmente peligrosos.

Agradecimientos:

Agradecimientos a COLCIENCIAS, EPM, Aguas de Rionegro, CORNARE, Universidad de Antioquia. Agradecimientos a Silvio Carvajal por su asesoría estadística. Cómo no agradecer a nuestra maestra Margarita Zuleta, pionera de la mutagénesis en Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Muz, J. P. Dann, F. Jäger, W. Brack, and M. Krauss, "Identification of Mutagenic Aromatic Amines in River Samples with Industrial Wastewater Impact," (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 8, pp. 4681-4688, Apr 2017.
- [2] J. M. de Castro E Sousa *et al.*, "Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action," (in eng), *Environ Monit Assess*, vol. 189, no. 6, p. 301, Jun 2017.
- [3] Q. Zeng *et al.*, "Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays," (in eng), *J Hazard Mater*, vol. 296, pp. 23-9, Oct 2015.
- [4] X. Nie, W. Liu, L. Zhang, and Q. Liu, "Genotoxicity of drinking water treated with different disinfectants and effects of disinfection conditions detected by umu-test," (in eng), *J Environ Sci (China)*, vol. 56, pp. 36-44, Jun 2017.
- [5] M. Muz, M. Krauss, S. Kutsarova, T. Schulze, and W. Brack, "Mutagenicity in Surface Waters: Synergistic Effects of Carboline Alkaloids and Aromatic Amines," (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 3, pp. 1830-1839, Feb 2017.
- [6] P. J. Kerzic and R. D. Irons, "Distribution of chromosome breakpoints in benzene-exposed and unexposed AML patients," (in eng), *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 55, pp. 212-216, Oct 2017.
- [7] Y. J. Chang, C. Y. Tseng, P. Y. Lin, Y. C. Chuang, and M. W. Chao, "Acute exposure to DEHP metabolite, MEHP cause genotoxicity, mutagenesis and carcinogenicity in mammalian Chinese hamster ovary cells," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 3, pp. 336-345, Mar 2017.
- [8] P. D. Josephy, M. Zahid, J. Dhanoa, G. B. de Souza, H. Groom, and M. Lambie, "Potent mutagenicity in the Ames test of 2-cy-

- ano-4-nitroaniline and 2,6-dicyano-4-nitroaniline, components of disperse dyes,” (in eng), *Environ Mol Mutagen*, vol. 57, no. 1, pp. 10-6, Jan 2016.
- [9] N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Nagar, and M. K. Bijarnia, “Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): a case study,” (in eng), *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 61, no. 1, pp. 105-13, May 2005.
- [10] I. Briguglio *et al.*, “Benzotriazole: An overview on its versatile biological behavior,” (in eng), *Eur J Med Chem*, vol. 97, pp. 612-48, Jun 2015.
- [11] P. Viberg, K. G. Wahlund, and K. Skog, “On-line capillary based quantitative analysis of a heterocyclic amine in human urine,” (in eng), *J Chromatogr A*, vol. 1133, no. 1-2, pp. 347-52, Nov 2006.
- [12] M. A. Shabbir, A. Raza, F. M. Anjum, M. R. Khan, and H. A. Suleria, “Effect of thermal treatment on meat proteins with special reference to heterocyclic aromatic amines (HAAs),” (in eng), *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 55, no. 1, pp. 82-93, 2015.
- [13] E. M. John, M. C. Stern, R. Sinha, and J. Koo, “Meat consumption, cooking practices, meat mutagens, and risk of prostate cancer,” (in eng), *Nutr Cancer*, vol. 63, no. 4, pp. 525-37, 2011.
- [14] N. J. Gooderham, S. Creton, S. N. Lauber, and H. Zhu, “Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP,” (in eng), *Toxicol Lett*, vol. 168, no. 3, pp. 269-77, Feb 2007.
- [15] M. G. Knize and J. S. Felton, “Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat,” (in eng), *Nutr Rev*, vol. 63, no. 5, pp. 158-65, May 2005.
- [16] Y. Liu *et al.*, “Particulate matter, gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban traffic tunnel of China: Emission from on-road vehicles and gas-particle partitioning,” (in eng), *Chemosphere*, vol. 134, pp. 52-9, Sep 2015.

- [17] A. Hakura *et al.*, "Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors," (in eng), *Regul Toxicol Pharmacol*, vol. 37, no. 1, pp. 20-7, Feb 2003.
- [18] J. Yan, L. Wang, P. P. Fu, and H. Yu, "Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list," (in eng), *Mutat Res*, vol. 557, no. 1, pp. 99-108, Jan 2004.
- [19] S. A. Langie *et al.*, "Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 36 Suppl 1, pp. S61-88, Jun 2015.
- [20] L. D. Claxton, G. e. A. Umbuzeiro, and D. M. DeMarini, "The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century," (in eng), *Environ Health Perspect*, vol. 118, no. 11, pp. 1515-22, Nov 2010.
- [21] "Standard methods for the examination of water and wastewater," vol. 19th ed. American Public Health Association, , ed. Washington, DC, 8/27-8/32,, 1995.
- [22] D. M. Maron and B. N. Ames, "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test," (in eng), *Mutat Res*, vol. 113, no. 3-4, pp. 173-215, May 1983.
- [23] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 175, no. 1, pp. 184-91, Mar 1988.
- [24] A. Azqueta and A. R. Collins, "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair," (in eng), *Arch Toxicol*, vol. 87, no. 6, pp. 949-68, Jun 2013.
- [25] P. Rajaguru, L. Vidya, B. Baskarasethupathi, P. A. Kumar, M. Palanivel, and K. Kalaiselvi, "Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay," (in eng), *Mutat Res*, vol. 517, no. 1-2, pp. 29-37, May 2002.

- [26] B. C. Manzano, M. M. Roberto, M. M. Hoshina, A. A. Menegário, and M. A. Marin-Morales, "Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells," (in eng), *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 22, no. 2, pp. 1399-407, Jan 2015.
- [27] E. Bianchi *et al.*, "Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil," (in eng), *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 72, no. 3, pp. 321-334, Apr 2017.
- [28] N. J. Batista *et al.*, "Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities," (in eng), *Chemosphere*, vol. 164, pp. 134-141, Dec 2016.
- [29] J. C. Sierra, N. Benitez, E. Bravo, A. Soto, and F. Larmat, "Evaluation of the mutagenic activity of waters collected from the cauca river in the city of Cali, Colombia by using the salmonella/microsome assay," *Revista de Ciencias, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Universidad del Valle*, vol. 16, pp. 131-143, 2012.
- [30] D. M. DeMarini, "Induction of mutation spectra by complex mixtures: approaches, problems, and possibilities," *Environmental health perspectives*, vol. 102, no. Suppl 4, p. 127, 1994.
- [31] A. T. Lemos, D. P. Rosa, J. A. Rocha, and V. M. Vargas, "Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources," (in eng), *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 72, no. 8, pp. 2058-65, Nov 2009.
- [32] S. Tabrez and M. Ahmad, "Mutagenicity of industrial wastewaters collected from two different stations in northern India," (in eng), *J Appl Toxicol*, vol. 31, no. 8, pp. 783-9, Nov 2011.
- [33] D. Balabanič, M. Filipič, A. Krivograd Klemenčič, and B. Žegura, "Raw and biologically treated paper mill wastewater effluents and the recipient surface waters: Cytotoxic and genotoxic

- activity and the presence of endocrine disrupting compounds,” (in eng), *Sci Total Environ*, vol. 574, pp. 78-89, Jan 2017.
- [34] J. Oñate, A. Arenas, A. Ruiz, K. Rivera, and C. Peláez, “Evaluation of Mutagenic and Genotoxic Activity in Vinasses Subjected to Different Treatments,” *Water Air Soil Pollut*, vol. 226, pp. 144-154, 2015.
- [35] V. M. Vargas *et al.*, “Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 490, no. 2, pp. 141-58, Feb 2001.
- [36] M. A. D. Silveira, D. L. Ribeiro, G. M. Vieira, N. R. Demarco, and L. P. G. d’Arce, “Direct and Indirect Anthropogenic Contamination in Water Sources: Evaluation of Chromosomal Stability and Cytotoxicity Using the *Allium cepa* Test,” (in eng), *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 100, no. 2, pp. 216-220, Feb 2018.
- [37] C. M. Gallampo, E. L. Schymanski, M. Krauss, N. Ulrich, M. Bataineh, and W. Brack, “Multicriteria approach to select polyaromatic river mutagen candidates,” (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 49, no. 5, pp. 2959-68, Mar 2015.
- [38] X. Wang, Z. Liu, C. Wang, Z. Ying, W. Fan, and W. Yang, “Occurrence and formation potential of nitrosamines in river water and ground water along the Songhua River, China,” (in eng), *J Environ Sci (China)*, vol. 50, pp. 65-71, Dec 2016.
- [39] M. Stiborová *et al.*, “Cytochrome b5 increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases,” (in eng), *Chem Res Toxicol*, vol. 25, no. 5, pp. 1075-85, May 2012.
- [40] F. P. Guengerich, “Cytochrome p450 and chemical toxicology,” (in eng), *Chem Res Toxicol*, vol. 21, no. 1, pp. 70-83, Jan 2008.

- [41] I. Shamovsky *et al.*, “Explanation for main features of structure-genotoxicity relationships of aromatic amines by theoretical studies of their activation pathways in CYP1A2,” (in eng), *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 40, pp. 16168-85, Oct 2011.
- [42] W. Pfau, K. Rosenfold, and J. F. Young, “Formation of mutagenic heterocyclic aromatic amines in fried pork from Duroc and Landrace pigs upon feed supplementation with creatine monohydrate,” (in eng), *Food Chem Toxicol*, vol. 44, no. 12, pp. 2086-91, Dec 2006.
- [43] L. Peng and R. J. Turesky, “Capturing labile sulfenamide and sulfinamide serum albumin adducts of carcinogenic arylamines by chemical oxidation,” (in eng), *Anal Chem*, vol. 85, no. 2, pp. 1065-72, Jan 2013.
- [44] R. O. Alves de Lima, A. P. Bazo, D. M. Salvadori, C. M. Rech, D. de Palma Oliveira, and G. de Aragão Umbuzeiro, “Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 626, no. 1-2, pp. 53-60, Jan 2007.
- [45] G. e. A. Umbuzeiro, D. A. Roubicek, C. M. Rech, M. I. Sato, and L. D. Claxton, “Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures,” (in eng), *Chemosphere*, vol. 54, no. 11, pp. 1589-97, Mar 2004.
- [46] K. H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. Brown, “A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects,” (in eng), *Environ Int*, vol. 60, pp. 71-80, Oct 2013.
- [47] J. Li, X. Shang, Z. Zhao, R. L. Tanguay, Q. Dong, and C. Huang, “Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil, and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China,” (in eng), *J Hazard Mater*, vol. 173, no. 1-3, pp. 75-81, Jan 2010.
- [48] Zuleta M, Uribe Y, Valencia C, Vargas H, Orozco L Y, and L. C., “Contribución de la contaminación y cloración en la mu-

tagenicidad, genotoxocidad y presencia de mutágenos en agua potable,” *actualidades biológicas*, vol. 26, no. 81, pp. 125-136, 2004.

- [49] K. Krishnamurthi, S. S. Devi, and T. Chakrabarti, “The Genotoxicity of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Containing Sludge Samples,” (in eng), *Toxicol Mech Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 1-12, 2007.
- [50] D. A. Bell, Levine, J.G., and D. M. DeMarini, “DNA sequence analysis of revertants of the *hisD3052* allele of *Salmonella typhimurium* TA98 using the polymerase chain reaction and direct sequencing: Application to 1-nitropyrene-induced revertants,” *Mutation Research*, vol. 252, pp. 23-44, 1991.
- [51] D. E. Levin, Yamasaki, E., and B. N. Ames, “A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens : A run of cytosines as a mutational hot-spot,” *Mutation Research*, vol. 94, no. 2, pp. 315-330, 1982.
- [52] L. Sujbert, G. Rácz, B. Szende, H. C. Schröder, W. E. G Müller, and G. Török, “Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test,” (in eng), *Toxicology*, vol. 219, no. 1-3, pp. 106-12, Feb 2006.
- [53] M. S. Taylor, R. W. Setzer, and D. M. DeMarini, “Examination of the additivity assumption using the spiral and standard *Salmonella* assays to evaluate binary combinations of mutagens,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 335, no. 1, pp. 1-14, Aug 1995.
- [54] F. Henkler, K. Stolpmann, and A. Luch, “Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses,” (in eng), *EXS*, vol. 101, pp. 107-31, 2012.
- [55] M. Bellamri, L. Le Hegarat, L. Vernhet, G. Baffet, R. J. Turesky, and S. Langouët, “Human T lymphocytes bioactivate heterocyclic aromatic amines by forming DNA adducts,” (in eng), *Environ Mol Mutagen*, vol. 57, no. 9, pp. 656-667, 12 2016.

- [56] L. A. Peterson, "Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines," (in eng), *J Nucleic Acids*, vol. 2010, Sep 2010.
- [57] A. R. Collins, "Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1840, no. 2, pp. 794-800, Feb 2014.
- [58] M. Kutlu, G. Aydoğan, F. Susuz, and A. Ozata, "The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey," (in eng), *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 17, no. 2, pp. 111-6, Jun 2004.
- [59] N. Cedergreen, "Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96580, 2014.
- [60] P. Myllynen, T. Kurttila, L. Vaskivuo, and K. Vähäkangas, "DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833," (in eng), *Toxicol Lett*, vol. 169, no. 1, pp. 3-12, Feb 2007.

INTERACCIONES INTERMOLECULARES DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA Arf*GTP CON POTASIO Y GLICEROL, COMPONENTES MAYORITARIOS DE LA VINAZA DE CAÑA DE AZÚCAR

Fernando Bonilla Millán

Jhon Alexander Rodríguez Estrada

Oscar Eduardo Rojas Álvarez

Abstract: The sugarcane vinasse, being a residue produced in high quantities derived from the industrial processes of Ethanol production, is a mix of compound that has a cyclical utility for soil matrices due to its natural and industrial composition that fall on the advantages and disadvantages of your applications. Potassium and glycerol, major compounds in their composition, are ligands that help the formation of protein complexes with vinasse to have alternatives in industrial uses as additives for animal feed and fertilizers in soil matrices, many of these, used in crops from the same industries. Computational chemistry studies allow us to know intermolecular properties between vinasse, glycerol and potassium by means of stable molecular interactions, making it a useful tool for evaluating said properties and determining new alternatives for industrial uses of this waste. In this research, the dynamics of the intermolecular interactions between the three-dimensional protein model extracted from the protein database (PDB) file of the model (2KSQ), consists of a membrane protein from the *E. coli* called

Arf * GTP, with two ligands as potassium and glycerol by molecular dynamics using a software called Scalable Molecular Dynamics by its acronym in English, NAMD¹. The intermolecular interactions were observed and evaluated by software called Molecular Dynamics Viewer (VMD) of the modeled molecule of the Arf * GTP membrane protein with major components, such as potassium and glycerol in an environment definite and implicit solvate of water box model (TIP3) in order to identify and characterize intermolecular forces, trajectory equilibrium, atomic fluctuations, affinities, rate constants and interactions Arf * GTP-Potassium, Arf * GTP-Glycerol and Arf * GTP-Potassium-Glycerol in the context of industrial uses of vinasse as animal feed and fertilizers. Finally, it was observed that the three Arf * GTP complexes are favored by positional affinities of the ligands as the amino acids GLN 155, for the case of potassium, and for the glycerols were GLY 27 and LYS 127, as well as shielding of some atoms of the amino acids with the ligands. With this research, we seek to have more information about the intermolecular interactions and constants of speed, balance of trajectories and chemical affinities of the Arf * GTP membrane protein with other organic or inorganic ligands that provide new industrial alternatives for the use of vinasse from sugar cane.

Keywords: Molecular dynamics; NAMD, VMD, BLAST, Computational Chemistry, CHARMM.

Resumen: La vinaza de caña de azúcar, al ser un residuo producido en altas cantidades derivado de los procesos industriales para la producción de Etanol, es una mezcla de compuestos que tiene una utilidad cíclica para matrices de suelos debido a su composición natural e industrial que recaen en las ventajas y desventajas de sus aplicaciones. El potasio y el glicerol, compuestos mayoritarios en su composición, son ligandos que ayudan a la conformación de complejos proteicos con la vinaza para tener alternativas en los usos industriales como aditivos para alimento animal y fertilizantes en matrices de suelos, muchos de estos, utilizados en cultivos de las mismas industrias. Estudios de química computacional permiten conocer propiedades intermoleculares entre la vinaza, el glicerol y el potasio mediante in-

teracciones moleculares estables convirtiéndola en una herramienta útil de evaluación de dichas propiedades y determinación de nuevas alternativas para usos industriales de este residuo. En esta investigación, se evaluó la dinámica de las interacciones intermoleculares entre el modelo proteínico tridimensional extraído del archivo de la base de datos de proteínas (PDB) por sus siglas en inglés, del modelo (2KSQ), el cual consiste en una proteína de membrana de la *E. coli* llamado Arf*GTP, con dos ligandos como potasio y glicerol mediante dinámica molecular utilizando un software llamado Dinámica Molecular Escalable por sus siglas en inglés, NAMD¹. Se observaron y evaluaron las interacciones intermoleculares por medio del software llamado Visor de Dinámica Molecular por sus siglas en inglés, VMD² de la molécula modelada de la proteína de membrana Arf*GTP con componentes mayoritarios, tales como, el potasio y el glicerol en un ambiente solvatado definido e implícito de modelo de caja de agua (TIP3) con el fin de identificar y caracterizar las fuerzas intermoleculares, equilibrio en trayectorias, fluctuaciones atómicas, afinidades, constantes de velocidad e interacciones Arf*GTP-Potasio, Arf*GTP-Glicerol y Arf*GTP-Potasio-Glicerol en el contexto de usos industriales de la vinaza como alimento animal y fertilizantes. Finalmente, se observó que los tres complejos Arf*GTP se ven favorecidos por afinidades posicionales de los ligandos como los aminoácidos GLN 155, para el caso del potasio, y para los gliceroles lo fueron GLY 27 y LYS 127, como también, apantallamientos de algunos átomos de los aminoácidos con los ligandos. Con esta investigación, se busca tener más información acerca de las interacciones intermoleculares y constantes de velocidad, equilibrio de trayectorias y afinidades químicas de la proteína de membrana Arf*GTP con otros ligandos orgánicos e inorgánicos que aporten nuevas alternativas industriales para el uso de la vinaza de caña de azúcar.

Palabras clave: Dinámica molecular; NAMD, VMD, BLAST, Química Computacional, CHARMM.

1. INTRODUCCIÓN

La vinaza es el residuo líquido que se produce después de la fermentación y destilación del mosto de la caña de azúcar. Es de color café oscuro, con un alto contenido de materia orgánica, de naturaleza ácida y de olor característico que se destacan por presentar ácidos orgánicos, levaduras, vitaminas y minerales [11], además, contiene poli y oligosacáridos resistentes que pueden provocar una respuesta positiva en los animales [6]. La súper producción de alcohol carburante en Colombia, ligada a la Ley 693 de 2001 [7] y la resolución 41072 del 30 de Septiembre de 2015 del Ministerio de Minas y Energía [8], actualmente permite verter al medio ambiente aproximadamente 13.365 millones de litros por día de vinaza de caña de azúcar como subproducto de la industria alcohólica y azucarera; gran parte de esta cifra está siendo usada controladamente en la producción de 800 Toneladas diarias de compost por la industria agrícola como agente fertilizante y remediador del pH en suelos de cultivo [9], generando una producción elevada de vinaza. Sin embargo, no existen muchas investigaciones recientes que ayuden a conocer nuevos usos industriales de la vinaza que permita darle utilidad a la gran cantidad producida por las grandes maquinarias alcohólicas de Colombia. El potasio y el glicerol son componentes, en mayor proporción en la composición natural de la vinaza, poseen propiedades químicas que permiten un buen acoplamiento con estructuras orgánicas generando reacciones estables efectuadas en procesos industriales e implementados en suelos, matrices poliméricas, estructuras biológicas y químicas.

Herramientas como VMD (Visual Molecular Dynamic) y NAMD (Scalable Molecular Dynamic) son útiles para conocer desde el punto de vista molecular las reacciones que puede tener la vinaza con otros compuestos evitando resultados no esperados, como subproductos o alteraciones de propiedades químicas, y así enfocar los esfuerzos en objetivos determinados para la creación de complejos útiles para su implementación en campos investigativos e industriales aliviando la acumulación de la vinaza producida y permitiendo tener nuevas alternativas para su disposición. Se han registrado estudios sobre el uso de la proteína de membrana como zona de trabajo para interacciones in-

termoleculares [21] y como complejo para modelamiento y dinámica molecular que han mostrado una buena estabilidad del complejo para la aplicación de dinámicas moleculares a condiciones determinadas, tales como temperatura, tiempo, medio de solvatación implícito, etc.

Este trabajo de investigación aporta resultados para identificar principalmente las características de las interacciones intermoleculares de una proteína de membrana, con potasio y glicerol, de esta manera obtener conocimientos en afinidad atómica, equilibrio de trayectorias, fuerzas de enlace presentes y constantes de velocidad a nivel molecular, que podrían aportar nuevas alternativas industriales para los componentes de la vinaza.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

VMD (Visual Molecular Dynamics) es una interfaz gráfica que en conjunto con una interfaz de cómputo puede realizar y mostrar simulaciones a nivel atómico. VMD está escrito en C++ con la librería gráfica de OpenGL. A pesar de que existe gran cantidad de software de visualización molecular, VMD tiene dos grandes ventajas: Permite el uso de ejecución archivos de comandos, lo cual economiza una cantidad importante de tiempo y su interfaz de selección (átomos, moléculas, aminoácidos) y representación (esferas, barras, superficie, volumen, carga, entre otras), características que la sitúan como una de las más completas y útiles.

El visor molecular funciona de forma armónica con el software de simulación NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics); este es el encargado de realizar los cálculos teóricos/experimentales en los cuales se basa el modelo de estudio de las dinámicas moleculares y la química computacional.

NAMD (Scalable Molecular Dynamics) fue desarrollado en la Universidad de Illinois por una colaboración de los grupos investigativos Theoretical and Computational Biophysics Group (TCB) y Parallel Programming Laboratory (PPL), escrito en Charmm++ (un lenguaje

de programación basado en C++ y que permite la ejecución de tareas o cálculos en paralelo).

$$m_{\alpha} \ddot{r}^{\alpha} = -\partial \partial r^{\alpha} U_{total}(r^{\alpha} 1, r^{\alpha} 2, \dots, r^{\alpha} N), \quad (1)$$

$$\alpha=1, 2 \dots N$$

Tenemos entonces en (1) un ejemplo de cómo se calcularía el movimiento de los átomos de un biopolímero de acuerdo a la ecuación newtoniana de movimiento, donde m_{α} es la masa del átomo α , r^{α} es su posición y U_{total} es la energía potencial total que depende de la posición de todos los átomos, la cual acopla entonces el movimiento de estos. Es entonces el cálculo de la energía potencial el punto crucial de esta ecuación puesto que debe reflejar fielmente la interacción entre átomos y ser calculada rápidamente.

Para mecánicas de sistemas que no están en equilibrio, en el cálculo de (1) deberá añadirse el cálculo de fuerzas de fricción y fluctuación dentro del cálculo del Force Field (campo de fuerza, es decir, energía).

2.1. Funciones de campos de fuerza.

Para una simulación de todos los átomos, se asume que cada átomo experimenta una fuerza especificada por un campo de fuerza modelo que toma las interacciones de ese átomo con el resto del sistema. Estos modelos presentan hoy en día una buena distribución entre precisión y eficiencia en cómputo. Una función de energía potencial común en NAMD es (2)

$$U_{total} = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{Coulomb}. \quad (2)$$

Donde los primeros tres términos representan estiramiento del enlace, “bending” o doblamiento e interacciones torsionales de enlace, siendo:

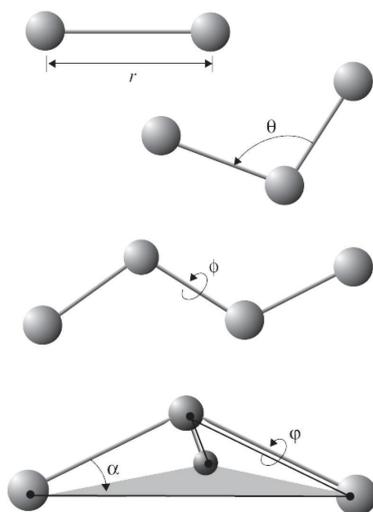
$$U_{bond} = \sum_{bondsi} k_{bondi} (r_i - r_{0i})^2 \quad (3)$$

$$U_{angle} = \sum_{anglei} k_{anglei} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \quad (4)$$

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedrali} k_{dihei} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)] \quad (5)$$

Donde *bonds* cuenta cada enlace covalente del sistema, *angles* son los ángulos entre cada par de enlace covalente que comparten un solo átomo en el vértice y *dihedral* describe pares de átomos separados por exactamente tres enlaces covalentes con el átomo central sujeto a la torsión de ángulo ϕ (figura 5)[13] [19].

Figura 5. Interacciones de enlace de campo de fuerza de arriba hacia abajo: estiramiento, ángulo (bending), ϕ ángulo diedro y ángulo diedro impropio. Extraído de: Scarable Molecular Dynamics with NAMD; 2005.



Los últimos dos términos de (2) corresponden a las interacciones de pares de átomos no enlazados, Fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas:

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j > i} 4\epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/r_{ij})^6] \quad (6)$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j > i} q_i q_j / (4\pi \epsilon_0 r_{ij}) \quad (7)$$

Para cada partícula en un contexto de enlaces dado, los parámetros k_{bondi} , r_{0i} , etc, para las interacciones dadas en (3) – (5) están dados en un archivo de parámetros de campo de fuerza (disponible en la página de los desarrolladores de Charmm++ y VMD/NAMD). Estos parámetros son una tarea significativa y son desarrollados medi-

ante métodos teóricos (cálculos de mecánica cuántica y mediciones experimentales (cristalografías, espectros de resonancia, infrarrojo, entre otros). Estos parámetros son comparados con parámetros de moléculas sencillas que están muy bien definidos, luego evaluados a nivel termodinámico para verificar que cumplen con las propiedades teóricas y experimentales de la molécula.

Las dinámicas fueron ejecutadas mediante dos grandes herramientas matemáticas que facilitan su estudio matemático y reducen el tiempo de cómputo significativamente. Dado que se simularon las interacciones de una proteína contenida en la *saccharomyces cerevisiae* con una cantidad determinada de ligandos, para evitar que efectos de superficie ocurran en los límites de la caja de estudio se utilizan condiciones de barrera periódica (PBC). En las PBC, la caja de estudio es replicada infinitas veces por traslaciones periódicas, de modo tal que si una partícula se “sale” de la caja en un lado es reemplazada por una copia que entra a la caja del lado contrario; como cada partícula está sujeta al potencial de todas las demás partículas en el sistema (incluyendo imágenes en las cajas contiguas) se elimina el posible efecto de superficie. De acuerdo a lo anterior y dado que las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas ((6) y (7)) existen entre cada par de átomos no enlazados, calcular las interacciones de semejantes distancias con exactitud es improbable. Para realizar estos cálculos en NAMD y VMD se toma entonces dos variables importantes: la *distancia de cambio* (switchdist) y el *punto de corte* (cut-off); estas variables se encargan de permitir al usuario determinar hasta qué distancia va a considerar para evaluar estas interacciones.

Para una simulación con PBC, la periodicidad del sistema se utiliza para calcular las interacciones (sin cut-off ni switchdist) electrostáticas completas con un costo de cómputo muy bajo, utilizando el método de sumatoria de Mesh Ewald llamado Particle-mesh Ewald (PME) en química computacional [13] [19].

La sumatoria de Ewald es una descripción matemática de las interacciones electrostáticas de rango largo para un sistema de espacio limitado con PBC. La suma infinita de las interacciones carga-carga para un sistema carga-neutro es condicionalmente convergente

(es decir, el resultado de la sumatoria depende del orden en que se realice), donde se realiza el cálculo así: primero se suma cada caja, luego se suman esferas de cajas de radio creciente. La sumatoria de Ewald utiliza los siguientes términos:

$$E_{\text{Ewald}} = E_{\text{dir}} + E_{\text{rec}} + E_{\text{self}} + E_{\text{Surface}} \quad (8)$$

$$E_{\text{dir}} = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N q_i q_j \sum_{\vec{n}_r} \frac{\text{erfe}(\beta |\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{n}_r|)}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{n}_r|} - \sum_{i,j \in \text{Excluded}} \frac{q_i q_j}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{v}_{ij}|} \quad (9)$$

$$E_{\text{rec}} = \frac{1}{2\pi V} \sum_{\vec{m} \neq 0} \frac{\exp\left(\pi^2 \frac{|\vec{m}|^2}{\beta^2}\right)}{|\vec{m}|^2} \left| \sum_{i=1}^N q_i \exp(2\pi i \vec{m} \cdot \vec{r}_i) \right| \quad (10)$$

$$E_{\text{self}} = -\frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_{i=1}^N q_i^2 \quad (11)$$

$$E_{\text{surface}} = \frac{2\pi}{(2\epsilon_s + 1)V} \left| \sum_{i=1}^N q_i \vec{r}_i \right| \quad (12)$$

Aca, q_i y \vec{r}_i son la carga y posición del átomo i respectivamente, y \vec{n}_r es el vector de red. Para una caja arbitraria definida por tres vectores base independientes $\vec{\alpha}_1, \vec{\alpha}_2, \vec{\alpha}_3$, se define $\vec{n}_r = n_1 \vec{\alpha}_1 + n_2 \vec{\alpha}_2 + n_3 \vec{\alpha}_3$, donde n_1, n_2 and n_3 son integrales. Σ' denota una sumatoria sobre \vec{n}_r que excluye $\vec{n}_r = 0$ para $i = j$; "Excluded" denota el set de pares de átomos a los que las interacciones electrostáticas directas deberán ser excluidas. \vec{v}_{ij} es el vector de red para el par (i, j) que minimiza $|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{v}_{ij}|$. β es un parámetro que ajusta la distribución de carga de trabajo para sumas directas y recíprocas. ϵ_s es la constante dieléctrica del espacio alrededor de la caja, que generalmente es agua (para sistemas de biomoléculas). V es el volumen de la caja de simulación. \vec{m} es el vector recíproco definido como $\vec{m} = m_1 \vec{b}_1 + m_2 \vec{b}_2 + m_3 \vec{b}_3$, donde m_1, m_2, m_3 son integrales y los vectores base recíprocos $\vec{b}_1, \vec{b}_2, \vec{b}_3$ están definidos de modo que:

$$\vec{a} \cdot \vec{b}_\beta = \delta_{\alpha\beta}, \alpha, \beta = 1, 2, 3 \quad (13)$$

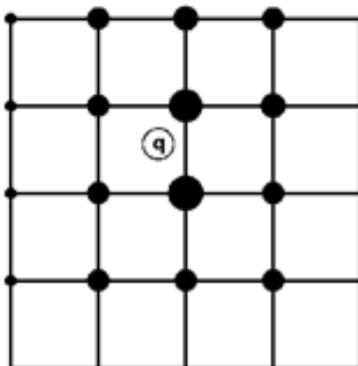
La función de error complementaria (erfc(x)) en (9) es

$$\text{erfc}(x) = 2\pi \int_0^\infty x e^{-t^2} dt. \quad (14)$$

La sumatoria de Ewald en (8) tiene cuatro términos: Sumatoria directa E_{sum} , sumatoria recíproca E_{rec} , energía propia E_{self} y energía superficial E_{surface} . El parámetro β cambia la carga computacional entre la sumatoria directa y la sumatoria recíproca [13] [19].

Para el análisis de la sumatoria de Ewald, el sistema realiza generalmente la sumatoria directa con menor carga operacional que la sumatoria recíproca, esta última es calculada mediante una transformada de Fourier hecha por el sistema luego de realizar una aproximación para delegar la computación a un modelo de malla. Esto se realiza mediante la distribución de las cargas ubicadas en cualquier punto del espacio a nodos en una malla tridimensional uniforme (ver figura 6).

Figura 6. Ejemplo 2D de la distribución de carga q (círculo blanco) entre los nodos uniformes de la malla generada. Extraído de: Scalable Molecular Dynamics with NAMD; 2005.



2.2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

El Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) localiza regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara para este caso secuencias de proteínas a bases de datos de secuencia y evalúa la significación estadística comparativa. BLAST se puede utilizar para deducir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a reconocer los miembros de las familias de genes.

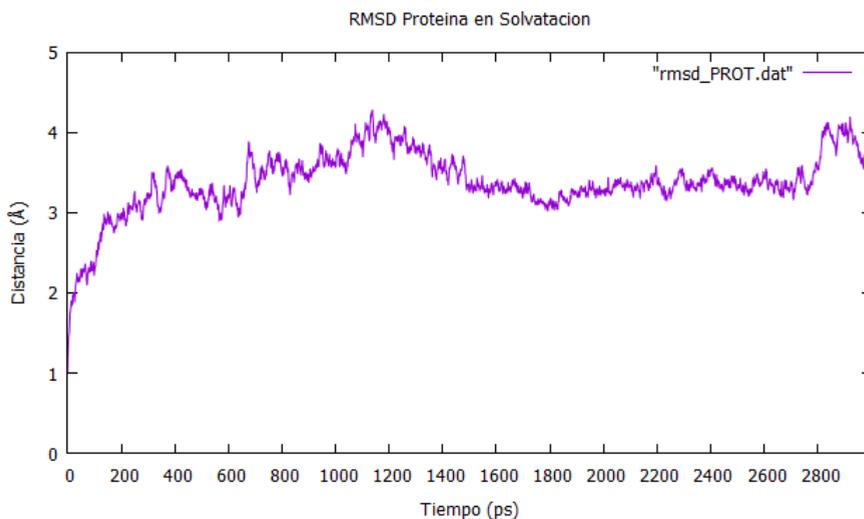
Específicamente, en la similitud de aminoácidos, el programa BLAST representa la similitud entre los aminoácidos como un \log^2 del radio de probabilidades, también conocida como “lod score”. Para derivar el lod score de un aminoácido, se debe tomar el \log^2 de la relación entre la frecuencia observada de una pareja, dividida por la frecuencia esperada al azar del emparejamiento. Si las frecuencias observadas y esperadas son iguales, la puntuación lod es cero. Una puntuación positiva indica que un par de letras es común, mientras que una puntuación negativa indica una pareja improbable.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una validación estructural a partir de archivos estructurales de los ligandos (Glicerol y potasio) y proteína cristalizados y disponibles en la base de datos mundial RCSB Protein Data Bank 10.1038/nsmb.1853 [13]. Dado que la proteína poseía en su conformación ligandos orgánicos que no son de interés para esta investigación (puntualmente, residuos OXT: Oxígeno adicionado a un aminoácido, GTP: molécula energética que no permanecerá luego de la apoptosis y MTN: metanosulfonotioato, un marcador proteínico) se remodeló la proteína retirando los 3 ligandos orgánicos que poseía y asumiendo la posición donde se encontraban como sitios de interés para el análisis de las posibles interacciones. Para la generación de un ambiente cercano al *in vivo* se sometió la proteína junto con los ligandos a condiciones de solvente explícito (agua) en base a un modelo que evalúa las energías de distribución de cargas parciales y permanentes en los 3 átomos del agua, teniendo en cuenta factores como la polarización y efectos inductivos electrostáticos y repulsivos, siendo nombrado en la investigación como el complejo.

En el apartado correspondiente a la adecuación de parámetros y pretratamiento sistemático de las condiciones, se corrigió en base a la topología y los scripts [14] de uso libre provistos por los desarrolladores de las herramientas computacionales (VMD, NAMD) [1] [2]. Los parámetros usados de energías, movimientos permitidos de ángulos, torsiones, enlace, fuerzas, constantes para el estudio del comportamiento de enlaces (mediante mecánica clásica, se tratan como resortes) y campos de fuerza permitieron desarrollar una simulación que otorga un acercamiento particular al estudio de la naturaleza de las interacciones ligando-proteína, para el sistema se asumió una temperatura de 310 K (37°C), con el fin de evidenciar el posible efecto de la deformación de la proteína sobre las interacciones intermoleculares. La estabilidad inicial y final, al igual que a lo largo de toda la dinámica se mostró como la desviación estándar de la proteína modelada en solvatación (figura 7), así:

Figura 7. RMSD (Root Mean Squared Deviation, o Raíz de Desviación Estándar Cuadrada) de la proteína solvatada con respecto al tiempo. Siendo el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X.

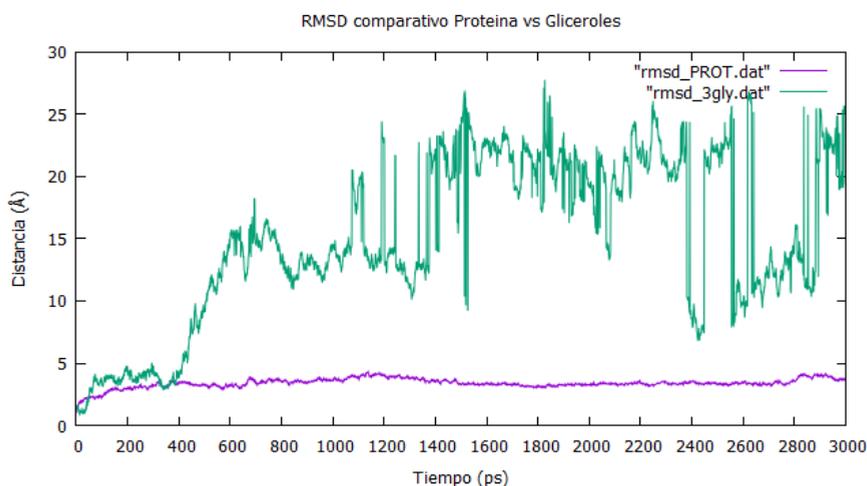


En la figura 7 se observó un claro desplazamiento desde la posición inicial proteínica de hasta 4 Å, aun así, el modelado es viable para la realización de las simulaciones puesto que la desviación particular de los

aminoácidos y átomos de la proteína (no su movimiento como macromolécula) presentan variaciones pequeñas (con respecto al promedio de la línea en la figura 7, se apreció una variación del orden de los $\pm 0,3$ Å), lo cual aseguró que el re modelamiento realizado fue correcto.

Se procedió entonces a evaluar el comportamiento de las desviaciones para los ligandos glicerol (Figura 8) y potasio (Figura 9). Debido a que las figuras 8 y 9 presentan las desviaciones tanto de la proteína como de los tres ligandos (3 gliceroles ubicados en los sitios de interés, luego, 3 potasios ubicados en los sitios de interés) durante la dinámica no se puede observar interacciones por atracción dado el movimiento que tiene el complejo en el medio de solvatación, la no interacción con los ligandos puede deberse a apantallamientos de átomos de los aminoácidos y propiamente el ligando correspondiente (potasio), o, impedimentos estéricos o de posición de átomos del ligando con respecto a los de sus aminoácidos más cercanos (para el caso del glicerol), por lo que es preciso observar en detalle las interacciones de la proteína con cada uno de los ligandos.

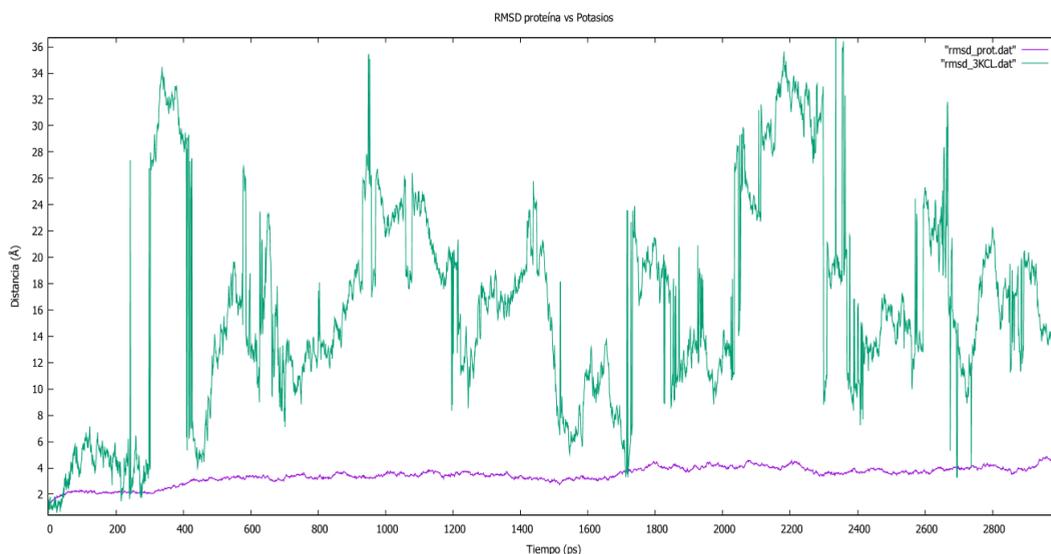
Figura 8. Comparativo: RMSD de Proteína (curva *rmsd_PROT.dat*) y RMSD de los 3 gliceroles (curva *rmsd_3gly.dat*) respecto al tiempo. En este gráfico, se tiene en el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X. La curva superior corresponde al RMSD (Root Mean Squared Desviation) de los ligandos y la curva inferior al RMSD de la proteína.



Debido a que el gráfico presenta las desviaciones tanto de la proteína como de los tres ligandos durante la dinámica no se pudieron observar interacciones positivas por el movimiento que tiene el complejo en el medio de solvatación, quizás, la no interacciones con los ligandos pueden estar arraigadas con apantallamientos de aminoácidos y propiamente el ligando correspondiente, o, una eclipsación de la posición de átomos del ligando con respecto a los de sus aminoácidos más cercanos o en interacción que más adelante se evaluarán, por lo que es preciso, observar en detalle las interacciones de la proteína con cada uno de los ligandos.

Además, se observó las desviaciones de la proteína en interacción con sales de KCl con respecto a la proteína en el siguiente gráfico:

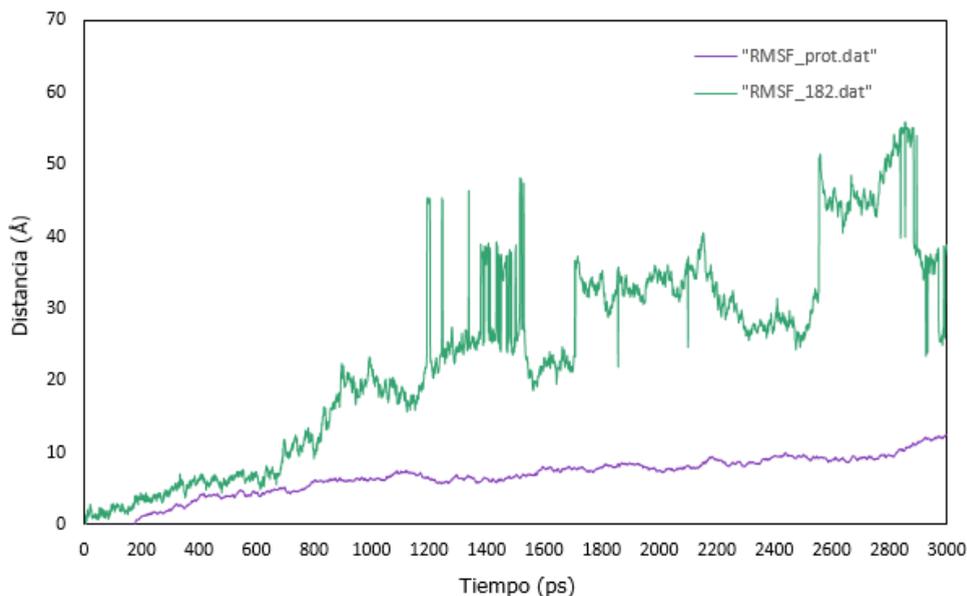
Figura 9. RMSD de la proteína (rmsd_prot.dat) vs RMSD de los ligandos potasio (rmsd_3KCL.dat) con respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps), donde la curva superior representa los ligandos y la curva inferior representa la proteína. La curva de RMSD de la proteína nos muestra su alta estabilidad ante las perturbaciones que podría provocar la aplicación de energía al sistema y la presencia de los potasios, mientras que la curva de los potasios demuestra una tendencia a NO estar dentro de la zona de interacción (atracción).



Para el estudio particular de los fenómenos de interacción se tomaron los nombres MGLY y POT para los ligandos glicerol y potasio respectivamente, seguido del número que lo identifica dentro del sistema (MGLY182, MGLY183 y MGLY184 y POT1, POT2 y POT3) A continuación se muestra la evaluación particular de los ligandos en interacción con la proteína solvatada partiendo de las fluctuaciones atómicas que se presentaron durante la dinámica con glicerol y potasio respectivamente. Se divide entonces el estudio de las interacciones en dos partes: inicialmente se evalúan las pertenecientes a los gliceroles y posteriormente las interacciones de potasio. Dado que el complejo (proteína y ligandos) empieza centrado en la caja de agua de estudio y a medida que avanza la dinámica éste complejo se desplaza dentro de la caja, los datos del análisis de la raíz del cuadrado de la desviación o RMSD por sus siglas en inglés (los cuales comparan la media de la desviación con respecto a la ubicación espacial) no son adecuados para realizar un estudio suficientemente preciso, por lo cual se usaron los datos del análisis de la raíz del cuadrado de las fluctuaciones o RMSF por sus siglas en inglés (Root Mean Square Fluctuations), donde se toma la media de la desviación con respecto a la posición promedio del sistema a lo largo del tiempo, para evaluar las interacciones. Se presentan entonces los gráficos del Root Mean Squared Fluctuations (RMSF) de los ligandos de glicerol con respecto a la proteína, partiendo, del ligando llamado MGLY 182 (figura 10), así:

Figura 10. RMSF comparativo del ligando MGLY 182 (curva RMSF_182.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) con respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando MGLY 182 y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).

RMSF comparativo Proteína vs Residuo MGLY 182

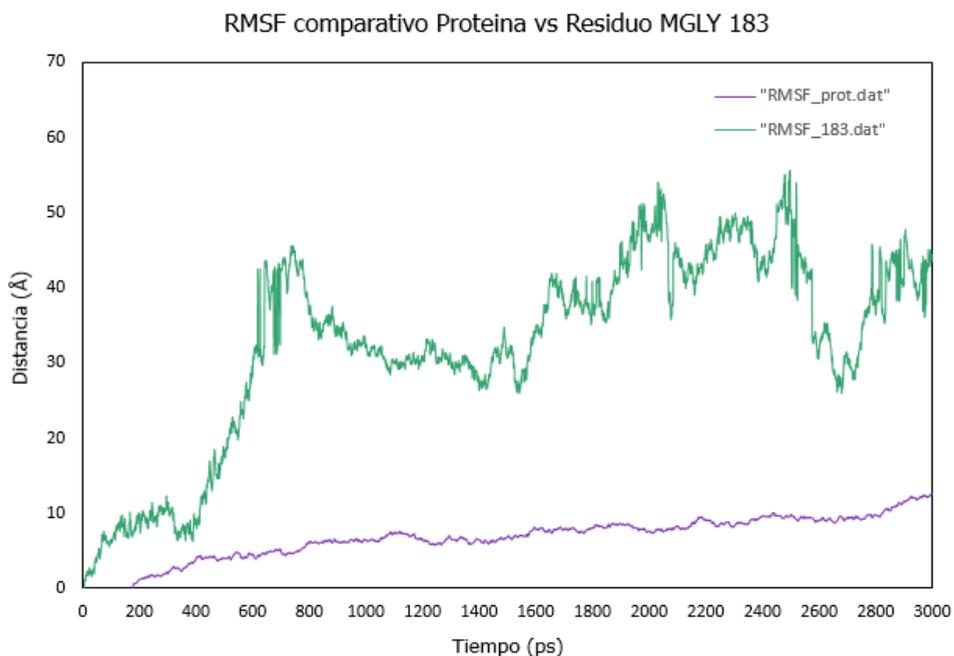


La figura 10 mostró una estabilidad de interacción dentro de los 700 ps entre el ligando y la proteína, posteriormente se notó una perturbación de la estabilidad en la interacción demarcada por algún impedimento estérico posible por las posiciones de los aminoácidos con respecto al movimiento del ligando, la cual, se presenta a lo largo de la dinámica, debido a, que las distancias de interacciones de interés (de efecto atrayente o repulsivo, como dipolo-dipolo, dipolo permanente, ion-dipolo, dipolo instantáneo-dipolo) se establecieron que fueran de 2 a 4 ångströms. Para los casos particulares del estudio (potasio y glicerol) se eligieron las interacciones mediante dipolo-dipolo (puentes de hidrógeno) para el glicerol y ion-dipolo para el potasio.

Considerando las fluctuaciones del primer residuo de glicerol, también, se realizó el gráfico del segundo ligando orientado con respec-

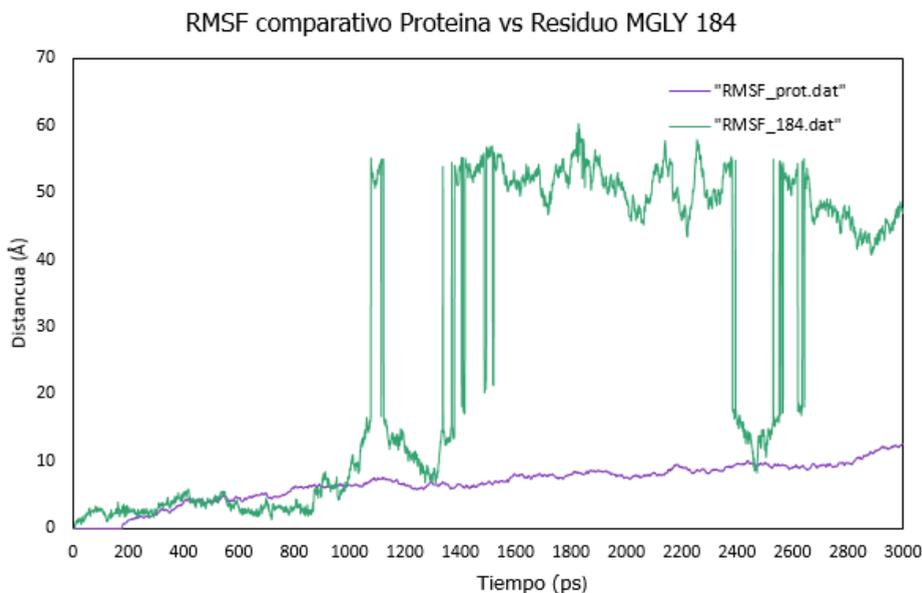
to a la proteína durante la dinámica correspondiente al MGLY 183 (figura 11), así:

Figura 11. RMSF comparativo del ligando MGLY 183 (curva RMSF_183.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).



Ahora bien la figura 11 mostró un comportamiento de interacción del ligando MGLY 183 con la proteína en 400 ps pero cambió su comportamiento de no interacción posiblemente por impedimentos estéricos determinados. Como se observa al comparar la figura 7.(a) con las figuras 4 y 5, en el momento en que se da la deformación se pierde la afinidad entre el ligando glicerol y la proteína. Finalmente, se realizó la evaluación de las fluctuaciones atómicas del tercer ligando de glicerol, MGLY 184, con respecto a la proteína durante la dinámica (figura 12), así:

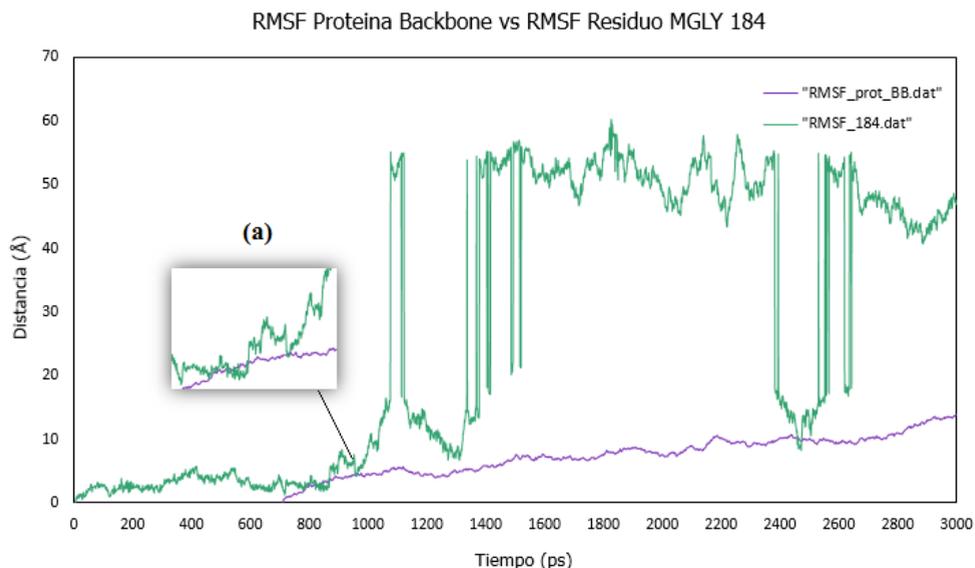
Figura 12. RMSF comparativo del ligando MGLY 184 (curva RMSF_184.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).



Para la figura 12 se observó una mayor estabilidad de interacción entre el ligando y la proteína en varios puntos de interés presentes (principalmente hidrógenos y oxígenos cercanos en el punto de interés, con los cuales el glicerol formará seguramente puentes de hidrógeno a lo largo de la dinámica incidiendo en la posibilidad de ser el ligando que mayor interacción presenta y la posibilidad de estar relacionada con un aminoácido o varios aminoácidos afines con las fluctuaciones atómicas que presenta. El estudio del comportamiento de este ligando tiene entonces mayor importancia dentro de la investigación, debido a que existen aminoácidos de interés en la zona de posicionamiento dentro de la proteína que permitan ser un punto de partida para encontrar grupos que ayuden a la estabilidad molecular del complejo con los ligandos. Para confirmar que un efecto de impedimento espacial se estaba presentando se tomó la información

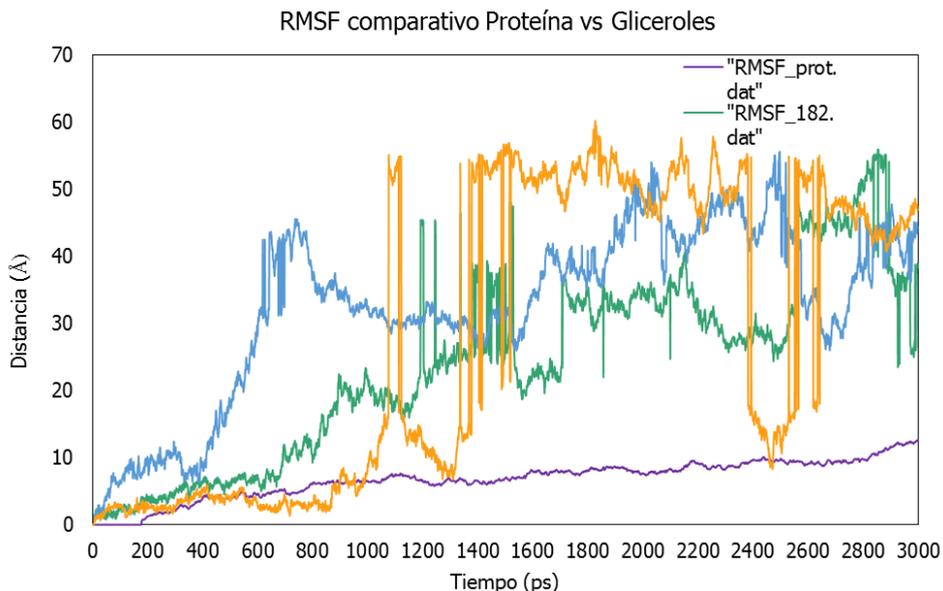
de los movimientos del esqueleto (Backbone) o estructura primaria de la proteína para evaluar sus fluctuaciones, además de la evidencia de deformación tridimensional vista en la figura 13. Al generarse la deformación de la proteína durante la dinámica se creó una baja disponibilidad de espacio para el ligando ocasionando que este último se alejara del punto de acción y de interacción reflejando los cambios repentinos de distancia en el gráfico 6, de igual manera, se mostró en la figura 21 (a) el deformamiento de la proteína y el momento preciso en donde se generó el impedimento estérico sobre el ligando.

Figura 13. Comparativo de la raíz de las fluctuaciones cuadradas promedio del ligando MGLY 184 (curva RMSF_184.dat) y de la estructura primaria de la proteína (RMSF_prot_BB.dat), Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps). (a). Momento de deformación de la proteína y alejamiento de ligando por impedimento estérico formado.



Finalmente, se realizó un gráfico comparativo del RMSF de los tres ligandos de glicerol con la proteína respecto al tiempo mostrando las fluctuaciones atómicas y las estabildades de los ligandos en conjunto con la proteína dentro del complejo (figura 14).

Figura 14. RMSF comparativo de los tres ligandos de glicerol. La curva de menor fluctuación es la proteína representando las distancias en ångströms en el eje Y y el tiempo en picosegundos en el eje X. La tendencia particular de los ligandos siendo el ligando 184 el más estable en fluctuación con la proteína.



Como se observó en las interacciones de los tres ligandos con la proteína en función del tiempo de la dinámica, existen fluctuaciones marcadas que representan una alta afinidad de algunos de los ligando con respecto a la estabilidad de la proteína dentro de la dinámica. Sin embargo, se observó algunas perturbaciones por parte de los ligandos, como el MGLY 184 y 183, que mostraron que los aminoácidos presentes dentro del punto de acción y que interactuaron con estos residuos tenían un comportamiento repulsivo debido por al-

gún posicionamiento o rotación de los mismos creando un impedimento estérico que causó este fenómeno representado en el gráfico de fluctuaciones atómicas (RMSF) y en las desviaciones (RMSD). A continuación se evalúan los gráficos e interacciones de ligandos de potasio con respecto a la proteína.

Se le asignó entonces los nombres de POTASIO 1, POTASIO 2 y POTASIO 3 a los iones ubicados en las zonas de interés y se realizó el estudio de sus comportamientos particulares para entender correctamente la naturaleza de las interacciones y los aminoácidos responsables. A lo largo de los 3000 ps de simulación, solo en los primeros 200 ps y alrededor de los 1700 ps se ve que los ligandos tienden a acercarse en dirección de la cadena proteínica pero rápidamente vuelven a recuperar su comportamiento de repulsión. Como se puede apreciar en la figura 15, el comportamiento de la fluctuación del potasio 1 es altamente inestable y tiende a alejarse fuertemente de su posición inicial, es decir, tiende a ser empujado fuera de su punto de equilibrio. La proteína contiene en su superficie bastantes puntos de interés teórico para una especie electropositiva como el potasio, pero se evidenció que a pesar que la posición inicial del potasio 1 era menor a 3 Å con respecto a un oxígeno (alta electronegatividad y un radio de enlace significativo) y a otros átomos que deberían influir positivamente en fenómenos de atracción (como nitrógenos, que no interactúan directamente por hacer parte de la estructura principal de la proteína, pero su nube electrónica es considerable y puede generar momentos de atracción por efectos ion-dipolo o dipolo-dipolo, dipolo-dipolo instantáneo para el glicerol), el potasio fue fuertemente alejado del sitio de interés.

Figura 15. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 1. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 1 se pueden ver claramente 2 puntos de interés en la curva; inicialmente fluctúa hasta casi los 14 ångströms y alrededor de los 360 ps ocurre un desplazamiento significativo, Esta perturbación se ve fuertemente marcada durante casi la mitad de la dinámica (entre 400 y 1400 ps); otro punto de interés es entre los 1400 y casi 2300 ps, donde se ve una fluctuación no tan pronunciada como la anterior. El fenómeno de perturbación observado a partir de los 2400 ps no es de interés puesto que no depende de algún efecto directo ocasionado por la proteína o algún contraión.

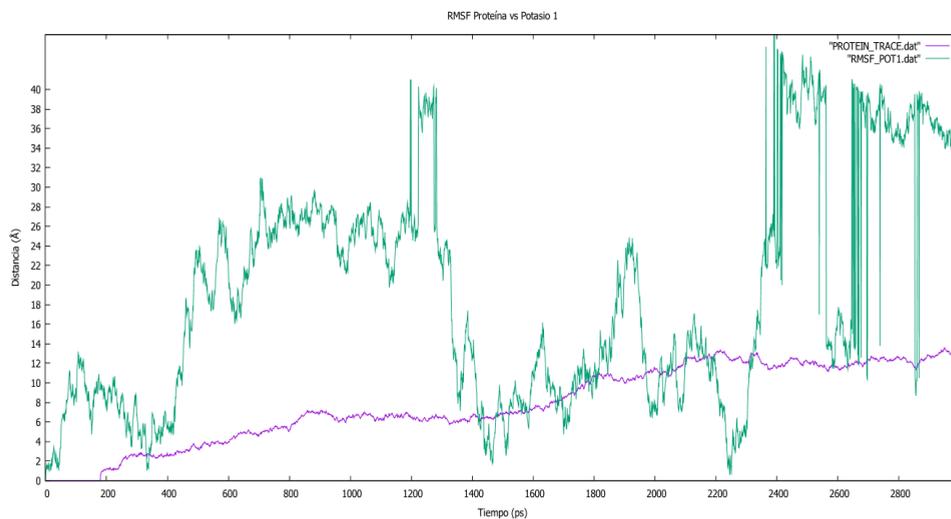


Figura 16. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 2. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 2 se pueden ver claramente 3 puntos de interés en la curva; inicialmente presenta fluctuaciones que lo alejan de la zona de interés (210ps a 230 ps), de ahí mantiene un comportamiento parecido al potasio 1 durante toda la dinámica; entre los 722 ps y 740 ps se ve una marcada reducción por poco tiempo de las fluctuaciones y el otro punto de interés es entre los 2360 ps y 2450 ps, donde se ve una reducción de las fluctuaciones.

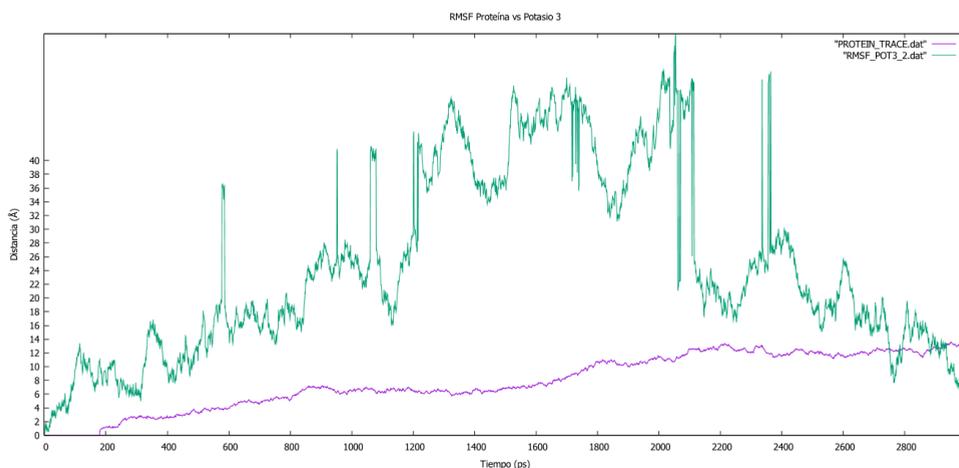


Figura 17. Comparativo del RMSF de la proteína con los potasios 1, 2 y 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína. Se evidencia la tendencia particular y con respecto a los otros potasios de alejarse de su posición inicial y vibrar libremente dentro de la caja de estudio.

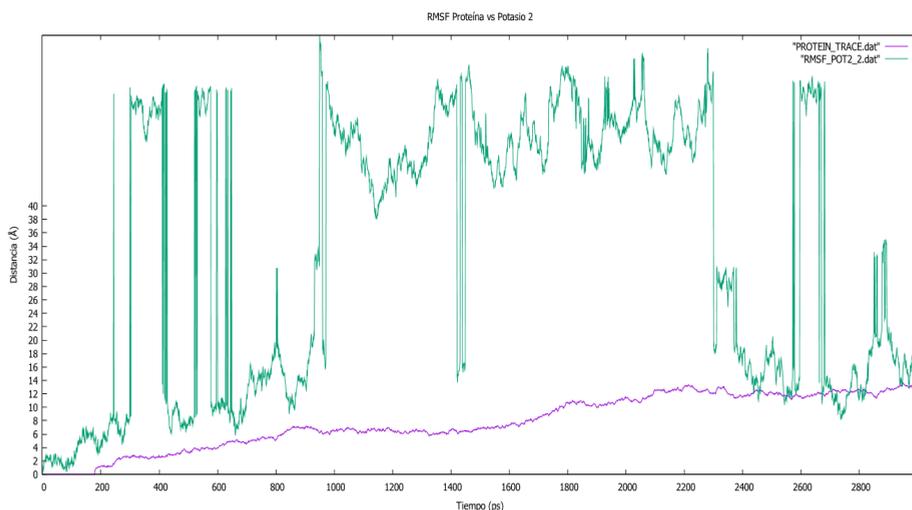
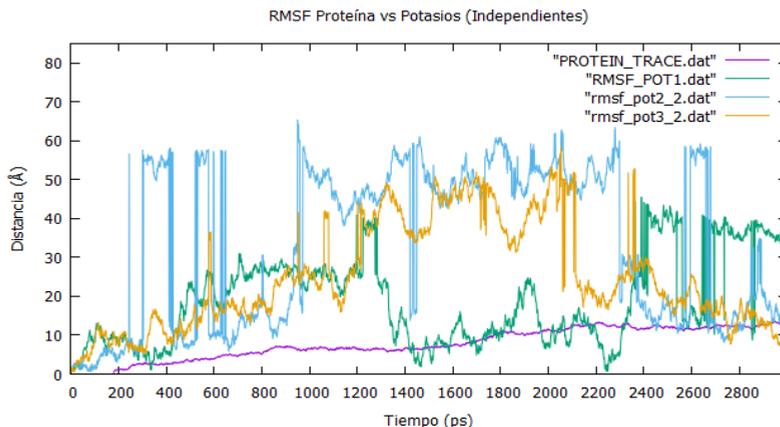
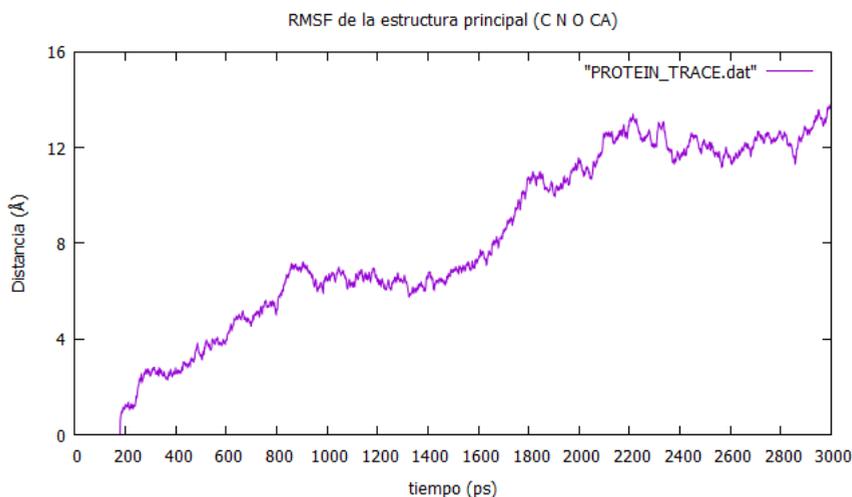


Figura 18. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 3 se puede ver claramente una total separación sin tendencia a acercarse a la proteína; se evaluaron entonces las condiciones iniciales (tiempo 0), identificando los posibles aminoácidos responsables de la repulsión y el tiempo alrededor de 2700 ps, donde las fluctuaciones decrecen de manera considerable.



En la figura 19, superponiendo los RMSF individuales de los tres potasio contra el RMSF de la proteína hay un comportamiento similar dentro de la primera parte de la dinámica, es decir, dado el reordenamiento de mínimo de energía, la temperatura suministrada y los efectos de las posibles especies cercanas, la estructura tridimensional de la proteína seguramente dificulta la presencia de interacciones atractivas entre las especies electronegativas (sean oxígenos terminales de ácidos, nitrógenos, efectos electrónicos atrayentes por anillos aromáticos, interacciones ion-dipolo y demás). Como se vio en la figura 13, la tendencia de la proteína a deformarse levemente es causante directo del efecto sobre las interacciones de moléculas o iones que sobre ella se pudiesen alojar, incluidas especies con alta capacidad de formar puentes como el glicerol, los cuales, a pesar de realizar interacciones atractivas mediante puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, dipolo – dipolo instantáneo, entre otras, por la misma deformación de la proteína (la cual confiere un impedimento estérico para orientarse de manera efectiva para realizar interacciones más estables) termina eventualmente alejándose de los sitios de interés.

Figura 19. RMSF del esqueleto proteínico respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia en ångströms; en el eje X el tiempo en picosegundos. Considerando solamente el movimiento de los átomos Carbono, Oxígeno y Nitrógeno de la estructura principal de la proteína, se ve cómo tendió a modificar su estructura tridimensional debido al efecto de la energía aplicada en forma de calor.

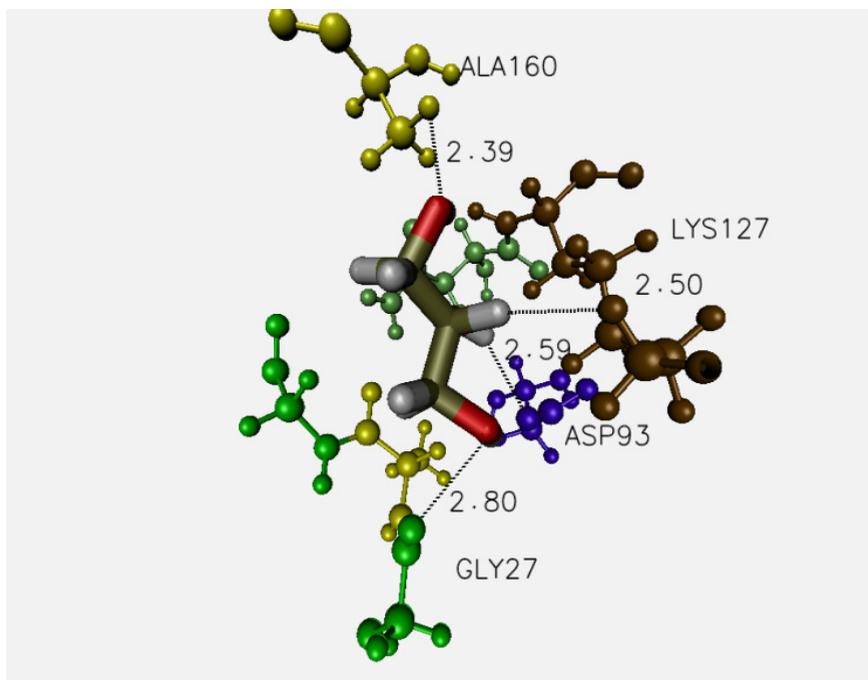


Con base en la información que se obtuvo de los gráficos para los ligandos de las fluctuaciones uno con respecto a la proteína se encontró que el ligando MGLY 184 tuvo mucha mayor interacción en cuanto a estabilidad molecular en varios momentos de la dinámica (ver figura 12), se evidenció de igual manera que a pesar de que los potasios están a una distancia significativa de átomos y puntos superficiales con cargas parciales atractivas (electronegativos) el ion tiende a alejarse de la proteína. Durante la dinámica se encontraron varios puntos de interés junto con las condiciones iniciales, los cuales se representaron con las figuras que ilustran los tiempos de interacción por parte del ligando con la proteína, las distancias en \AA entre los aminoácidos más cercanos en el punto de acción y al aminoácido de mayor afinidad con el ligando dentro del punto de acción de la proteína para el potasio y el glicerol por igual.

3.1. Caracterización de las interacciones del glicerol con la proteína.

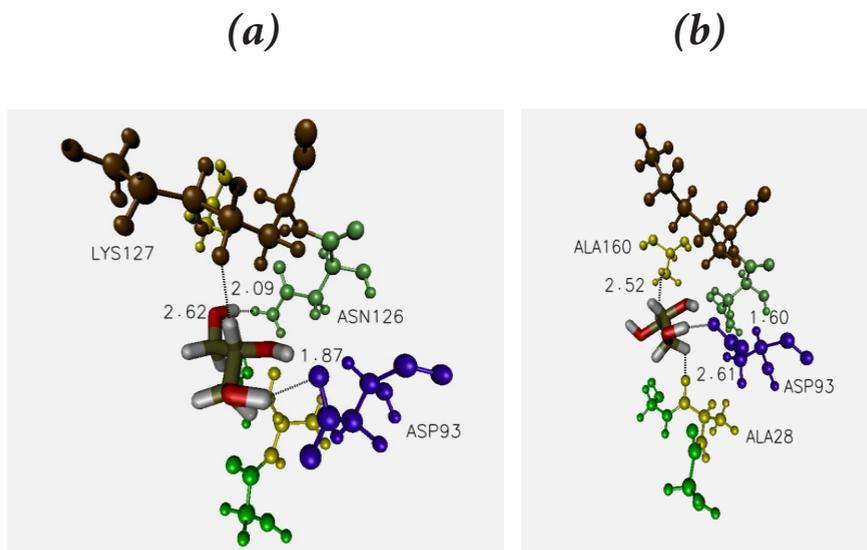
Después de analizar en detalle las fluctuaciones atómicas de los ligandos de glicerol y potasio con respecto a la proteína, se realizaron en primer lugar las caracterizaciones de las interacciones de los aminoácidos presentes en la proteína en el punto de acción dentro de la proteína con el ligando que tuvo mayor estabilidad observada en su RMSF, por lo que, se tomaron puntos de referencia en la dinámica que mostraron interacción del ligando y la proteína de acuerdo a lo reflejado en la figura 12, ya que, al ser las fluctuaciones atómicas son una medida más precisa de lo que sucedió durante la dinámica y del comportamiento de los átomos de ambas moléculas en tiempos determinados. Los 4 puntos específicos de análisis, de acuerdo a, la condición inicial, un momento anterior a la interacción y otro posterior a la misma con respecto al tiempo durante la dinámica, así:

Figura 20. Condición inicial del ligando MGLY 184 interacción a tiempo 0. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



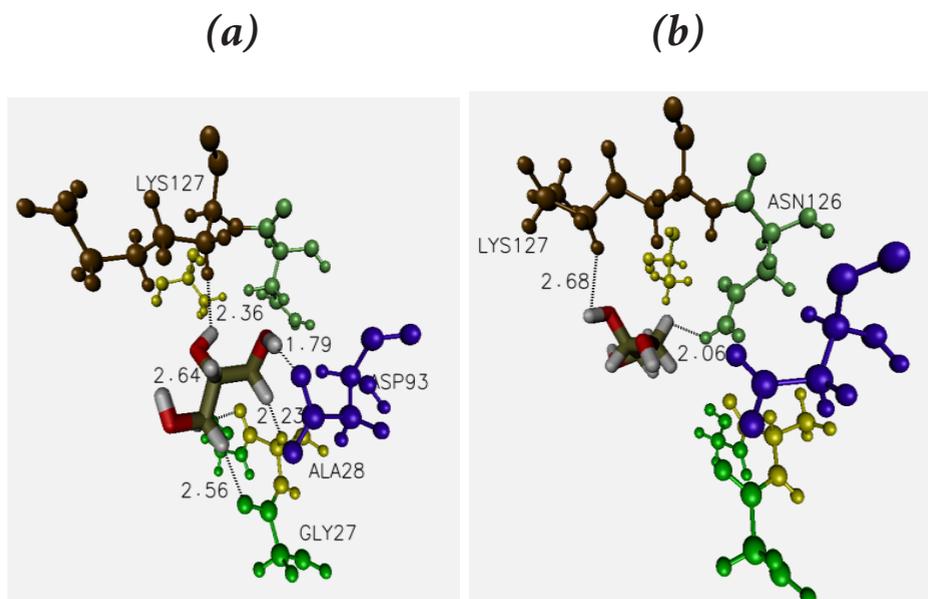
La posición inicial del ligando MGLY 184 a distancias determinadas con respecto a los aminoácidos presentes en los puntos de acción de la proteína es la primera pauta para observar una estabilidad apropiada durante la dinámica. Las distancias que se determinaron para la interacción fueron entre 2 a 4 \AA asegurando el radio mínimo de enlace de las fuerzas de Van Der Waals y el radio atómico de los oxígenos e hidrógenos que interactúan con el ligando por las fuerzas de puentes de hidrógeno o enlaces O-H [20].

Figura 21. (a). Interacción a 400 ps y (b). A 600 ps teniendo 3 aminoácidos cercanos en distancias apropiadas. En el centro se encuentra el ligando (MGLY 184) en interacción y distancias apropiadas con respecto a sus aminoácidos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Durante la dinámica, específicamente a los 400 ps, se observó una estabilidad continua entre los ligandos y aminoácidos generando una interacción apropiada en estos primeros momentos de la dinámica, siendo ASP más afín con el ligando con una distancia de 1.83 Å. De acuerdo a la figura 12, se observó una estabilidad frecuente durante los primeros pasos de la dinámica, de misma forma, en los 600 ps se observó la estabilidad del ligando con la proteína en interacción determinada por las distancias apropiadas con una continua afinidad del aminoácido ASP con distancia de 1.60 Å con la proteína. Es decir, se encontró que entre el aminoácido ASP y el ligando glicerol 184 hay alta afinidad (un hidrógeno más del glicerol se encuentran orientados hacia la posición del ASP, LYS y ASN). Se puede entonces concluir que la estabilidad observada en la figura 12 de la interacción entre el ligando y la proteína se debe en gran medida a la formación de enlaces de Hidrógenos (puentes de Hidrógeno) los cuales son de característica dipolo-dipolo que se pueden llegar a presentar durante la dinámica.

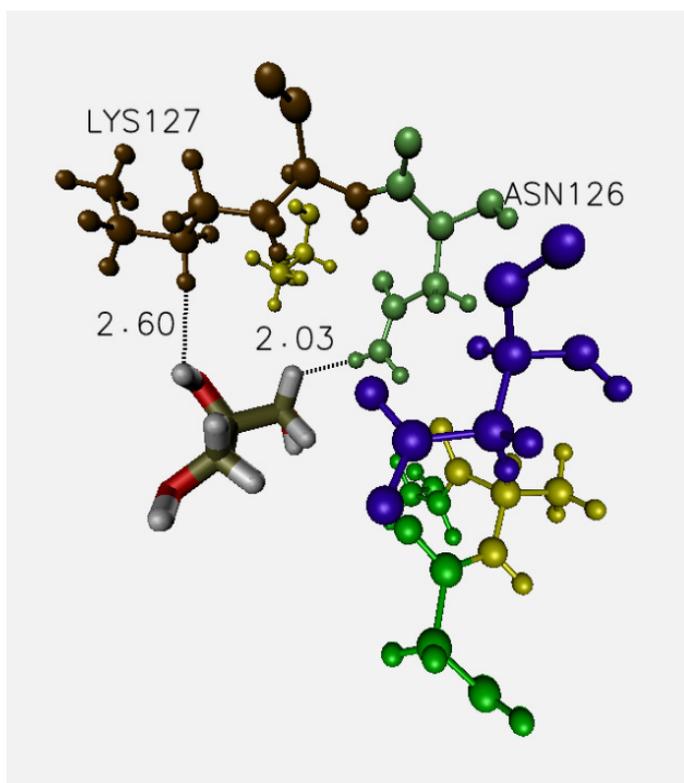
Figura 22. (a). interacción a 700 ps con una particular cercanía con el ASP y (b). Interacción a 866 ps con solo dos aminoácidos cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Los acercamientos del ligando con sus aminoácidos cercanos en los 700 ps se observó una acercamiento acorde al radio atómico del oxígeno presente en el aminoácido ASP93 (ácido aspártico) que permite observar una afinidad mayor con dicho aminoácido y que se representó en el RMSF del gráfico 6, mientras que, a 866 ps se observó solamente dos interacciones con LYS127 (Lisina) y el ASN126 (Asparagina) dentro de las distancias determinadas, donde, pierde las demás interacciones con los otros aminoácidos ya que la proteína en su movimiento en la dinámica genera una deformación de su estructuras laterales que alejó el ligando por motivo del impedimento estérico que se formó. Sin embargo, a pesar de estas perturbaciones notorias en la dinámica del ligando MGLY 184 se pudo apreciar que hay un acercamiento a 1.79 ångströms (Å) de un hidrógeno del glicerol con el oxígeno del residuo ASP93, lo cual, entre el residuo ASP93 y el ligando glicerol 184 existe alta afinidad (un hidrógeno más del

glicerol se encuentran orientados hacia la posición del ASN126 y con los hidrógenos terminales del aminoácido LYS127). Se concluyó que la estabilidad observada en el gráfico 6 de la interacción entre el ligando y la proteína se debe en gran medida a la fuerte atracción dada por puentes de hidrógenos, algunos enlaces O-H y, además, de la fuerza y energía cinética por dichos enlaces que pueden llegar a presentar durante la dinámica.

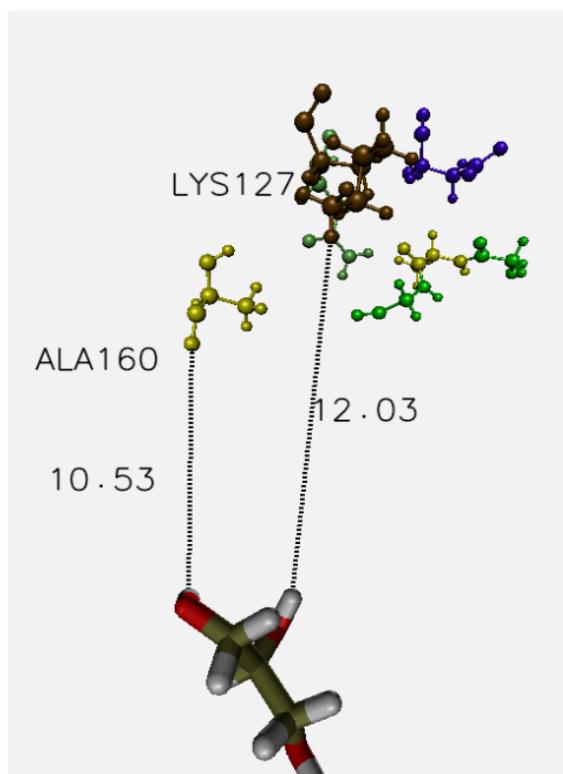
Figura 23. Última interacción a 955 ps con dos acercamientos previos a la deformación de la proteína. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Las interacciones que se presentaron en los 955 ps mostraron el último acercamiento del ligando con sus aminoácidos más cercanos, siendo LYS127 y ASN126, los últimos con el cual tuvo interacción antes de ser sometido por el impedimento estérico que formó la proteína

alejando el ligando del punto de acción, quizás, por la rotación de algún aminoácido de la proteína produciendo un reordenamiento de los mismos y causando el alejamiento del ligando por dicho fenómeno anteriormente mencionado.

Figura 24. Pérdida total de interacción, en 2503 ps, del ligando MGLY 184 con sus aminoácidos más cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Ya en los 2503 ps, se observó que el ligando perdió toda interacción con sus aminoácidos más cercanos presentes en su punto de acción de la proteína. Es evidente que este alejamiento se debió a una rotación o un reordenamiento de alguno de los aminoácidos cercanos, o aquellos con los que interactuó durante la dinámica. El reordenamiento estructural en la proteína afecta entonces directamente la interacción de ligandos en su superficie. Este impedimento

como fenómeno de repulsión posicional del ligando con respecto a sus aminoácidos afines en la proteína es congruente con lo visto en la figura 12, ya que, durante la dinámica las fluctuaciones fueron marcando el movimiento del ligando con respecto a la proteína y se notaron varias perturbaciones posicionales, que además, se reflejaron en las caracterizaciones como se mostraron anteriormente.

3.2. Caracterización de las interacciones del potasio con la proteína.

Continuando con el comportamiento y las interacciones entre la proteína y el potasio, uno de los componentes mayoritarios y de mayor interés por sus distintas aplicaciones para la agricultura, de acuerdo a lo que se pudo observar en las simulaciones aquí descritas, se podría estimar la viabilidad de la separación selectiva del potasio en base a sus interacciones dentro de la vinaza.

Las interacciones intermoleculares del complejo proteínico con las sales de potasio arrojaron datos que permiten asumir que el carácter de las interacciones es repulsivo; se considera así por el efecto que tienen las distintas torsiones y movimientos naturales de la proteína en sus estructuras terciaria y cuaternaria, adicional a esto, la energía suministrada al sistema mediante temperatura hace que los átomos terminales de cadena o grupo funcional, sean oxígenos, hidrógenos u otro tipo de elemento, vibren. A continuación se presentan imágenes de desviaciones, fluctuaciones y representaciones gráficas del fenómeno observado de repulsión. Para mejor comprensión, se evaluará individualmente cada potasio para determinar los aminoácidos responsables de la interacción en cada punto de interés.

A partir de las condiciones descritas anteriormente y considerando lo ya expuesto en la figura 9 y 15, el átomo de potasio empezó a “moverse” libremente, la energía (en forma de temperatura) que se le añadió al sistema hizo que el potasio vibrara y se desplazara de acuerdo a los movimientos de las moléculas de agua de la caja, junto al posible efecto de la proteína sobre él. Es importante resaltar que durante todo este

tiempo no hubo un acercamiento directo del potasio hacia la proteína, pero considerando que inicialmente se encontraba a menos de 3 ångströms de distancia de una zona de alta influencia por contener numerosos posibles puntos de interacción y que lentamente fue saliéndose de ésta, podemos afirmar que el potasio preferirá encontrar una especie con la cual poder enlazarse (dada su característica iónica, tenderá a buscar interacciones de esa naturaleza) antes que ser atraída por fuerzas electrostáticas relativamente débiles. A partir de este punto, para el potasio 1, se puede asumir que no va a haber interacción. Considerando la figura 25 se evidenció que en el tiempo 0 ps el potasio 1 se encontraba ubicado a menos de 3 Å del GLN156 (Glutamina), a 3,77 Å del PHE154 (Fenilalanina) y a 4,12 Å de ILE155 (Isoleucina). El potasio está representado por su radio de Van der Waals y los aminoácidos representados en barras y esferas (figura 25 (a), izquierda). Como se observó en la figura 15, el comportamiento de la fluctuación estándar del potasio 1 fue altamente inestable y tendió a alejarse fuertemente de su posición inicial, es decir, tiende a ser empujado fuera de su punto de equilibrio. La proteína contiene en su superficie bastantes puntos de interés teórico para una especie electropositiva como el potasio, pero se evidenció que a pesar que la posición inicial del potasio 1 era menos a 3 Å con respecto a un oxígeno (alta electronegatividad y un radio de enlace significativo) y a otros átomos que deberían influir positivamente en fenómenos de atracción (como nitrógenos, que no interactúan directamente por hacer parte de la estructura principal de la proteína, pero su densidad electrónica es considerable y puede generar momentos de atracción por efectos dipolo), el potasio fue fuertemente alejado del sitio de interés (figura 25 (b), derecha). Se evidenció que debido a una torsión del GLN156 (figura 26), la organización espacial del GLN156, en específico, el hidrógeno y el nitrógeno, se orientaron en un plano frontal hacia el potasio y determinó el comienzo del proceso de repulsión.

La dinámica vista para el potasio 2 mostró también un comportamiento no atractivo sobre la proteína y sus puntos de alta electronegatividad como se ve en la figura 16 (y en la figura 27 izquierda); aun así, se evidenció un comportamiento atractivo de un oxígeno perteneciente al aminoácido GLU que alcanza a influenciar el potasio 2 hasta que quedó a una distancia de menos de 3 Å del oxígeno (figura 27 (b), derecha). Ya

a los 2360 ps y en adelante se evidenció la reducción en las fluctuaciones por la lejanía del potasio 2 del complejo proteínico. La ausencia de una marcada fluctuación afirma que las interacciones para el potasio 2 son nulas, y las vistas inicialmente son de carácter seguramente repulsivo, exceptuando puntos como el visto en la figura 27 (b) (derecha) en la que los oxígenos están lo suficientemente expuestos sin ningún átomo que pueda apantallar el efecto inductivo de ellos sobre el potasio 2 (permitiendo realizar interacciones ion-dipolo); aunque, por el carácter iónico del potasio, esta atracción leve no fue suficiente para mantener ese comportamiento por más de un poco de picosegundos.

De acuerdo a la figura 28 (b) y teniendo en cuenta la figura 17, el ambiente químico que rodeaba el potasio 3 contenía moléculas con oxígenos e hidrógenos. Comparando el sitio de interés del potasio 3 con el sitio de interés de los potasios 1 y 2 se ven 3 oxígenos cercanos (a menos de 3 Å de distancia), aun así se observa la tendencia a alejarse del sitio de interés desde el comienzo de la dinámica hasta que el potasio 3 se encontró a más de 16 Å (cerca a los 2700 ps) como se ve en la figura 29 (b) (derecha). Dada la ausencia de interacción con la proteína, se ve una marcada reducción de fluctuaciones (ya que se encuentra relativamente libre de influencias electrónicas).

De acuerdo a la figura 29, se puede ver como el esqueleto de la proteína (se evaluó el movimiento de los carbonos, nitrógenos y oxígenos que conforman la cadena principal proteínica) empieza a moverse, comparando el gráfico con la figura 29, se puede ver una clara deformación; en la parte superior derecha de la proteína, donde se encuentra una de las zonas de estudio para los ligandos se ve una clara deformación que efectivamente ejerce un efecto importante sobre las interacciones; para el caso de los gliceroles, genera un impedimento estérico que evita la correcta generación de puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas menores y para los potasios, evita su correcta orientación para interactuar mediante fuerzas ion-dipolo.

Figura 25. Capturas de las condiciones para el potasio 1 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 55$ ps (b). El potasio representado mediante esfera y los aminoácidos de la proteína mostrados en barras y esferas. En $t = 0$ picosegundos: El potasio se encuentra a 3,26 Å de un hidrógeno de ILE155 (1), a 3,41 Å de

un hidrógeno de PHE154 (2), a 3,77 Å de un hidrógeno de GLN156 (3) y a 2,70 Å de un oxígeno de ILE155. Los aminoácidos involucrados son entonces Isoleucina (ILE), Glutamina (GLN) y Fenilalanina (PHE).

(a)

(b)

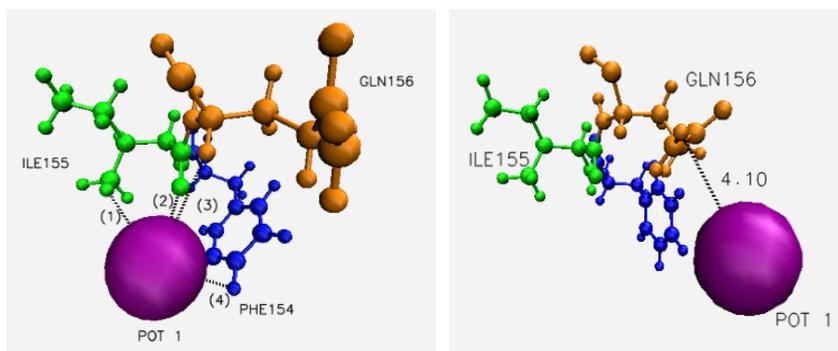


Figura 26. Capturas de las torsiones del GLN155, reordenamiento posiblemente responsable de la repulsión del potasio en los tiempos $t = 50$ ps hasta $t = 58$ ps. Nitrógeno en azul, hidrógeno en blanco, oxígeno en rojo y carbono en bronce. Se puede apreciar la torsión del nitrógeno hacia abajo con el paso del tiempo de dinámica.

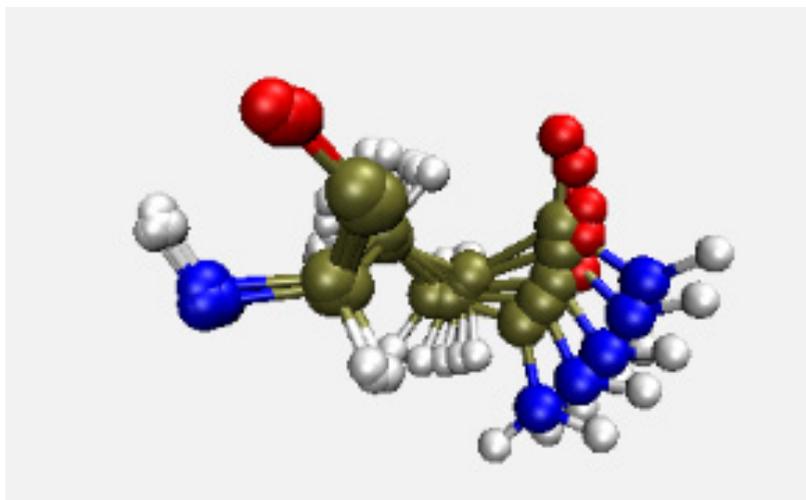


Figura 27. Capturas de pantalla para el potasio 2 en tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 731$ ps (b). Se puede apreciar que la zona de interés presenta suficientes puntos de posible interacción, estando a distancias entre 2,39 y 3,78 con respecto a átomos electronegativos (oxígeno de la leucina LEU130 y oxígeno del ácido aspártico ASP129) y un electropositivo (hidrógeno de la Treonina THR161). Pasados 731 ps se observó un breve acercamiento sin generar un cambio significativo a la tendencia del potasio de no realizar interacciones relevantes ion-dipolo. Potasio representado en esfera y aminoácidos representados en barras y esferas.

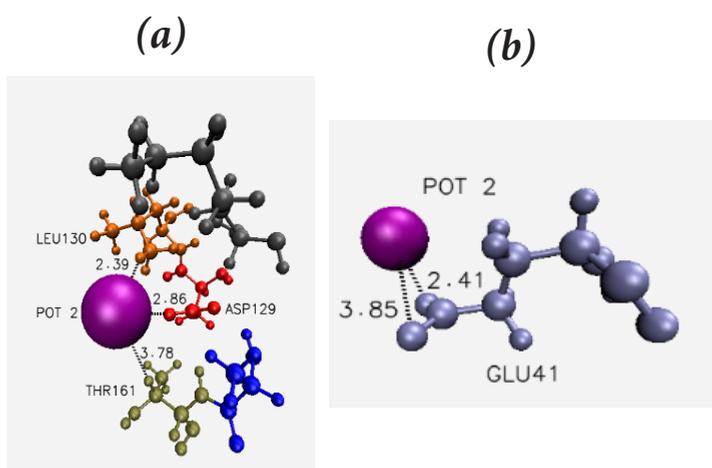


Figura 28. Capturas de pantalla para el potasio 3 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 2690$ ps (b). Se evidencia que el potasio se sale de la zona de interés y empieza a moverse dentro de la caja de agua como ion libre, sin sentir ningún efecto electrostático después de ser empujado fuera del punto inicial.

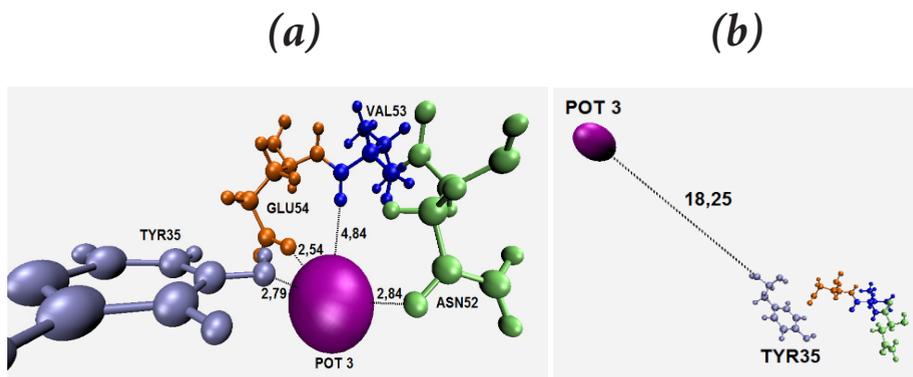


Figura 29. Potasios 1, 2 y 3 en tiempo $t=2279$ ps. Se muestra la estructura tridimensional de la proteína y los potasios representados mediante esferas; se ve claramente que no hay interacción de ningún tipo entre ion-proteína o ion-ion.

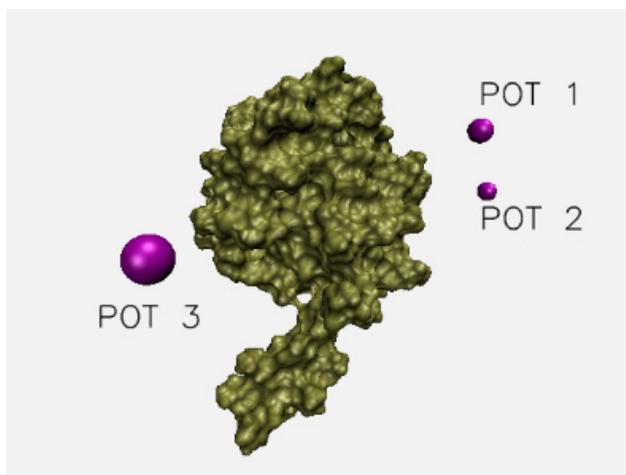
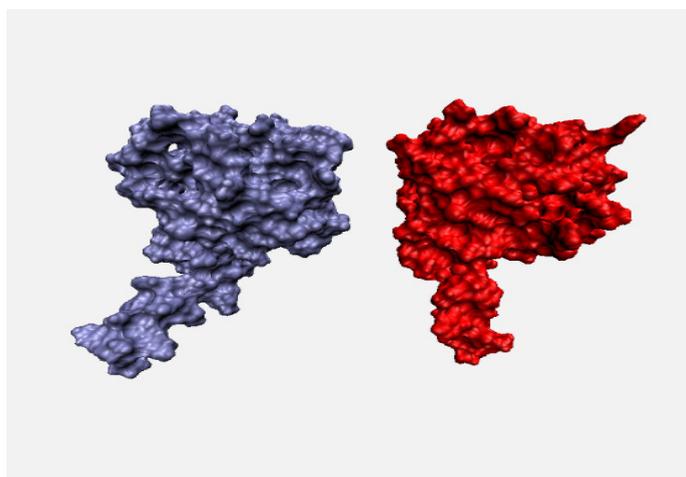


Figura 30. Comparativo de la estructura tridimensional de la proteína en los tiempos $t = 0$ ps (izquierda) y $t = 2700$ ps (derecha). Se pueden apreciar distintas características superficiales que evidentemente afectaron la capacidad de interacción de los ligandos.



4. CONCLUSIONES

Es evidente que gracias a fuerzas de interacción electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, puente de hidrógeno, ion-dipolo, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido, las moléculas con átomos como oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógenos (en general, moléculas orgánicas como el glicerol) tienden a ser “atrapadas” por la proteína, sea superficialmente por puentes, efectos inductivos o apantallamientos atómicos; para el caso de átomos, puntualmente sales de potasio, no se determinó posible que la proteína tuviera algún efecto atrayente considerable sobre éste; caso contrario se puede evidenciar el efecto repulsivo de la proteína sobre los átomos libres de potasio, donde ellos preferirán encontrar su equilibrio cerca de otros ligandos (recordando que en la vinaza hay muchos compuestos además del glicerol y el potasio).

Los aminoácidos GLN, GLY y LYS son los mayormente responsables del efecto repulsivo de la proteína en los sitios activos. A pesar de tener posibles puntos con cargas parciales atractivas para el potasio, el mismo movimiento natural de sus átomos evitan que el ligando se ubique a una distancia y de una manera efectiva, siendo totalmente bloqueado o expulsado por el resto de la cadena (se pudo ver, por ejemplo, que los hidrógenos terminales del GLN (para el potasio 1) y GLY y LYS (para MGLY 184) influyen directamente en éste fenómeno.

Además de lo realizado en esta investigación, se recomienda una caracterización rigurosa de las proteínas contenidas en la vinaza y los constituyentes de mayor interés para la industria; la posibilidad de evaluar en su totalidad las interacciones de cada componente teniendo en cuenta todos los factores electro-atrayentes o electro-repulsivos que puede dar información de qué requiere cada ligando para su verdadero aprovechamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Phillips, James C.; Braun, Rosemary; Wang, Wei; Gumbart, James; Tajkhorshid, Emad; Villa, Elizabeth; Chipot, Christophe; Skeel, Robert D.; Kalé, Laxmikant; Schulten, Klaus; “Scarable Molecular Dynamics with NAMD”; 2005, *J. Comput. Chem.*, vol 26, pp. 1781-1802.
- [2] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. “Basic local alignment search tool.”, 1990, *J. Mol. Biol.*, vol. 215, pp. 403-410. More info at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [3] Gish, W. & States, D.J. “Identification of protein coding regions by database similarity search.”, 1993, *Nature Genet.*, vol 3, pp. 266-272. More info at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [4] Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W., “A greedy algorithm for aligning DNA sequences”, 2000, *J Comput Biol* 2000; vol. 7(1-2), pp. 203-14. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [5] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., “VMD - Visual Molecular Dynamics”, *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38. More info at <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- [6] Hidalgo, K. Evaluación de la vinaza concentrada de destilería como aditivo en pollitas de reemplazo y gallinas ponedoras, 1920–1990. Retrieved from <http://www.e-libro.com/titulos>, 2012
- [7] Congreso De Colombia. . Ley 693 De Septiembre 19 De 2001, (44), 2–3. Retrieved from <http://www.minminas.gov.co/documents/10180//23517//21462-3660.pdf>, 2001
- [8] Minas y Energia, M. de. Resolución 41072 30 Oct 2015 - mezcla de alcohol carburante, Colombia. Retrieved from <https://www.minminas.gov.co/documents/10180//23517//36794-Resolución-41072-30Oct2015.pdf>, 2015.

- [9] Bermúdez, I. P., & Garrido, N. Aprovechamiento integral de vinazas de destilerías Una revisión actual. *Ingeniería Química*, 129–133. 2006
- [10] ANDI, & FENALCO. . Informe Del Sector Automotor. Retrieved from http://web.econometria.com.co/images/Vehiculos/Avance_Abr_2015.pdf, 2015.
- [11] Tecnicaña. Capacitación Técnica para la Agroindustria. *Revista Tecnicaña*, (28), 34., 2012
- [12] Irisarri, D. Usos Industriales y Agrícolas de la Vinaza de Caña de Azúcar, (*Las Vinazas*), 20–25, 1996.
- [13] MacKerell, A.D., Jr. Feig, M., Brooks, C.L., III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *Journal of Computational Chemistry*, 25: 1400-1415, 2004.
- [14] MacKerell, Jr., A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr., R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, III, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102, 3586-3616.
- [15] Guvench, O., Mallajosyula, S.S. Raman, E.P., Hatcher, E. Vannommeslaeghe, K., Foster, T.J., Jamison II, F.W., and MacKerell, A.D., Jr. “CHARMM additive all-atom force field for carbohydrate derivatives and their utility in polysaccharide and carbohydrate-protein modeling,” *Journal of Chemical Theory and Computing*, 7: 3162-3180, 2011, [DOI], PMC3224046
- [16] Mallajosyula, S.S., Guvench, O., Hatcher, E., MacKerell, A.D., Jr., “CHARMM Additive All-Atom Force Field for Phosphate and Sulfate Linked to Carbohydrates,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8: 759-776, 2012, [DOI], PMC3367516

- [17] Raman, P. Guvench, O. MacKerell, Jr. A.D. "CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages in Carbohydrates Involving Furanoses," *Journal of Physical Chemistry B* 114: 12981-12994, 2010, [DOI], PMC2958709
- [18] Guvench, O. Hatcher, E.R. Venable, R.M. Pastor, R.W. and MacKerell Jr., A.D. "Additive Empirical CHARMM Force Field for glycosyl linked hexopyranoses," *Journal of Chemical Theory and Computation* 5: 2353-2370, 2009, [DOI], PMC2757763
- [19] Cross, S. Kuttel, M. Stone, J. Gain, J. Visualization of cyclic and multi-branched molecules with VMD, In *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Volume 28, Issue 2, 2009, Pages 131-139, ISSN 1093-3263, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2009.04.010>.
- [20] *Bondi, A. (1964). "Van der Waals Volumes and Radii". J. Phys. Chem. 68 (3): 441-451. doi:10.1021/j100785a001*
- [21] Yizhou, L., Kahn, Richard A., Prestegard, James H., "Dynamic Structure of membrane-anchored Arf*GTP", 2010, *Nat.Struct. Mol.Biol.*, vol 17. pp. 876-881. More info at DOI: 10.1038/nsmb.1853
- [22] Abdallah, M., Khelissa, O., Ibrahim, A., Benoliel, C., Heliot, L., Dhulster, P., & Chihib, N. (2015). International Journal of Food Microbiology Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bio films to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 38-47. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.02>
- [23] Alves, P. R. L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J. P., & Cardoso, E. J. B. N. 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of The Total Environment*, 526, 222-232. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.150>
- [24] Bandala, E. R., Gelover, S., Teresa, M., Arancibia-bulnes, C., Jimenez, A., & Estrada, C. A. 2002. Solar photocatalytic degradation of Aldrin, 76, 189-199.
- [25] Bock, L. J., Wand, M. E., & Sutton, J. M. 2016. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumo-*

- niae clinical isolates and adapted strains. *Journal of Hospital Infection*, 93(1), 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.12.019>
- [26] Campos, C. R., Mesquita, V. A., Silva, C. F., & Schwan, R. F. 2014. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. *Waste Management*, 34(11), 2036–2046. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.006>
- [27] Chamakura, K., Perez-ballesteros, R., Luo, Z., Bashir, S., & Liu, J. 2011. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 88–96. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.020>
- [28] Chang, C. T., Colicino, E. G., Dipaola, E. J., Al-hasnawi, H. J., & Whipps, C. M. (2015). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Evaluating the effectiveness of common disinfectants at preventing the propagation of *Mycobacterium* spp. isolated from zebra fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 178, 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.008>
- [29] Chioma, A., Chaudhuri, M., Rahman, S., & Kutty, M. 2014. International Biodeterioration & Biodegradation UV Fenton and sequencing batch reactor treatment of chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil pesticide wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 195–201. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.002>
- [30] Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- [31] Gomez, J. M. (Universidad C. O. L. A. 2009. Efecto de la aplicación de vinaza en la producción y calidad de la caña de azúcar.
- [32] Gutiérrez-martín, C. B., Yubero, S., Martínez, S., Frandoloso, R., & Rodríguez-ferri, E. F. (2011). Research in Veterinary Science Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylo-*

- bacter jejuni strains by a suspension test, 91, 44–47. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.020>
- [33] Ha, J., Choi, C., Lee, H., Ju, I., Lee, J., & Ha, S. 2016. Efficacy of chemical disinfectant compounds against human norovirus. *Food Control*, 59, 524–529. <http://doi.org/10.1016/j.food-cont.2015.04.040>
- [34] Hong, H., Forbes, D., Rn, M., Sandora, T. J., & Priebe, G. P. 2013. American Journal of Infection Control Disinfection of needleless connectors with chlorhexidine-alcohol provides long-lasting residual disinfectant activity. *American Journal of Infection Control*, 41(8), e77–e79. <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.10.018>
- [35] Korndörfer, G. H., Nolla, A., & Ailton, G. (n.d.). Manejo, aplicación y valor fertilizante de la vinaza para caña de azúcar y otros cultivos. *Control*, 23–28.
- [36] Kusvuran, E., & Erbatur, O. 2004. Degradation of aldrin in adsorbed system using advanced oxidation processes : comparison of the treatment methods, 115–125. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.10.004>
- [37] Kusvuran, E., Gulnaz, O., Irmak, S., Atanur, O. M., Yavuz, H. I., & Erbatur, O. (2004). Comparison of several advanced oxidation processes for the decolorization of Reactive Red 120 azo dye in aqueous solution, 109, 85–93. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.03.009>
- [38] Lazaro, Y. (UNAH), & Castro, I. (UNAH). 2014. Efecto de la aplicación de vinaza sobre algunos indicadores físicos de un suelo Pardo Sialítico carbonatado cultivado con tomate (*Solanum lycopersicum L*) cv . Amalia Effect of vinasse application on some soil physical indicators Pardo sialítico carbonat, 4(4), 24–29.
- [39] Liu, Y., Kahn, R. A., & Prestegard, J. H. 2010. Dynamic structure of membrane-anchored Arf•GTP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(7), 876–881. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1853>

- [40] Moraes, B. S., Junqueira, T. L., Pavanello, L. G., Cavalett, O., Mantelatto, P. E., Bonomi, A., & Zaiat, M. (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, 113, 825–835. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>
- [41] Oosterik, L. H., Tuntufye, H. N., Butaye, P., & Goddeeris, B. M. 2014. Effect of serogroup , surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. *The Veterinary Journal*, 202(3), 561–565. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.001>
- [42] Perumal, P. K., Wand, M. E., Sutton, J. M., & Bock, L. J. 2014. Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection*, 87(4), 227–233. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.004>
- [43] Pesticide Research Institute. 2013. Vinasse Technical Evaluation Report.
- [44] Portuguez, R. A., & Chinchilla, R. O. 2007. Cambios Físico-Químicos provocados por la Vinaza en un Suelo Vertisol en Costa Rica Introducción Objetivos Materiales y Métodos.
- [45] Pozo, C., Gã, M. A., Calvo, C., & Gonzã, J. 2002. Studies on the effects of the insecticide aldrin on aquatic microbial populations, 50, 83–87.
- [46] Rajdev, S., Mulla, S., & Kumar, A. (n.d.). Development of an indigenous automated surveillance system in India : Its impact on device associated infections at a trauma center, 3, 50–51.
- [47] Santos, M., Diánez, F., de Cara, M., & Tello, J. C. 2008. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresource Technology*, 99(18), 9040–9043. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.032>
- [48] Santos, M., Carretero, F., & Cara, M. De. 2009. Efecto de la aplicación de vinaza de vino como biofertilizante y en el control de enfermedades en el cultivo de pepino, 58–66.

- [49] Scull, I., Savón, L., Gutiérrez, O., Valiño, E., Orta, I., Mora, P. O., ... Noda, A. 2012. Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets, 46(4), 385–389.
- [50] Smilanick, J. L., Mansour, M., & Sorenson, D. 2014. Postharvest Biology and Technology Performance of fogged disinfectants to inactivate conidia of *Penicillium digitatum* within citrus de-greening rooms . *Postharvest Biology and Technology*, 91, 134–140. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.020>
- [51] Speight, S., Moy, A., Macken, S., Chitnis, R., Hoffman, P. N., Davies, A., ... Walker, J. T. 2011. Evaluation of the sporicidal activity of different chemical disinfectants used in hospitals against *Clostridium dif fi cile*. *Journal of Hospital Infection*, 79(1), 18–22. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.016>
- [52] Subirós, J. F., & Molina, E. 1992. Efecto de la aplicación de vinazas en la producción de caña de azúcar y en las características químicas de un inceptisol de Guanacaste, costa rica. *Agronomía Costarricense*, 16(1), 55–60.
- [53] Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. 2015. ScienceDirect Quaternary ammonium disinfectants : microbial adaptation , degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33(Mic), 296–304. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
- [54] Yamanaka, T., Bannai, H., Dvm, K. T., Dvm, M. N., Dvm, T. K., & Dvm, T. M. (2014). Journal of Equine Veterinary Science Comparison of the Virucidal Effects of Disinfectant Agents Against Equine In fluenza A Virus. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 715–718. <http://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.12.010>
- [55] MacKerell AD Jr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL Jr, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT,
- [56] MacKerell AD1, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FT, Mattos C, Michnick S, Ngo T,

- Nguyen DT, Prodromou B, Reiher WE, Roux B, Schlenker M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiórkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M, All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *J Phys Chem B*. 1998 Apr 30;102(18):3586-616. doi: 10.1021/jp973084f.
- [57] Weiner SP, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagona G, Profeta J, Weiner P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Am Chem Soc* 1984;106:765–784.
- [58] Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 1995;91:43–56.
- [59] Lourencetti, C., de Marchi, M. R. R., & Ribeiro, M. L. 2008. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. *Talanta*, 77(2), 701–709. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.013>.
- [60] Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761.
- [61] Alves, P. R. L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J. P., & Cardoso, E. J. B. N. 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of The Total Environment*, 526, 222–232. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.150>

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS EN UN RESERVORIO DE AGUA EN VENEZUELA. UNA APROXIMACIÓN A LA MULTIRRESISTENCIA BACTERIANA EN AMBIENTES NATURALES

Faustino Andreas Toba

Aura Falco

Carlos Andrés Aranaga

Guillermina Alonso

Abstract. Waters contamination by organic matter discharges represents a public health problem because it favors the selection of bacteria resistant to antimicrobials. At a global level, molecular epidemiology studies are being carried out to detect the incidence of bacteria with multiple resistances. In Venezuela, there are few investigations that characterize microbiologically water bodies. The Pao-Cachinche reservoir, located in the northern center of Venezuela, is used to supply water to nearby cities as well as for agricultural activities. The analysis of the presence and identification of bacteria was carried out, with samples taken during rainy and drought seasons, finding that the predominant genus was *Pseudomonas*. The isolates were tested for antimicrobial susceptibility,

detecting complex patterns of resistance to antibiotics and heavy metals. Given the relationship between multiresistance and plasmids, the presence of plasmids and their capacity for transfer through the conjugation process were studied. Overall, the results suggest that the bacterial population that inhabits this water reservoir presents plasmids, which code for resistance to various antimicrobial agents, and can potentially disseminate the markers they code.

Keywords: water reservoirs, contamination, resistance to antibiotics, heavy metals

Resumen: La contaminación de aguas por descargas de materia orgánica representa un problema de salud pública debido a que favorece la selección de bacterias resistentes a antimicrobianos. A nivel mundial se están realizando estudios de epidemiología molecular para detectar la incidencia de bacterias con resistencias múltiples. En Venezuela, son pocas las investigaciones que caracterizan microbiológicamente los cuerpos de agua. El embalse Pao-Cachinche, ubicado en el centro-norte de Venezuela, es utilizado para suministrar agua potable a las ciudades cercanas, así como para actividades agrícolas. Se realizó el análisis de la presencia e identificación de bacterias, con tomas de muestras durante temporadas de lluvias y sequía, encontrándose que el género predominante fue *Pseudomonas*. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a los aislados, detectándose patrones complejos de resistencia a antibióticos y a metales pesados. Dada la relación que existe entre la multiresistencia y la presencia de plásmidos, se determinó la presencia de éstos y su capacidad de transferencia a través del proceso de conjugación y transformación. En conjunto los resultados sugieren que la población bacteriana que habita en este reservorio de agua presenta plásmidos, los cuales codifican para resistencia a diversos agentes antimicrobianos, que potencialmente pueden diseminar los marcadores que codifican.

Palabras clave: reservorios de agua, contaminación, resistencia a antibióticos, metales pesados.

1. INTRODUCCIÓN

Los ríos, lagos y estanques son fuentes importantes de agua potable. Para evitar la contaminación, las autoridades de salud pública deben regular las descargas de aguas residuales en los embalses y sus afluentes. No obstante, es una práctica común en países subdesarrollados que las aguas residuales se viertan directamente en las fuentes de agua y embalses, con consecuencias dramáticas para la salud humana [1]. Estas aguas residuales son una fuente importante de microorganismos patógenos que se encuentran en ambientes acuáticos.

En un reservorio de agua, el crecimiento y dominancia de algunos grupos bacterianos de importancia clínica depende de múltiples factores, tales como, las condiciones físicas y químicas del agua, la cantidad de material orgánico disuelto y otros contaminantes proporcionados por las descargas de aguas residuales no controladas de áreas urbanas e industriales. Las bacterias resistentes a los antibióticos, así como los mismos antibióticos y agentes biocidas se descargan en los reservorios desde los centros poblados del entorno [2]. La presencia de estos contaminantes proporcionan una fuerte presión selectiva a favor de aquellos microorganismos que poseen genes que confieren resistencia a antimicrobianos y/o para la capacidad de degradar compuestos particulares. Por lo tanto, no es sorprendente observar un aumento de cepas resistentes en aislamientos de fuentes ambientales y el suministro de agua contaminada [3, 4].

Con frecuencia, las propiedades relacionadas con la supervivencia bacteriana están codificadas por plásmidos transferibles, que aseguran su diseminación entre las poblaciones bacterianas. Por lo tanto, la resistencia bacteriana a diversos agentes antimicrobianos y metales pesados con frecuencia se encuentra en aislados bacterianos provenientes de ambientes contaminados, estando los sistemas genéticos predominantemente codificados por plásmidos [5, 6, 7, 8]. En una misma célula pueden residir plásmidos diferentes, capaces de coexistir si pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad. Además, estos plásmidos no solo portan un gen de resistencia, sino que en muchos casos, pueden codificar diversas resistencias en uno mismo [9]. Estos

determinantes genéticos favorecen la sobrevivencia de las bacterias que los portan en un ambiente adverso, o le proporcionan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma especie o no, que comparten el mismo nicho ecológico. Eventualmente, en ambientes con una alta presión selectiva, estos determinantes pueden convertirse en indispensables para la viabilidad celular [10, 11]. También se ha demostrado la transferencia en condiciones en las cuales, aparentemente, no existe una ventaja selectiva [12]. De hecho, hay evidencia que apoya la transferencia de genes por conjugación y transformación, entre la flora bacteriana de ambientes acuáticos y terrestres. Incluso, aun cuando los conteos viables en estos hábitats son generalmente más bajos que aquellos necesarios para la conjugación *in-vitro*, la transferencia pudiera ocurrir a una mayor frecuencia tomando en cuenta la formación de biopelículas. Se ha demostrado que la transferencia horizontal de genes entre las bacterias en los sistemas acuáticos naturales se produce, fundamentalmente, por conjugación y transformación [13]. Por lo tanto, en condiciones adecuadas, las bacterias podrían ser capaces de transferir y recibir material plasmídico durante la supervivencia en agua dulce. Durante estos procesos, las bacterias adquieren genes de resistencia a diversos agentes antimicrobianos, lo que genera dificultades en el manejo de las infecciones. Todos los mecanismos de transferencia genética son importantes para la evolución de las poblaciones bacterianas. La generalización de estos procesos de transferencia y movilización del material genético, ocurren en una comunidad bacteriana que comparte un grupo de genes, en un ambiente específico, los cuales están disponibles para cualquier célula bacteriana, en la que las barreras entre las especies, si no son nulas, están muy disminuidas. Así, la comunidad de bacterias de un ecosistema, más específicamente, el bacterioplancton de un ambiente acuático, se puede interpretar como un conjunto de organismos unicelulares que comparten y movilizan marcadores genéticos, utilizando como principales vehículos algunos elementos accesorios, como los plásmidos. La microbiología de los ecosistemas se interesa sobre todo en dos aspectos, identificar los microorganismos existentes y determinar la naturaleza y el grado de sus actividades metabólicas. La diversidad bacteriana presente en los cuerpos de agua es enorme. En el banco de datos se han repor-

tado más de 40.000 especies, pero se estima que los océanos pueden contener más de 2 millones de bacterias diferentes, mientras que en el suelo pueden habitar unos 4 millones, lo que ejemplifica la alta diversidad y el poco conocimiento existente de estos microorganismos procariotas.

Debido a la contaminación existente sobre los cuerpos de agua a nivel mundial, es de gran interés el estudio de aquellas fuentes de agua que están destinadas al consumo de las poblaciones, entre las cuales se encuentran los embalses. El incremento de desechos orgánicos u otros tipos de desechos en estos cuerpos de agua cambia las condiciones del sistema, generando así una presión selectiva sobre los organismos que allí habitan. Esta presión selectiva ha generado el incremento de cepas bacterianas resistentes a diversos factores, desde desinfectantes de uso clínico y antibióticos, hasta metales pesados. El uso de los antimicrobianos en las prácticas agrícolas y con propósitos veterinarios, junto con las descargas de aguas cloacales, ha resultado en un incremento significativo de bacterias resistentes a antibióticos en los ambientes acuáticos [14]. Debido a que los antimicrobianos son excretados por los animales, estos se pueden filtrar por la tierra y llegar a las aguas subterráneas, alcanzando de este modo a los ambientes acuáticos, con una distribución bastante amplia [2]. Las grandes descargas de antibióticos y otros antimicrobianos, y su circulación en los ambientes naturales, generan una presión selectiva, de modo que las bacterias presentes en estos ambientes representan un reservorio de determinantes de resistencia, medio propicio para la diseminación y la evolución de los genes de resistencia. La incidencia elevada de bacterias multirresistentes en los ambientes acuáticos a nivel mundial, agrava el problema de la alta frecuencia de cepas resistentes a distintos antibióticos, justificado con razones de peso la necesidad de establecer controles sobre la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en estos hábitats, y sobre los procesos de transferencia genética en estos ambientes.

El estudio de las comunidades microbiológicas ha adquirido gran relevancia para los científicos, en especial en aquellos ambientes contaminados por actividades antropogénicas. La identificación y la

caracterización de la diversidad microbiana, así como su función en un determinado ecosistema, puede aportar evidencia para establecer nuevas estrategias para la recuperación de los ambientes. A pesar de esto, los estudios sobre la ecología microbiana de los sistemas tropicales son particularmente escasos. A pesar de la importancia potencial para la diseminación de los determinantes de resistencia, existe una considerable falta de información sobre la contaminación bacteriana en los reservorios de agua venezolanos, ya que los estudios se han enfocado, fundamentalmente, hacia el conteo de coliformes fecales para evaluar la calidad bacteriológica, y realizar las recomendaciones pertinentes de acuerdo a normas para la clasificación y control de la calidad de los cuerpos de agua. Pocos estudios se han realizado para conocer la composición de la comunidad bacteriana en estos nichos ecológicos, y mucho menos conocer los determinantes de resistencia presentes en esas comunidades.

El embalse Pao-Cachinche es un reservorio de agua utilizado como fuente de abastecimiento de agua potable a densas regiones urbanas del centro-norte del país [15, 16, 17, 18]. El embalse ha sufrido el impacto de la contaminación como consecuencia de una serie de factores, que confluyen en el aporte excesivo de nutrientes al embalse a lo largo de varias décadas, como: el crecimiento urbanístico, la agricultura intensiva, las granjas avícolas y porcinas, la ganadería menor y la deforestación de las cuencas de drenaje. Estos factores sumados a la imposibilidad de mezcla natural por acción del viento, han producido fuertes impactos en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de este cuerpo de agua.

El objetivo del presente estudio es la caracterización de bacterias cultivables aisladas del embalse Pao-Cachinche, y establecer los patrones de resistencia a diversos agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en la salud humana y/o la cría de animales, y compuestos tóxicos industriales descargados en el embalse. Los resultados revelaron patrones complejos de resistencia a una gran cantidad de antibióticos y metales pesados, y la presencia de plásmidos movilizables en la población bacteriana analizada, los cuales codifican para resistencias a diversos agentes antimicrobianos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción del lugar.

Figura 31. Mapa del Embalse Pao-Cachinche, mostrando las estaciones de muestreo. Se señalan los sitios de toma de muestras (E1, E2). [Tomado y modificado de González y colaboradores, 2004].



El embalse Pao-Cachinche (Fig. 31) se ubica en la región centro-norte de Venezuela ($9^{\circ}53' N$ - $68^{\circ}08' W$), a una cota de 353 m.s.n.m., ocupando un área de 16.100.00 m², con un volumen de 170.000.000 m³, una profundidad media de 10,6 m y un área de la cuenca de 940 km², y entró en funcionamiento en el año 1974. Este embalse represa al río Pao y sus afluentes principales son los ríos Paíto y Chirgua. El gasto regulado por la toma es de 7 m³/s, lo que permite calcular un tiempo de renovación de 281 días. Es empleado para el abastecimiento de agua potable a los centros poblados vecinos y el riego de 6.000 ha. con fines agrícolas. El río Paíto transporta aguas residuales y domésticas, mientras que el río Chirgua transporta las aguas provenientes de granjas avícolas y porcinas. El embalse está rodeado de marraneras y granjas avícolas, recibiendo una carga alta de nutrientes, principalmente del río Paíto, con predominancia del fósforo [17, 18].

2.2. Colecta de muestras.

Los métodos utilizados para la recolección de muestras fueron descritos previamente por González [17]. Las muestras de agua fueron colectadas en frascos estériles, a diferentes profundidades (10, 15 y 20 metros) y en dos lugares diferentes del embalse. En la estación E1, que está ubicada en el brazo oeste del embalse, al lado de la torre-toma y frente al dique. Se encuentra cerca del canal principal del río Pao y del aliviadero, y de ella se extraen las aguas antes de ser potabilizadas en una planta de tratamiento. Su profundidad promedio fue de 23,9 m. En la estación E2, que está ubicada en el brazo este del embalse, que se encuentra unido al brazo oeste por un canal estrecho y somero (Fig. 31). En esta zona desembocan las aguas de los tributarios Paya, Pirapira y San Pedro. Su profundidad promedio fue de 17,5m. El muestreo se realizó en dos períodos del año: comienzos de la estación seca (noviembre) y comienzos de la temporada de lluvias (mayo).

2.3. Procesamiento de la muestra.

Las muestras de agua se procesaron para el análisis microbiológico, dentro de las 24 horas siguientes a la toma. El cálculo del número de bacterias cultivables totales se realizó por siembra de diluciones seriadas de las muestras de aguas, que posteriormente fueron incubadas a 30°C y 37°C hasta por 72 horas. Los títulos (número de bacterias por ml) se establecieron de acuerdo al número total de colonias desarrolladas en las placas, independientemente de su morfología, utilizando la siguiente ecuación: Título bacteriano= Número de colonias x Factor de dilución/Volumen de Siembra (ml). Una vez obtenido el título bacteriano, el estudio de las diversas poblaciones bacterianas se realizó identificando una colonia representativa de cada grupo, al seleccionar diferentes tipos de colonias dependiendo de su morfología (forma, tamaño, bordes y pigmentación), las cuales posteriormente fueron inoculadas en placas de agar LB para obtener colonias puras. Una vez obtenidas las colonias puras, se inocularon sobre placas de Agar LB y Agar MacConkey, incubándolas hasta por 72 horas. De la placa de Agar LB, se tomaron colonias aisladas para proceder a realizar las pruebas de identificación, y a cada colonia se le asignó un código que permitió distinguir: sitio de toma, muestra y año.

2.4. Identificación de los aislados bacterianos.

Las cepas bacterianas fueron aisladas, identificadas y preservadas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) [19]. La selección de las pruebas bioquímicas y las galerías de identificación del sistema comercial automatizado ATB/Plus (BioMérieux, St Louis, MO, USA) se orientó de acuerdo a los resultados de la coloración de Gram. La identificación fue corroborada por pruebas bioquímicas adicionales.

2.5. Determinación de la resistencia a antibióticos.

Los fenotipos de resistencia a los antibióticos se determinaron mediante el crecimiento en medio sólido suplementado con antibióticos, la prueba rápida de susceptibilidad ATB UR (BioMérieux) y el método de difusión en disco según las recomendaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), como se describió previamente [20]. La interpretación de los tamaños de las zonas de inhibición siguió la recomendación del fabricante del disco. Se analizaron 14 antibióticos diferentes: amikacina ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ampicilina ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefamandol ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefepima ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefonicid ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefalotina ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cloranfenicol ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ciprofloxacina ($5 \mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamicina ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ácido nalidíxico ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$), estreptomina ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$), sulfametoxazol/ trimetoprima ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$), tetraciclina ($15 \mu\text{g.ml}^{-1}$) y tobramicina ($4 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

2.6. Determinación de la resistencia a metales pesados.

La resistencia a diversos metales pesados y aniones se midió usando medio de cultivo suplementado con la sal respectiva [4]. Se llevaron a cabo determinaciones de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio Luria Broth (LB) líquido que contenía diversas concentraciones del compuesto bajo prueba. Las placas se incubaron a la temperatura apropiada hasta 72 horas. Las placas que contenían medio sin adición de metal se inocularon de la misma manera para emplearlo como control. Una vez estandarizadas las condiciones óptimas de crecimiento de los aislados bacterianos, se realizaron los crecimen-

tos con los metales tóxicos, estableciendo primero las condiciones para las cepas controles. La CMI se definió como la concentración más baja de metal que inhibía el crecimiento después de una incubación de hasta 72 h a la temperatura de crecimiento óptima. Los metales que se emplearon fueron: CdCl_2 , CoCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$, ZnSO_4 , HgCl_2 y NiSO_4 , K_2TeO_3 y VoSO_4 y CuSO_4 .

2.7. Determinación de la presencia de plásmidos.

Se examinaron múltiples bacterias resistentes a antimicrobianos con el fin de detectar la presencia de plásmidos. Para ello, se utilizó el procedimiento de extracción alcalina [21] y la técnica para el aislamiento de plásmidos grandes y pequeños descrita por Kado y Liu [22].

Los plásmidos aislados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, y visualizados con un equipo Gel Doc 1000 (BioRad) y el programa Multi-Analyst (BioRad).

2.8. Transferencia de plásmidos.

La transferencia de la información genética a través de plásmidos se estudió realizando ensayos de conjugación y transformación, empleando diferentes cepas receptoras donadas por el CVCM (Tabla 4). La selección de la cepa receptora se realizó en función del género de la cepa donante y su relación filogenética con la misma. Los experimentos de transformación se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de transformación química y/o electroporación [23]. Como cepas donantes se utilizaron cultivos de *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas cepacea* y *Pseudomonas* spp. Las bacterias transformadas se seleccionaron por resistencia a algunos marcadores de resistencia presentes en la respectiva cepa donante.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5a	F, I, D (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>f80lacZ</i> , DM15, <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> .	CVCM125
<i>E. coli</i> DH5aMCR	F, I, D (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>f80lacZ</i> , DM15, <i>mcrA</i> , D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>deoR</i> , <i>phoA</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> .	CVCM824
<i>E. coli</i> J53	F, pro, met	CVCM126
<i>E. coli</i> J62-2	F; his; lac; pro; trp; rif	CVCM131
<i>P. aeruginosa</i> PAO303	chl; rif; arg	CVCM409
<i>P. aeruginosa</i> PAO38	leu; rif	CVCM410

Los ensayos de conjugación consistieron en proporcionar un medio en el cual las cepas, donante y receptora, estén en contacto por un período de tiempo determinado [11]. Brevemente, se crecieron ambas cepas (donante y receptora) en medio LB durante una noche. Luego, se inocularon 0,2 ml de cada cepa, en 10 ml de caldo LB. Se incubó con agitación hasta que la donante alcanzó 2×10^8 cel/ml y la receptora $0,5 \times 10^8$ cel/ml. Luego se estableció una mezcla de conjugación en la que se inocularon 0,1 ml la cepa donante, más 0,4 ml de la receptora y 0,5 ml de caldo LB y se incubó a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , las cuales fueron sembradas en placas de selección de transconjugantes. Para estimar las poblaciones de células viables (donante y transconjugantes) se calculó el título bacteriano, que se empleó para calcular la frecuencia de transferencia, calculado mediante la siguiente ecuación: Frecuencia de transferencia = Título de transconjugantes/Título de donantes.

3. RESULTADOS

3.1. Recuento de bacterias viables y cultivables.

El título de las bacterias se determinó a partir de muestras recolectadas en las dos estaciones, a comienzos del periodo de sequía (noviembre) y a comienzos de la temporada de lluvias (mayo). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Títulos bacterianos obtenidos.

Estación (metros de profundidad)	Muestreo en noviembre (bacterias/ml)	Muestreo en mayo (bacterias/ml)
E1 (10)	$5,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^5$
E1 (15)	$9,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$
E1 (20)	$5,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^4$
E2 (10)	$5,0 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
E2 (15)	$3,7 \times 10^4$	ND

ND: Muestra no tomada, el embalse no alcanza este nivel de profundidad en esta Estación.

3.2. Identificación bacteriana.

Del crecimiento bacteriano obtenido para el recuento, se seleccionaron 60 aislados bacterianos, con base en morfología de las colonias. De la identificación preliminar, y eliminando repeticiones de especies, se seleccionaron 12 aislados representativos de la comunidad para la caracterización de las resistencias a antimicrobianos (Tabla 6) y metales pesados (Tabla 7). La distribución de las poblaciones bacterianas varió de acuerdo a los cambios climáticos. En ambas estaciones, el 50% de los aislamientos se identificaron como *Pseudomonas spp.*, con mayor predominancia al inicio de la temporada de lluvias (muestreo del mes de mayo) alcanzando más del 70% de la composición de la comunidad. Otros géneros identificados fueron *Bacillus*,

Micrococcus, *Enterobacter* y *Orskovia*. Se detectó la presencia minoritaria (1%) de bacilos Gram-positivos.

Tabla 6. Resistencia bacteriana a antibióticos

Bacteria	AMP	CLO	KAN	NAL	STR	TET	AMI	CCD	CTN	CPM	CIP	CMA	SXT	TOB
<i>Bacillus</i> sp.	R	S	S	S	S	S	S	ND						
<i>Orskovia</i> sp.	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
<i>Micrococcus roseus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Micrococcus luteus</i>	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>Pseudomonas cepacia</i>	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S
<i>Pseudomonas</i> sp.	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S

Abreviaturas: Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CLO), Kanamicina (KAN), Acido Nalidíxico (NAL), Estreptomina (STR), Tetraciclina (TET), Amicacina (AMI), Cefonicida (CCD), Cefalotina (CTN), Cefepima (CPM), Ciprofloxacina (CIP), Cefamandol (CMA), Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), Tobramicina (TOB) ND: no determinado.

Tabla 7. Resistencia bacteriana a metales pesados

Bacteria	Hg 0,5 mM	Cu 3,6 mM	Te 10 mM	Ni 4,5 mM	Pb 10,5 mM	Zn 4,5 mM	V 25 mM	Co 4,5 mM	Cd 4 mM	Determi- nantes de resistencia	Moléculas plasmídicas visualizadas
<i>Bacillus</i> sp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0
<i>Orskovia</i> sp.	S	S	R	R	S	S	R	S	S	13	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	R	11	6
<i>Micrococcus roseus</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	5	4
<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	9	4
<i>Pseudomonas cepacia</i>	R	S	R	S	R	S	S	S	S	12	4
<i>Pseudomonas sp.</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	7	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	5	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	S	S	R	S	S	R	S	S	6	1
<i>Micrococcus byla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	R	S	R	S	R	S	S	S	S	11	5
<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6	1

Abreviaturas: Hg: Mercurio, Cu: Cobre, Te: Telurit, Ni: Níquel, Pb: plomo, Zn: Zinc, V: Vanadio, Co: Cobalto, Cd: Cadmio. **R**: resistente, **S**: sensible, **ND**: No determinado.

3.3. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

3.3.1. Antibióticos

Se estudió la capacidad de crecimiento en presencia de los antibióticos de uso común en las prácticas sanitarias y en la atención veterinaria (Tabla 6). Todas las cepas analizadas fueron resistentes, al menos, a uno de los antibióticos evaluados. El 91% fue resistente a al menos cuatro antibióticos, mientras que el 33% fue resistente hasta a siete antibióticos. Además, el 16% mostró resistencia al menos a nueve de los agentes antimicrobianos probados. Todas las cepas mostraron resistencia a cefalotina (cefalosporina de primera generación), cefepima (cuarta generación de cefalosporina) y trimetoprim sulfametoxazol. Ninguna de las cepas fue resistente a cloranfenicol, a ciprofloxacina (fluoroquinolona) ni a tobramicina (aminoglucósido).

3.3.2. Metales pesados.

Se ha sugerido que no existen concentraciones aceptables de iones metálicos que puedan usarse para distinguir bacterias resistentes de sensibles. Sin embargo, el rango de concentraciones para todos los metales pesados analizados, fue similar al utilizado previamente en estudios sobre tolerancia de metales [24, 8]. Se realizaron pruebas para detectar resistencia a cobre, mercurio, telurito, níquel, plomo, zinc, vanadio, cobalto y cadmio. Estos elementos se seleccionaron en base a las actividades industriales llevadas a cabo en las adyacencias del reservorio de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 7. El 50% de las cepas ensayadas mostraron resistencia al menos a dos de los metales probados. El aislado clasificado como *Enterobacter cloacae* exhibió resistencia a siete de los nueve metales ensayados. No se detectó ningún aislado bacteriano con resistencia al cobalto, bajo las condiciones ensayadas.

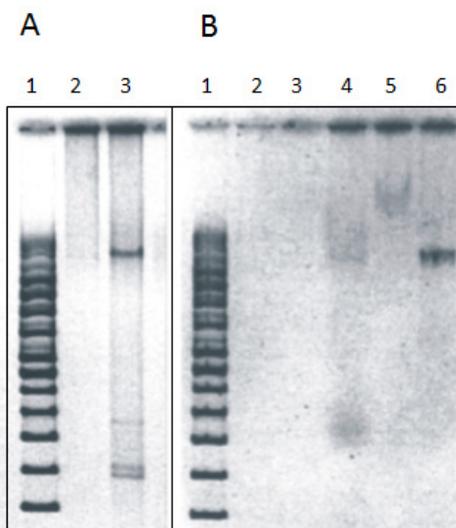
Los resultados generales de resistencia a los antimicrobianos mostraron que el 75% de las cepas aisladas expresaron resistencia al menos a seis de los 23 agentes antimicrobianos ensayados, siendo *Oerskovia* sp, *En-*

terobacter cloacae y *Pseudomonas cepacea* las que exhibieron fenotípicamente un mayor número de determinantes de resistencia.

3.4 Aislamiento y caracterización de plásmidos

La presencia de ADN plasmídico se determinó empleando electroforesis en geles de agarosa reveló la presencia de bandas discretas de moléculas superenrolladas (Figura 32). El 80% de las bacterias evaluadas fueron portadoras de uno o más plásmidos (Tabla 7), con un tamaño variable de 2,8 a más de 60 kpb. No se detectaron patrones comunes de tamaño de plásmidos. *Enterobacter cloacae*, que exhibe resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos, contiene hasta seis moléculas de plásmido diferentes. Hasta el momento, la presencia de plásmidos en *Orskovia* no ha sido detectada por los métodos utilizados.

Figura 32. Registro fotográfico de la corrida electroforética del aislamiento de plásmidos. A: Aislamiento de ADN plasmídico empleando el método de lisis alcalina. Carril 1: Marcador de tamaño molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: *Pseudomonas cepacea*. B: Aislamiento de DNA plasmídico empleando el método de Kado y Liu. Carril 1: Marcador de peso molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: cepa de *E. coli* DH5a (control sin plásmidos), Carril 4: *Pseudomonas* sp, Carril 5: *Pseudomonas aeruginosa*, Carril 6: *Pseudomonas fluorescens*.



Debido a que todas las bacterias examinadas fueron aisladas de un ambiente contaminado, se sospecha que están sometidas a altas presiones selectivas y, en consecuencia, comparten algunos de los determinantes de resistencia detectados. Con el fin de establecer una relación entre las moléculas plasmídicas y los fenotipos de resistencia, se llevaron a cabo experimentos para determinar la capacidad de transferencia de estas moléculas plasmídicas. Ningún plásmido fue movilizado por conjugación, en las condiciones utilizadas. Por lo tanto se realizaron ensayos de transformación, utilizando el aislamiento plasmídico de las cepas estudiadas. Se obtuvieron resultados positivos con los plásmidos de *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas cepacea* y *Pseudomonas* sp. La caracterización fenotípica de las células transformantes permitió detectar que ocurrió co-transferencia simultánea de varios determinantes de resistencia.

4. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios en los cuerpos de agua realizados en Venezuela, se han enfocado en la determinación y cuantificación de coliformes totales y/o fecales. Este trabajo fue enfocado como un estudio microbiológico preliminar de la comunidad bacteriana presente en el embalse Pao-Cachinche, ubicado en la región centro-norte de Venezuela.

Este embalse es la fuente principal de abastecimiento de agua para la planta “Alejo Zuloaga”, que suministra agua potable a tres millones de personas aproximadamente, ubicadas en varias localidades de los estados Carabobo y Cojedes; además de surtir agua para desarrollar diversas actividades agropecuarias.

Éste, al igual que otros embalses, está sufriendo un proceso de eutrofización debido al vertimiento de aguas domésticas sin tratamiento o con tratamiento deficiente, que provienen en su mayoría de la ciudad de Valencia, así como de aguas de desecho desde granjas avícolas y porcinas cercanas [15, 17, 18].

Al comienzo de la temporada de lluvias los afluentes de Pao-Cachinche introducen la materia orgánica y nutrientes acumulados durante la estación seca, lo que causa el aumento de la mayoría de los parámetros fisicoquímicos estudiados [17], lo que a su vez trae como consecuencia, un aumento en la abundancia de bacterias, tal como se observó en la estación E1, en la que los títulos bacterianos fueron 10 veces más altos en mayo que en noviembre, mientras que en la estación E2 el título permaneció invariable en las dos épocas estacionales (Tabla 5). Posiblemente, este comportamiento se debe a que la estación E2 se encuentra aguas arriba de la estación E1, lo cual trae como consecuencia que las descargas de materia orgánica durante la época de lluvia, sea arrastrada hacia la estación E1.

La distribución de las poblaciones bacterianas varió de acuerdo con los cambios climáticos de las temporadas de muestreo. En el período de inicio de la sequía (noviembre), se determinó que predominaban las bacterias pertenecientes al grupo coriniforme (*Oerskovia*), aunque también se encontraron *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas vesicularis*. Igualmente, en esta época, cuando llegan con más caudal los afluentes provenientes de las granjas avícolas y porcinas, con poca afluencia de aguas de arrastre originadas por lluvias, se observa la presencia de *Enterobacter cloacae*, con mayor predominio en la estación E2 (datos no mostrados).

Con respecto a la abundancia de las especies bacterianas, se pudo determinar que en ambas estaciones predominaron las bacterias Gram-negativas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tabla 6), que se caracterizan por ser ubicuas. Sin embargo, es importante destacar que en estas muestras de agua pueden estar presentes otras especies bacterianas (cultivables y no cultivables) en una menor proporción, pero que no están incluidas en este estudio. En un futuro, serán investigadas aplicando métodos de enriquecimiento adicionales y condiciones de selección apropiadas, así como estudios metagenómicos.

Con respecto a los perfiles de resistencia a antimicrobianos, se pudo evidenciar que todos los aislados bacterianos presentaron resistencia

al menos a uno de los antibióticos ensayados (Tabla 6). Más específicamente, se encontró que las bacterias del género *Pseudomonas* fueron resistentes al menos a cuatro de los antibióticos ensayados, mientras que *Bacillus* spp. fue el único aislado que presentó un solo determinante de resistencia (ampicilina) (Tabla 6). Precisamente, el 66,6% de los aislados fueron resistentes a este antibiótico beta-lactámico, muy probablemente debido a que este antimicrobiano se utiliza ampliamente en la práctica clínica, lo cual confiere ventaja en ambientes en los que se encuentra la presión selectiva. La presencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos en ambientes acuáticos ha sido ampliamente reportada a nivel mundial [25, 26, 27, 28], pero son pocos los reportes a nivel Latinoamericano.

La presencia de bacterias multirresistentes en el embalse Pao-Cachinche podría representar un posible peligro para la salud debido a la ingesta accidental de estas aguas por parte de seres humanos y/o de animales, debido a los patrones de resistencia a antibióticos que presentan los géneros bacterianos identificados. Un ejemplo de ello podrían ser *P. fluorescens* y *Micrococcus roseus*, que usualmente se encuentran en ambientes acuáticos y en el suelo, y que generalmente no se asocian con infecciones en humanos, a excepción de personas con compromisos en el sistema inmunitario. Sin embargo, una vez que ingresa al cuerpo, puede causar cuadros de septicemia severos, y cuyo manejo terapéutico se complicaría debido a los perfiles de resistencia combinados que presentan a beta-lactámicos como: cefonida (cefalosporina de segunda generación), cefalotina (cefalosporina de primera generación), cefamandol (cefalosporina de tercera generación) y a trimetoprim-sulfametoxazol (sulfonamida).

Tanto los antibióticos beta-lactámicos como las sulfonamidas son ampliamente empleados en la práctica clínica y veterinaria, y junto con la práctica de la automedicación, ejercen una presión selectiva que favorece a aquellas bacterias que poseen los determinantes de resistencia a antibióticos. Como una estrategia para contener el aumento de la resistencia bacteriana en Venezuela, el 2 de enero de 2006, se publicó la resolución N° 604 de la Gaceta Oficial Venezolana N° 38.348, que sigue vigente, mediante la cual la dispensación de

medicamentos antimicrobianos en farmacias, servicios farmacéuticos y cualquier otro establecimiento debidamente autorizado debe realizarse mediante la presentación de la prescripción facultativa. Los medicamentos antimicrobianos aludidos en la resolución son aquellos de uso sistémico de las siguientes clases: fluoroquinolonas, macrólidos—lincosamidas, cefalosporinas de tercera generación, y aquellos cuyo principio activo sea rifampicina. Sin embargo, se ha reportado la ausencia de cambios en las tendencias de consumo de los antimicrobianos después de la aplicación de esta normativa [29, 30]. Es por este motivo que se sugiere la implementación de estrategias complementarias a la regulación de la dispensación de antibióticos para lograr el éxito de dicha medida.

La multirresistencia a antibióticos está muy relacionada con la resistencia a metales pesados. Para completar la caracterización fenotípica de las bacterias aisladas del embalse Pao-Cachinche también se realizaron pruebas de resistencia a sales de cobre, mercurio, telurito, níquel, plomo, zinc, vanadio, cobalto y cadmio. A nivel internacional, las áreas contaminadas por metales pesados usualmente están asociadas a actividades humanas como la descarga de desechos, derrames accidentales de diversas industrias metalúrgicas o la minería. Las sales y los compuestos metálicos también se usan a menudo como agentes antimicrobianos en medicina y como biocidas en hospitales y otros entornos. Las bacterias, que sobreviven en tales ambientes, han desarrollado o adquirido sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las altas concentraciones de iones metálicos. En este estudio, más del 70% de las cepas presentó resistencia al menos a dos de estos elementos. Entre las bacterias estudiadas destacó el aislado de *Enterobacter cloacae* que exhibió resistencia a siete de los nueve metales ensayados. Ninguna cepa evidenció resistencia fenotípica al cobalto.

Durante la evolución bacteriana, la habilidad de las bacterias para dominar nuevos ambientes y responder a presiones diferentes, puede ser explicada por la adquisición y selección de nuevos genes por transferencia horizontal, más que por modificaciones secuenciales debidas a la acumulación de mutaciones puntuales. Por ejemplo: la

diseminación de los genes de resistencia a antibióticos y de los genes capaces de degradar compuestos xenobióticos y tóxicos, es debida, principalmente, a la transferencia horizontal de estos marcadores, seleccionados por el aumento en las concentraciones de estos compuestos en el ambiente. El principal vehículo para esta transferencia horizontal son los plásmidos, los cuales pueden transportar a otros elementos accesorios, como por ejemplo: los transposones y las secuencias de inserción, entre otras. Debido a la estrecha relación que existe entre la resistencia a antibióticos y a metales pesados en plásmidos, se procedió a determinar la presencia de estas moléculas extracromosomales en los aislados bacterianos en estudio. Los resultados permitieron evidenciar la presencia de plásmidos en más del 80% de las cepas analizadas. Siete de ellas poseen al menos dos bandas claramente diferentes. Los tamaños de las moléculas extracromosomales varían desde 2,8 kpb hasta más de 20 kpb. En el caso de *Enterobacter cloacae*, uno de los aislados con mayor número de determinantes de resistencias, presentó seis moléculas distintas. Con respecto a las bacterias que no resultaron positivas a la presencia de plásmidos, no se puede asegurar que carecen de ellos, sino que no pudieron ser detectados con los métodos utilizados.

La dispersión de moléculas plasmídicas que contienen determinantes de resistencia a antibióticos en ambientes naturales, es un problema de gran importancia. La constante introducción de nuevos antimicrobianos, y la subsiguiente selección de nuevos mecanismos de resistencia, ocasiona una problemática grave a la hora de tratar a los pacientes con infecciones bacterianas. Son muchos los estudios que se han realizado en ambientes hospitalarios para conocer la dispersión de estas bacterias, sin embargo, en Venezuela no se realizan frecuentemente en ambientes naturales. Los resultados aquí reportados permiten sugerir que las bacterias que albergan plásmidos con determinantes de resistencia a antibióticos y metales pesados, y que están en ambientes acuáticos, participan como posibles cepas donantes que contribuyen a la propagación de estos genes.

Estas bacterias estudiadas provienen de un ambiente con una fuerte presión selectiva, comparten marcadores de resistencia a diversos

agentes antimicrobianos, y en su mayoría portan plásmidos, los cuales podrían ser transferibles. Para demostrar este punto, se realizaron ensayos de transferencia del material genético. Los resultados obtenidos indican que se logró transformar a una cepa receptora de *Escherichia coli* con el material genético extracromosomal de cuatro de las cepas en estudio, ubicadas taxonómicamente en otros géneros bacterianos, comprobándose la transferencia de los marcadores de resistencia presentes en ellas. Los resultados revelan que no solo se transmite la resistencia por la cual se seleccionaron las diferentes transformantes, sino que adicionalmente se co-transferen varios marcadores. Los ensayos de transferencia por conjugación no fueron exitosos, pero se debe tener en cuenta que, si bien estos protocolos de conjugación permiten detectar la transferencia de material plasmídico, no se aproximan a las condiciones en las que la conjugación se lleva a cabo en el ambiente. En la mayoría de los casos las bacterias se encuentran formando biopelículas, en condiciones de escasez de nutrientes, las cuales son muy distintas a las empleadas en los protocolos estándares de conjugación con células planctónicas en medios nutritivos. Se ha reportado que existe una conexión entre la conjugación bacteriana y la formación de biopelículas. Esto sugiere que una consecuencia ecológica importante derivada del uso de los antibióticos y los biocidas en la medicina, veterinaria y la agricultura, puede haber sido la selección de cepas que contengan plásmidos y que sean aptas para formar o estar presentes en biopelículas. Se plantea para el futuro realizar más ensayos de conjugación en condiciones de formación de biopelículas con las cepas estudiadas.

Debido a que la contaminación ha alcanzado niveles alarmantes, el embalse Pao-Cachinche fue declarado en emergencia, y sometido a la aplicación de un proceso de desestratificación artificial [31], el cual controló efectivamente los efectos de eutrofización después de un año de operación continua. En la actualidad se realiza un estudio microbiológico de muestras tomadas después de la medida de mitigación (manuscrito en preparación), para comparar con los resultados obtenidos.

3. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que en el embalse Pao-Cachinche existe una biodiversidad bacterianas, que se caracteriza por presentar moléculas de ADN plasmídico que les confieren resistencia a antibióticos y a metales pesados, y que potencialmente, podrían transmitir estos determinantes a través de los diversos mecanismos de la transmisión de la información genética.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación e Innovación PEII No.2012000977 (Caracas, Venezuela), otorgado a Guillermina Alonso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fogarty J., Thornton L., Hayes C., Laffoy M., O'Flanagan D., Devlin J., Corcoran R. "Illness in a community associated with an episode of water contamination with sewage". *Epidemiology and Infection*, vol. 114, no. 2, pp. 289-295. Abr 1995.
- [2] Kummerer K. "Resistance in the environment". *J Antimicrobial Chemother*, vol. 54, no. 2, pp. 311-320. Ago 2004.
- [3] Campeau R.C., Gulli L.F., Graves J.F. "Drug resistance in Detroit river Gram-negative bacilli". *Microbios*, vol. 88, no. 357, pp. 205-212. 1996.
- [4] Goñi-Urriza M., Capdepuuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C. "Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp". *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, no. 1, pp: 125-132. Ene 2000.
- [5] Gupta A., Kazuaki M., Lo J.F., Silver S. "Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*". *Nature Medicine*, vol. 5, no. 2, pp: 183-188. Feb 1999.
- [6] Nies D.H. "Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes". *Plasmid*, vol. 27, no. 1, pp. 17-28. Ene 1992.
- [7] Silver S. "Genes for all metals – a bacterial view of the periodic table". *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 20, no. 1, pp. 1-12. Ene 1998.
- [8] Alonso G., Vilchez G., Bruzual I., Rodríguez-Lemoine V. "Characterization of plasmid MIP233 (IncHI3) of the H complex". *Research in Microbiology*, vol. 153, no. 3, pp. 149-153, Abr 2002.
- [9] Kado C.I. "Origin and evolution of plasmid". *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 73, no. 1, pp: 73117-126. Ene 1998.
- [10] Alonso G., Baptista K., Ngo T., Taylor D.E. "Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27". *Microbiology*, vol. 151, no. 11, pp. 3563-3573, Nov 2005.

- [11] Redondo C., Alonso G. “Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas”. *Rev Soc Ven Microbiol*, vol. 27, no. 2, pp. 100-107. 2007.
- [12] Arango Pinedo, C., B.F. Smets. “Conjugal TOL Transfer from *Pseudomonas putida* to *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of Restriction Proficiency, Toxicant Exposure, Cell Density Ratios and Conjugation Detection Method on Observed Transfer Efficiencies”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 51-57. Ene 2005.
- [13] Stewart G., Sinigalliano C. “Detection and characterization of natural transformation in the marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell”. *Arch Microbiol*, vol. 152, no. 6, pp. 520–526. Jul 1989.
- [14] Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., Manaia, C. M. “Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome”. *FEMS Microbiol Rev*, vol. 38, no. pp. 761–778. Jul 2014.
- [15] González, E.J.; Ortaz M.; Matos, M.L.; Mendoza, J.; Peñaherrera, C., Carrillo, V.M. “Zooplankton de dos embalses neotropicales con distintos estados tróficos”. *Interciencia*, vol. 27, no. 10, pp. 551-558. Oct 2002.
- [16] González, E.J.; Ortaz, M.; Peñaherrera, C.; Montes, E; Matos M.L., Mendoza J. “Fitoplancton de cinco embalses de Venezuela con diferentes estados tróficos”. *Limnetica*, vol. 22, no. 1-2, pp. 15-35. 2003.
- [17] González, E. J., Ortaz, M., Peñaherrera, C., Infante A. “Physical and chemical features of a tropical hypertrophic reservoir permanently stratified”. *Hydrobiologia*, vol. 522, pp. 301-310. 2004.
- [18] González, E. J., Ortaz, M.; Peñaherrera C.; Matos M.L. “Fitoplancton de un embalse tropical hipereutrófico (Pao-Cachinche, Venezuela): Abundancia, biomasa y producción primaria”. *Interciencia*, vol. 29, no. 10, pp. 548-555. Oct 2004.
- [19] CVCM, Centro Venezolano de Colección de Microorganismos. Catálogo CVCM. Octava Edición. ISSN: 1316-3604. Ediciones CVCM. Caracas, Venezuela. 2013.

- [20] Angiolillo G., Fernandez S., Falco A., Aranaga C., Alonso G. “Characterization of plasmids from *E. coli* SXT resistant isolates from urinary tract infections in Venezuela”. *Kasmera*, vol. 45, no. 2, pp. 17-31. Nov 2017.
- [21] Birnboim H.C., Doly J. “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA”. *Nucleic Acid Research*, vol. 7, no. 6, pp. 1513-1523. Nov 1979.
- [22] Kado C.I.; Liu S.T. “Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids”. *J Bacteriol*, vol. 145, no. 3, pp. 1365-1373. Mar 1981.
- [23] Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
- [24] Nieto J.J., Fernández-Castillo R., Márquez M.C., Ventosa A., Quesada E., Ruiz-Berraquero F. “Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 55, no. 9, pp. 2385-2390. Sep 1989. Alonso y col., 2002)
- [25] Yin, Q., Yue, D., Peng, Y., Liu, Y., & Xiao, L. “Occurrence and Distribution of Antibiotic-resistant Bacteria and Transfer of Resistance Genes in Lake Taihu”. *Microbes and Environments*, vol. 28, no. 4, pp. 479–486. Nov 2013.
- [26] Nascimento, E., Araújo, M. “Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review”. *Revista Ambiente & Água*, vol. 9, no. 2, pp. 239-249. May 2014.
- [27] Berglund, B. “Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Genes and Correlation to Anthropogenic Contamination with Antibiotics.” *Infection Ecology & Epidemiology* 5. Sep 2015. Doi 10.3402/iee.v5.28564.
- [28] Azzam M, Ezzat S, Othman B, El-DougDoug K. “Antibiotics resistance phenomenon and virulence ability in bacteria from water environment”. *Water Science*, vol. 31, no. 2, pp. 109-121. Oct. 2017.

- [29] Rivas P., Alonso G. “Regulación de la dispensación y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela”. *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 30, no. 6, pp. 592–597. 2011.
- [30] Gomes C., Alonso G. 2013. “Regulación de la dispensación de antibióticos en Venezuela y resistencia bacteriana”. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 55 <http://vitae.ucv.ve>.
- [31] González, E.J; Matos, M.L. Manejo de los Recursos Hídricos en Venezuela. Aspectos Generales. En: B. Jiménez-Cisneros y J.G. Tundisi (Eds.). ISBN: 978-607-9217-04-4. Diagnóstico del Agua en las Américas. Red Interamericana de Academias de Ciencias – Programa de Aguas, Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC. México: 437-447. 2012.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA CUANTIFICAR *Salmonella* spp, PRESENTE EN AGUAS TRATADAS CON FOTOFENTON

Sandra Patricia Rivera Sánchez

Liliana Flórez

Janeth Sanabria

Abstract: Advanced water disinfection processes have shown promising results when evaluated it by using the bacterial indicator *Escherichia coli* (*E. coli*). However, it has also shown that *E. coli* is less resistant to disinfection than other enteric bacteria such as *Salmonella* sp. This study proposes to evaluate the effectiveness of the plate count and NMP techniques against the gold standard DVC-FISH for the quantification of *Salmonella* sp. present in artificial water treated with the photo-fenton disinfection process. For the study, diagnostic tests were performed to calculate the sensitivity, specificity, and predictive values. The study found that the traditional plate count and NMP method, have a higher sensitivity when there is a high concentration of the bacteria. However, when the bacteria concentration is 10^{-2} dilutions, the sensitivity is 51% with the plate count technique and 100% with the NMP technique. In conclusion, the process of disinfection with Foto-fenton, the bacteria couldn't be inactivated or totally inhibited because the bacteria had reversible damages that made them viable but it cannot be cultivated in the method of plate count. It causes high false negative result with this method, but in the NMP method, it became quantifiable whith lower concentrations of the bacteria.

Keywords: *Salmonella* spp; Most Likely Number (NMP); Advanced Oxidation Process; Plate Count; DVC-FISH and Validation of methods.

Resumen: Los procesos avanzados de desinfección de aguas han arrojado resultados prometedores al ser evaluados utilizando el indicador bacteriano *Escherichia coli* (*E. coli*). Sin embargo, también se ha demostrado que *E. coli* es menos resistente a la desinfección que otras bacterias entéricas como *Salmonella* spp. Este estudio propone evaluar la efectividad de las técnicas recuento en placa y NMP frente al gold estándar DVC-FISH para la cuantificación de *Salmonella* sp., presente en aguas artificiales tratadas mediante el proceso de desinfección foto-fenton. Para el estudio, se realizaron pruebas diagnósticas donde se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Se observó que el método tradicional recuento en placa y NMP, tienen una mayor sensibilidad cuando hay alta concentración bacteriana. Sin embargo cuando se tiene a una dilución 10^{-2} , la sensibilidad es del 51% con la técnica recuento en placa y del 100% con la técnica NMP. En conclusión, el proceso de desinfección con Foto-fenton, las bacterias no lograron ser inactivadas o inhibidas totalmente, debido a que presentaron daños reversibles que las hacen viables no cultivables en los métodos de recuento en placa presentando altos falsos negativos, pero en medios líquido como el método NMP se hizo cuantificable al tener bajas concentraciones de la bacteria.

Palabras clave: *Salmonella* spp; Número Más Probable (NMP); proceso de oxidación avanzada; Recuento en placa; DVC-FISH y Validación de métodos.

1. INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento demográfico, experimentado en los últimos 80 años ha generado un deterioro progresivo de la calidad de las fuentes naturales de agua. Los desechos descargados en estas fuentes contienen y propician el desarrollo de una gran diversidad de organismos patógenos, como virus, bacterias, protozoos, hongos y huevos de helmintos. Estas aguas contaminadas representan un riesgo especialmente para comunidades rurales donde la cobertura y calidad del servicio de potabilización es deficiente [1]. Los procesos de desinfección no siempre están presentes en estas comunidades puesto que se presentan dificultades en el acceso al agente desinfectante, en su almacenamiento, manipulación, y se carece de capacidad técnica para llevar a cabo el proceso [2]. Lo dicho anteriormente hace que se facilite el aumento de eventos de interés en salud pública de origen gastrointestinal, relacionados con el consumo del agua, [3,4] y entre estos tenemos Enfermedad Diarreica AGUDA –EDA-, Intoxicación alimentaria, Hepatitis y otras [4,5].

La Organización Mundial de la Salud notifica que la enfermedad diarreica aguda (EDA) ocasiona el 4% de todas las muertes y el 5% de pérdida de la salud por discapacidad, a nivel mundial. Asimismo constituye un problema de salud pública a nivel mundial, con una incidencia de 4 mil millones de episodios (nuevos casos) al año. Finalmente, el 80% de estas muertes acontecen en los menores de 5 años, por lo tanto factores como el agua, el hacinamiento y la malnutrición favorecen la frecuencia, diseminación y gravedad de las diarreas [4,6].

En Colombia los agentes causantes de EDA, que se vigilan a través de Salud Pública y el Instituto Nacional de Salud son: *E. coli*, O157: H7, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. La *Salmonella serovariedad* Typhimurium, ocupa el primer puesto como agente causante de EDA, desde el año 2004 INS [7]. Por esta razón son fundamentales las Pruebas Diagnósticas eficientes, es decir con una alta especificidad, sensibilidad y valores predictivos

negativos y positivos [8]. Así mismo se debe tener en cuenta que el diagnóstico del 90% de los eventos de Interés en Salud Pública se hacen por pruebas diagnóstica y el 10% se hace por clínica.

Por otro lado, existen limitaciones en las pruebas diagnósticas para determinar la inocuidad de los alimentos en cuanto a *Salmonella* spp, debido a que existen métodos de presencia-Ausencia y no de cuantificación. Así mismo existe otra limitación al evaluar la calidad del agua, cuando se emplea microorganismos coliformes a modo de indicadores de contaminación fecal, como tradicionalmente se ha venido haciendo en Colombia al reconocer el indicador estándar *Escherichia. coli* (*E.coli*). Sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de (*E.coli*), no implica inocuidad de las aguas tratadas, puesto que se presentan marcadas diferencias en la resistencia al tratamiento y comportamiento ambiental de los diferentes patógenos, e incluso, de otros microorganismos indicadores. También se ha encontrado que no existe correlación entre *E.coli* y *Salmonella* sp. Esto indica que el hecho de que no se encuentre *E.coli* en una muestra, no implica necesariamente la ausencia de otros patógenos [9].

La cloración es el método más usado para desinfección de aguas para consumo, pero la formación de subproductos cancerígenos durante su aplicación ha motivado el estudio de procesos alternativos [10]. Los procesos de oxidación avanzada (PAOS) han arrojado resultados prometedores, al ser evaluados utilizando el indicador bacteriano *Escherichia coli* (*E. coli*) [11,12], con el método recuento en placa. Sin embargo, también se ha demostrado que *E. coli* es menos resistente a la desinfección que otras bacterias entéricas como *Shigella* y *Salmonella*, y que estos procesos generan bacterias viables no cultivables, las cuales no son detectables en medios sólidos. Dadas las anteriores consideraciones el objetivo de este trabajo consistió en validar un método de cuantificación de estas bacterias que sea rápido, económico, fácil de manipular y confiable, como es la técnica de Número Más probable NMP.

Esta investigación genera un gran impacto en el área ambiental debido a que en Colombia es la primera investigación que se realiza,

comparando métodos moleculares con métodos convencionales para cuantificar bacterias estresadas específicamente, *Salmonella* spp, después de un proceso de desinfección. Por tal motivo, los resultados obtenidos de esta validación se podrá emplear en un futuro para cuantificar *Salmonella* spp., en las diferentes plantas de tratamiento de agua del país. Aportando al desarrollo una metodología que cuantifica *Salmonella* sp, en los procesos de desinfección de aguas con métodos tradicionales o avanzados como el utilizado en esta investigación, Foto-fenton. Por otro lado, aporta evidencia para medir la magnitud de los eventos de Interés en Salud Pública, al aumentar el número de casos detectados, mejorando los protocolos de calidad del agua e identificar tempranamente los eventos de inicio brotes para un efectivo control.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se desarrolló en el campus de la Universidad del Valle, en el área de Ingeniería sanitaria ambiental y el estudio microbiológico se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad del Valle. Este trabajo fue financiado por el proyecto BIOSOLAR- DETOX en el marco del convenio cooperación EPFL (École Polytechnique Fédérale de Laussane) de Suiza y Univalle.

En este trabajo se realizó fotocatalisis a la cepa ATCC 15490, de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, para evaluarla por los tres métodos microbiológicos NMP, recuento en placa y Conteo directo de bacterias viables, HIBRIDACIÓN *IN-SITU* (DVC-FISH), validando así la técnica del NMP para *Salmonella* sp., cuando está estresada por Foto-Fenton. Se aclara que primero se realizó productividad y selectividad de medios, luego se estandarizó el NMP para *Salmonella*, pero estos datos ya fueron publicados en artículo, [13], por lo tanto en este capítulo de libro nos centraremos sólo en la validación del NMP, para cuantificar *Salmonella* cuando ha pasado por un proceso de desinfección (posiblemente viable no cultivable), datos obtenidos de la tesis [14].

2.1. Descripción de la validación del NMP.

Se le realizó fotocátalisis homogénea a la cepa de *Salmonella* serovariedad Typhimurium ATCC 15490. Al producto tratado se le midió en contenido bacteriano usando tres métodos: el NMP estandarizado, recuento en placa en agar nutritivo y con el método estándar de oro, para lo cual se seleccionó el método de Conteo Directo de bacterias viables por Hibridación *In-situ* (DVC-FISH)

2.2. Ensayos de fotocátalisis homogénea in vitro.

Reactores. Se emplearon reactores tipo batch fabricados en vidrio tipo Pirex[®] con una capacidad de 80 mL y un diámetro de 3.5 mL, con una tapa del mismo material.

Equipo. Para los ensayos fotocatalíticos se empleó un simulador solar SUNTEST de HANAU, que funciona con una lámpara de xenón de 1000 W de potencia, emitiendo un espectro compuesto por 0.5% de los fotones de longitud de onda de 300nm (UV- C) y alrededor del 7% entre 300 y 400 (UV- B, A). El espectro emitido entre 400 y 800 nm es comparable que al espectro solar.

Catalizador. Se empleó el oxidante peróxido de hidrógeno, el cual es usado en muchos sistemas directamente o con un catalizador, por otro lado, el catalizador usualmente más utilizado para este proceso es el denominado “Sulfato de hierro”.

2.2.1. Técnicas de recuento a emplear.

NMP. Después de tratadas, las bacterias con fotocátalisis se realizó el recuento por el NMP, que es el método que se propone para contar este tipo de bacterias. Se usó en la fase presuntiva caldo Lactosado (Difco) y en la fase confirmativa caldo Rappaport (Merck).

DVC-FISH. En este paso se combinan los métodos de DVC y FISH para enumerar bacterias del género *Salmonella*, lo primero que se hace es tomar las muestras de solución salina al 085% con *Salmonella* serovariedad Typhimurium, que han sido tratadas con Foto-Fenton

y se diluyen en agua Peptonada al 0.1% (Oxoid) en 6 diluciones; seguidamente se adicionan en un tubo con caldo lactosado (Difco) y extracto de levadura y antibiótico, esto con el objetivo de elongar las células bacterianas viables. Lo que hace el antibiótico es evitar que se multiplique la bacteria, evitando que se aumente el recuento bacteriano inicial, porque inhibe la bipartición en el septo bacteriano [15]. Asimismo, en esta fase lo que sucede es que las bacterias estresadas por el proceso de desinfección como el Foto-Fenton toman las proteínas del caldo y se reactivan, elongándose con el antibiótico. Posteriormente, se fijaron las células bacterianas con Paraformaldehído al 4% para luego hibridarse con las sondas correspondientes para poder hacer el conteo de bacterias viables. Finalmente, se contó o el número de bacterias fluorescentes en un microscopio adaptado para tales fines, con el filtro DAPI y Fluorocromo DAPI.

Recuento en placa. Después de realizada la fotocatalisis con el Foto-Fenton se realizaron 6 diluciones en agua Peptonada al 0.1% (oxoid) y se procedió a sembrar en agar nutritivo (Merck) 100 ul de muestra, por duplicado y se incubaron las cajas a 35+/-1°C por 18-24 horas. Después se hicieron los recuentos.

Por último se compararon los recuentos tanto de recuento en placa, DVC-FISH y NMP.

Sondas. Se usó la sonda, Sal 3; 5'- AATCACTTCACCTACGTG-3' (Microsynth), para hibridizar el 23S rRNA de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, según Nordentoft y colaboradores [16].

2.2.2. Filtros para Microscopio de Fluorescencia. Filtros DAPI

Procedimiento. Lo primero que se hizo fue reactivar la cepa ATCC, que estaba preservada en glicerol al 30%, como en los anteriores procedimientos, se partió de un cultivo de 18 horas de incubación en caldo nutritivo (Oxoid), en segundo lugar se le hicieron lavados con el agua Peptonada bidestilada Milli-Q al 0.1% y se ajustó la concentración inicial a una concentración de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ con la escala de McFarland # 0.5, seguidamente se llevó a una concentración final

de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ en 600 mL de solución salina al 0.85%: una vez en este punto, se hizo la siembra en los tres métodos, recuento en placa, NMP y DVC-FISH, para medir concentración inicial.

Muestreo tiempo cero. Se toman 1 mL de muestra del erlenmeyer que contiene una concentración final de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ suspendidas en 600 mL de solución salina al 0.85% y se siembran en 9 mL de agua Peptonada al 0.1%, haciéndose 6 diluciones seriadas. Seguidamente se siembran 1 mL de estas diluciones en 9 mL de caldo lactosado (Difco) se incuban a 35°C x 18-24 horas, iniciándose la fase presuntiva del NMP.

Por otro lado se toman 9 mL del erlenmeyer con concentración 1.5×10^3 bacterias de *Salmonella* serovariedad Typhimurium y se le adiciona 1 mL de antibiótico ácido Nalidixico a 40ug/ mL más 1 mL del caldo Lactosado (Difco) con el extracto de levadura, se incubó por 18 horas en oscuridad a 35°C, empezando así la primera fase del DVC-FISH. En donde el fundamento del antibiótico como ya se había descrito anteriormente, es elongar las bacterias viables, pero evitando la bipartición de la bacteria es decir su multiplicación porque actúa a nivel del septo bacteriano.

Del mismo erlenmeyer con concentración bacteriana de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ se toman 100µl de muestra directamente y se siembran en agar nutritivo con el asa de vidrio, esto se hace por duplicado y se incuban por 24 horas a 35°C, de esta manera se mide el tiempo cero por los tres métodos de recuento.

Preparación de soluciones. Posteriormente se prepararon las soluciones para hacer la fotocatalisis con Foto-Fenton, entonces se partió de los reactivos FeSO₄·7H₂O (Merck) y H₂O₂ (olabs 30%).y se llevaron inicialmente a una concentración de 2000 pmm el H₂O₂ y a 200 pmm el ion Fe²⁺. Después, se agregaron 80 mL de solución salina al 0.85%, que contenía la cepa *Salmonella* serovariedad Typhimurium ajustada a una concentración de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹, a los 7 reactores tipo Pirex®, luego se adicionaron los reactivos de la desinfección llevándose a una concentración final de 2 ppm de Fe²⁺ y 20 ppm de H₂O₂, dentro de los reactores. Cómo se colocaron de a 7 reactores por

experimento en el simulador solar SUNTEST de HANAU, se eligió un reactor tapado con papel, como control negativo del experimento y finalmente se inició la desinfección por 10 minutos. En segundo lugar después de la desinfección con Foto-Fenton se procedió a hacer 6 diluciones por reactor en aguas peptona al 0.1%(Oxoid) y se sembraron en los 3 métodos, recuento en placa, NMP y DVC-FISH, para evaluar los recuentos bacterianos. Y así sucesivamente se realizaron los experimentos hasta completar un total de 52 muestras tratadas con Fotofenton, según diseño planteado.

Muestreo después de los 10 minutos de desinfección. Se retiró al azar uno de los reactores de cada experimento. Siete en total. Frente al mechero, y con la mayor agilidad posible, se tomó una muestra de 1mL (con una micropipeta de volumen fijo y una punta estéril diferente para cada reactor) del centro de cada uno de los dos reactores retirados y a 1cm de profundidad (aproximadamente). Seguidamente, se depositó la muestra de cada reactor en un tubo con 9mL de agua peptonada estéril (0.1%) (Oxoid). Posteriormente se taparon los reactores y se regresaron de inmediato al simulador solar, e inmediatamente se llevaron a la oscuridad (a temperatura ambiente) para evaluar reactivación.

Como ya se mencionó anteriormente, después de los 10 minutos de desinfección, las muestras de 1 mL extraídas de cada reactor y depositadas en los tubos con 9 mL de agua Peptonada al 0.1%, se utilizan para hacer diluciones decimales seriadas. Seguidamente se siembra en superficie 100µl de las 6 diluciones por duplicado en cada medio de cultivo agar nutriente (Oxoid). Posteriormente se incuban por 24 horas a 35°C y finalmente se hace el conteo de las UFC presentes en cada caja.

Por otro lado, de las mismas diluciones se transfiere 1 mL de muestra a 9 mL de caldo lactosado (Difco) haciendo las 6 diluciones de cada reactor, se incuban a 35°C por 24 horas, empezando así la fase presuntiva del método NMP.

Finalmente los 8.8 mL de muestra sobrante de cada dilución se le agrega 1 mL de antibiótico a 40ug mL⁻¹ junto con 1 mL de caldo Lactosado

con extracto de levadura, incubando, estos tubos en oscuridad por 18 horas a 35°C. Dando inicio a la primera fase del DVC-FISH. Toda la metodología de esta fase se puede apreciar en la figura 1b.

Evaluación de la Reactivación bacteriana. Con el objetivo de ver si existe un efecto residual post-tratamiento sobre la *Salmonella* y determinar el tiempo mínimo de exposición para obtener desinfección total del agua, en este trabajo se almacenó a temperatura ambiente y en la oscuridad los reactores con el agua artificial tratada, posteriormente se realiza siembras en los tres métodos recuento en placa, NMP y DVC-FISH, a las 48 horas después, de haber terminado los tratamientos foto asistidos.

2.3. Análisis Experimental.

Tipo de estudio. Estudio Experimental

Población. Se emplearon cepas ATCC 15490 de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, que fueron tratadas o estresadas con fotocátalisis homogénea.

Tamaño de muestra. Se planteó que la técnica DVC-FISH es el gold estándar para conteo de bacterias viables no cultivables, donde su Especificidad (E_0) es del 99% y su Sensibilidad (S_0) del 99% según Legues y Diaz [17]. Se utilizó el tamaño de muestra para estudios de validación de criterio, teniendo en cuenta que lo que se quiere medir es una proporción poblacional, donde el valor real de la proporción en la población esperada es S_0 (Sensibilidad del gold estándar), considerando un nivel α de significación y un poder $(1-\beta)$ para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones S_0 y S_1 (Sensibilidad método a evaluar) [18].

Igualmente la proporción esperada de E_0 (Especificidad del gold estándar) considerando un nivel α de significación y un poder $(1-\beta)$ para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones E_0 y E_1 (Especificidad método a evaluar).

Teniendo en cuenta que se definieron para la apropiada validez de las pruebas, una Especificidad (E_0) del 90% y una Sensibilidad (S_0) del 90%, valores mínimos comparables con el método gold estándar (DVC-FISH), los cuales son del 99% respectivamente [17], el tamaño de muestra se escogió bajo los siguientes parámetros:

Valor de $Z_{(1-\alpha)} = 1,64$ (Un nivel de confianza del 90%)

Valor de $Z_{(1-\beta)} = 1,04$ (Poder de la prueba del 85%)

Muestra para sensibilidad; $n = 29$ muestra

Muestra para especificidad; $n = 29$ muestras

Obteniendo finalmente un tamaño de muestra total de $n = 58$. Este tamaño de muestra se rea justó por potenciales pérdidas durante el experimento, que por recomendación de expertos en muestreo se consideró en un 10%. Así el tamaño de muestra definitivo fue de 35 para medir sensibilidad y 35 para medir especificidad.

2.4. Diseño Experimental. Pruebas Diagnósticas.

2.5. Selección capacitación y supervisión del personal del laboratorio.

Teniendo en cuenta que se necesitaba personal con un alto perfil para la ejecución del experimento, se seleccionó una estudiante de último semestre de biología para entrenarla en el método de NMP y recuento en placa, a una estudiante de maestría en microbiología para entrenarla en el método molecular DVC-FISH y se entrenó como apoyo para el conteo de recuento en placa a una estudiante de epidemiología. La capacitación se enfocó hacia el buen manejo y ejecución del protocolo correspondiente al método o prueba asignada, así como el buen registro de los datos en Excel. Todo esto coordinado y supervisado por la coordinadora del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad del Valle.

2.6 Recolección y administración de datos. La información se recolectó en Bitácoras, una para cada método o prueba, donde se registraron las acciones que se llevaron a cabo en el experimento. Dicha bitácora contiene todos los sucesos de los experimentos, las fallas que se produjeron, los cambios que se introdujeron y resultado de los mismos. Posteriormente los resultados obtenidos del conteo de las tres técnicas también se registraron en medio magnético (Excel versión 97-2003). Se contó, con el apoyo del jefe o directora del laboratorio quien custodia toda la información recolectada en medio físico y magnético.

2.7 Método de análisis estadístico. Después de realizada la fotocatalisis con Foto-Fenton a muestras de solución salina al 0.85%, (que tenían presente cepas ATCC 15490 de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, a una concentración de 10^3 UFC mL⁻¹, que estaban dentro de los reactores de 80 mL, los cuales fueron la unidad experimental), se realizó la cuantificación bacteriana por los tres métodos NMP y recuento en placa y se compararon los resultados frente a los recuentos hechos con el estándar de oro DVC-FISH. El programa de captura para la información de los tres métodos microbiológicos se diseñó en Excel versión 97-2003; en la captura se realizó control de entrada de datos y se usó la técnica de doble digitación para garantizar la calidad de los mismos. Aquí se hizo entrega de los resultados a la estudiante de Maestría en Epidemiología para revisión y procesamiento, quién fue la misma estadística. Una vez revisada por el profesional en estadística se procedió a exportar la base de datos al programa estadístico SPSS versión 19,0.

El análisis estadístico se realizó inicialmente mediante análisis descriptivo de los conteos en los tres métodos antes y después de la desinfección por foto-Fenton, sin antes realizar una transformación a una base logarítmica base 10. Para posteriormente identificar la media \pm desviación estándar e intervalo de confianza (IC) del 95%, según el caso. Posteriormente, esta variable respuesta cuantitativa se convirtió en una variable cualitativa dicotómica ([+] si detectó bacterias viables ó [-] sino detectó bacterias viables), con el objetivo de medir la capacidad discriminatoria de las técnicas recuento en placa y NMP frente al gold estándar DVC-FISH, donde se calcularon: la

sensibilidad, especificidad, según [8,19] valor predictivo negativo y valor predictivo positivo según Fernández [8], de cada uno de los métodos. Por consiguiente se validó el NMP, mediante las Pruebas de Diagnóstico, para cuantificar bacterias patógenas (*Salmonella Typhimurium*), cuando han sido sometidas a un proceso de desinfección por Foto-Fenton. Ver en la tabla 1 y 2 las variables a tener en cuenta en los dos métodos de recuento DVC-FISH y NMP.

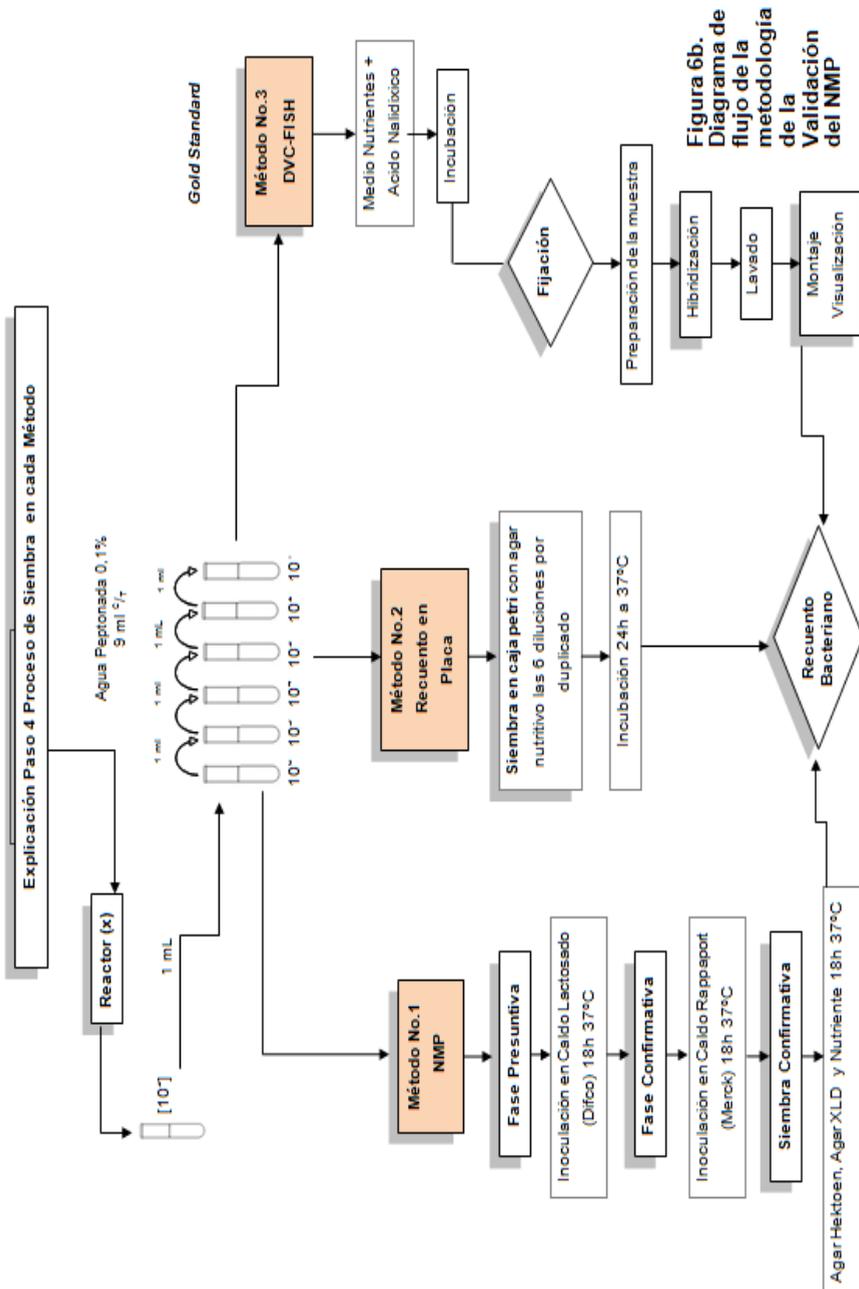
Tabla 8. Definición de variables

Variable	Tipo de variable	Escala	Unidad
Recuento DVC- FISH	Cuantitativa discreta	De razón	Bacteria/ mL
Recuento NMP	Cuantitativa discreta	De razón	NMP/ 100 mL
Recuento en Placa	Cuantitativa discreta	De razón	UFC/ mL

Tabla 9. Definición de variables DVC-FISH

Variable	Tipo de variable	Escala	Unidad
Recuento DVC- FISH	Cuantitativa discreta	De razón	Bacteria/ mL
Recuento NMP	Cuantitativa discreta	De razón	NMP/ 100 mL
Recuento en Placa	Cuantitativa discreta	De razón	UFC/ mL
Tipo de microorganismo	cualitativa	Nominal	Bacteria / mL con tratamiento foto catalítico

Figura 34. Diagrama de Flujo del Proceso Metodológico para la Validación de la Técnica NMP



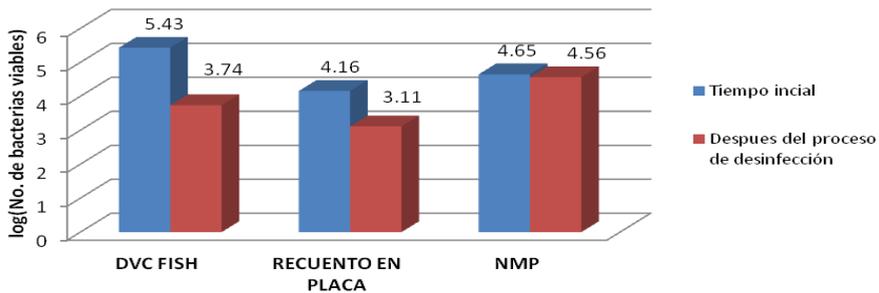
3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, por los tres métodos, DVC-FISH, NMP y recuento en placa, en tiempo inicial y a los 10 minutos de aplicar el proceso de desinfección con Foto-fenton.

La figura 2 muestra la variación de la cuantificación de la concentración inicial bacteriana detectada por los tres métodos, encontrándose que para el recuento en placa la variación fue de 1.2 unidades logarítmicas, comparado frente al DVC-FISH que detectó 5.4 unidades logarítmicas. Asimismo, al hacer la comparación con el método del NMP, frente al DVC-FISH, se encuentra una variación de 0.8 unidades logarítmicas. Es preciso resaltar que al momento de esta medición aun las bacterias no han sido expuestas al proceso de desinfección.

Igualmente, en esta figura se puede apreciar que después de los 10 minutos de exposición al proceso de desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe^{2+} y 20ppm de H_2O_2), el recuento en placa disminuye notablemente al compararse con el recuento inicial, con una variación de 2 unidades logarítmicas, al igual que el método DVC-FISH, mientras que el NMP solo presentó una diferencia de 0.09 unidades logarítmicas. Observándose entre métodos que el DVC-FISH, fue el que más detectó bacterias en el conteo inicial, sin el proceso de desinfección, mientras que el NMP, fue el que detectó después de 10 minutos de desinfección. Por lo anteriormente dicho y teniendo en cuenta que el método del NMP utiliza caldos enriquecidos, se puede concluir que este factor hace que se multipliquen las bacterias y se sobre estime el recuento, cuando se lleva poco tiempo en la desinfección con Foto-fenton.

Figura 35. Cuantificación de *Salmonella* TYPHIMURIUM, por los tres métodos, DVC-FISH, NMP y recuento en placa, en tiempo inicial y a los 10 minutos de aplicar el proceso de desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe²⁺ y 20ppm de H₂O₂)



3.2 Evaluación de las medidas de validez, de los métodos de recuento en placa y NMP, frente al método DVC-FISH, para la cuantificación de inactivación bacteriana con Foto-fenton a los 10 minutos de exposición.

En las tablas 3 - 4 y figura 3 se resumen los resultados obtenidos en las muestras contaminadas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium y con 10 minutos de exposición a la desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe²⁺ y 20ppm de H₂O₂) y evaluadas por los tres métodos, se observa que el método tradicional recuento en placa y NMP, presentan un comportamiento similar en la primera dilución, porque de 35 muestras (verdaderamente positivas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium), estos dos métodos detectan correctamente dichas muestras. Entonces se observa que las dos técnicas evaluadas tienen una mayor sensibilidad cuando la concentración bacteriana es alta. Por el contrario cuando pasamos a una dilución 10⁻², el método de recuento en placa, la sensibilidad pasa al 51%, lo que significa que de las 35 muestras detectó como positivas para *Salmonella* serovariedad Typhimurium la mitad (18 muestras), en cambio NMP, presentó una Sensibilidad del 100%. Lo cual se traduce que el método NMP detec-

ta correctamente las 35 muestras que son verdaderamente positivas según el Gold estándar.

Cuando se evalúan estos dos métodos en la dilución 10^{-3} se observa que la sensibilidad para el recuento en placa baja al 11%, mientras el NMP, se conserva al 100%, lo que indica que NMP, a esta concentración de bacterias reúne los criterios para continuar con el proceso microbiológico de detección de bacterias cuando la concentración es baja. No obstante los resultados para especificidad no se observan porque el método DVC-FISH, no detectó muestras negativas hasta estas primeras 3 diluciones (10^{-1} - 10^{-3})

Al evaluar las tres últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). Se observa que para el método recuento en placa ya su sensibilidad pasó al 0% y su especificidad toma el 100%, es decir que este método convencional en diluciones muy bajas no es nada sensible para detectar bacterias en estado viable no cultivable pero si presenta una alta especificidad para determinar aguas que no tiene presencia de *Salmonella* en este estado. A la par se observa, que en la dilución 10^{-4} este método clasifica o determina como falsos negativos 28 de las 35 muestras. Al igual que en 10^{-5} 20 muestras y 1 muestra en 10^{-6} .

En el caso del NMP en estas últimas tres diluciones, presenta un comportamiento diferente al de recuento en placa, por cuanto clasificó 6 positivas frente a 28 positivas de acuerdo al método de referencia (DVC-FISH), obteniendo una sensibilidad del 21% y clasificando como falsos negativos 22 muestras. En el caso de la especificidad en esta dilución, toma un valor del 71% dejando como falsos positivos 2 de las 7 muestras negativas según el método de referencia.

Por otro lado, en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} el método NMP bajó la sensibilidad a un 0%, dejando como falsos negativos 20 y 1 muestras respectivamente, teniendo en cuenta que el método de referencia los clasificó como positivos. En el caso de la especificidad el NMP en la dilución 10^{-5} la aumentó en 93% dejando un 1 muestra como falsa positiva de las 14 negativas detectadas por DVC-FISH. Para la dilución 10^{-6} la especificidad aumentó en un 100%, lo que implica que el

método NMP clasificó correctamente 14 muestras que igualmente el método de referencia clasificó como negativas.

En cuanto a los valores predictivos positivos y negativos para el método Recuento en placa fueron del 100% en las primeras 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y 0% para las 3 últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}), por el contrario los negativos fueron del 0% para las 3 primeras diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y del 20% para 10^{-4} , seguida del 43% para 10^{-5} y finalmente del 97% para la dilución 10^{-6} .

Comparando estos datos con el método del NMP, se encuentra que, NMP presenta unos valores predictivos positivos del 100%, para las primeras 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), un 75% para la dilución 10^{-4} y un 0% para las diluciones 10^{-6} . En otro sentido los valores predictivos negativos fueron del 0% para las 3 primeras diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), del 18% para la dilución 10^{-4} y del 41.2% para las dos últimas diluciones 10^{-5} y 10^{-6} .

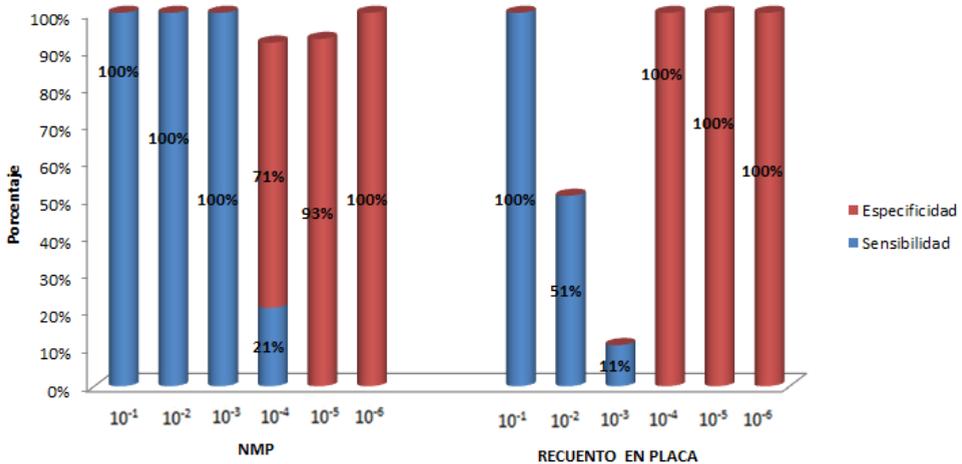
Tabla 10. Medidas de validez del método Recuento en Placa, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2ppm de F2+ y 20ppm de H2O2), para Salmone-lla serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición.

Concen- tración	Método +	DVC FISH		Sensibilidad	Especifi- cidad	VPP	VPN
		-					
10^{-1}	+	35		100%	-	100%	-
	Total	35					
10^{-2}	+	18		51%	-	100%	-
	-	17					
	Total	35					
10^{-3}	+	4		11%	-	100%	-
	-	31					
	Total	35					
10^{-4}	-	28	7	0%	100%	-	20%
	Total	28	7				
10^{-5}	-	20	15	0%	100%	-	43%
	Total	20	15				
10^{-6}	-	1	34	0%	100%	-	97%

Tabla 11. Medidas de validez del método NMP, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2 ppm de F2+ y 20 ppm de H2O2), para *Salmonella* serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición

Concentración	Método +	D V C		Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
		FISH	_____				
10 ⁻¹	+	35	100%	-	100%	-	-
	Total	35					
10 ⁻²	+	35	100%	-	100%	-	-
	Total	35					
10 ⁻³	+	35	100%	-	100%	-	-
	-	0					
Total		35					
10 ⁻⁴	+	6	21%	71%	75%	18.5%	
	-	22	5				
	Total	28	7				
10 ⁻⁵	+	0	0%	93%	0%	41.2%	
	-	20	14				
	Total	20	15				
10 ⁻⁶	-	1	34	0%	100%	0%	97.1%

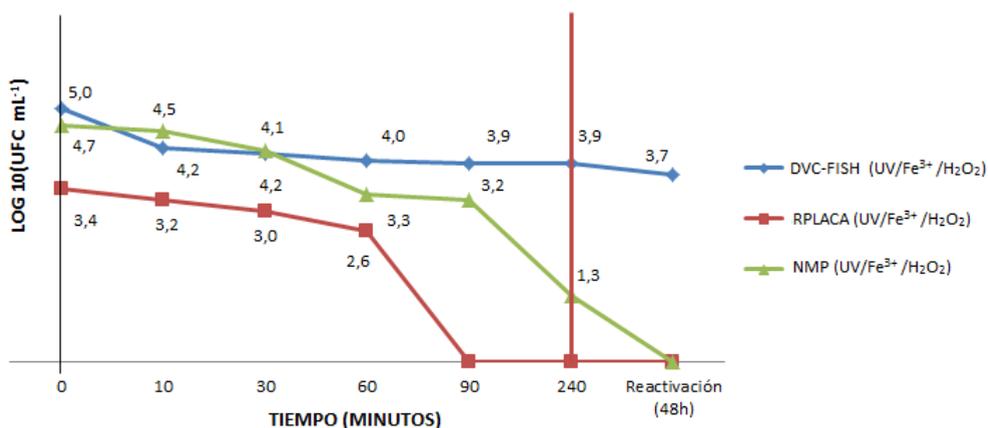
Figura 36. Especificidad y sensibilidad del NMP y recuento en placa, comparados con el método de Referencia o Gold estándar, a los 10 minutos de desinfección con Foto-fenton (2ppm de F_2^+ y 20ppm de H_2O_2).



3.3 Evaluación del proceso de desinfección- Fotocatálisis Homogénea Foto-fenton

Inicialmente se evaluó la respuesta de *Salmonella* serovariedad Typhimurium a la radiación directa de un simulador solar, con presencia del catalizador como $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) y H_2O_2 (Molabs 30%) que fueron llevados a su vez a unas concentraciones finales de (2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2)

Figura 37. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, al realizarse Foto-fenton, (2ppm de Fe²⁺ y 20 ppm de H₂O₂), a través del tiempo (t₀, t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h).



Al realizar el seguimiento de la concentración bacteriana se obtiene curvas de desinfección característica de concentración bacteriana viables totales contra el tiempo de desinfección. En gran número de investigaciones se ha observado que dichas curvas presentan tres zonas importantes. La primera es llamada hombro y en esta se observa una disminución lenta de la concentración bacteriana ya que en el tiempo inicial de la reacción al proceso de desinfección se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de los agentes oxidantes anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En la segunda zona se da un decrecimiento exponencial y las bacterias inician su muerte rápida, después de haber alcanzado su umbral límite de daño necesario y finalmente una zona de inhibición, debida a los subproductos de la reacción, comúnmente, llamada cola, en esta figura 4, se observa que para el método recuento en placa, se cumplen las tres fases características de una curva cinética (Hombro, decrecimiento exponencial y la cola o zona de inhibición). A su vez, el método NMP, solo cumple las dos primeras fases, mientras que para el DVC-FISH, se cumple la primera fase. Esto se debe a que las bacterias entraron en estado Viable no Cultivable por los agentes ox-

idantes o estrés oxidativo, lo cual hace que las bacterias se sean indetectables con métodos convencionales, como ocurrió con el método recuento en placa que a los 90 minutos encuentra el umbral límite de daño, mientras que el método NMP, sigue detectando bacterias viables no cultivables hasta los 240 minutos que termina el periodo de desinfección, igual situación ocurre con el gold estándar DVC-FISH.

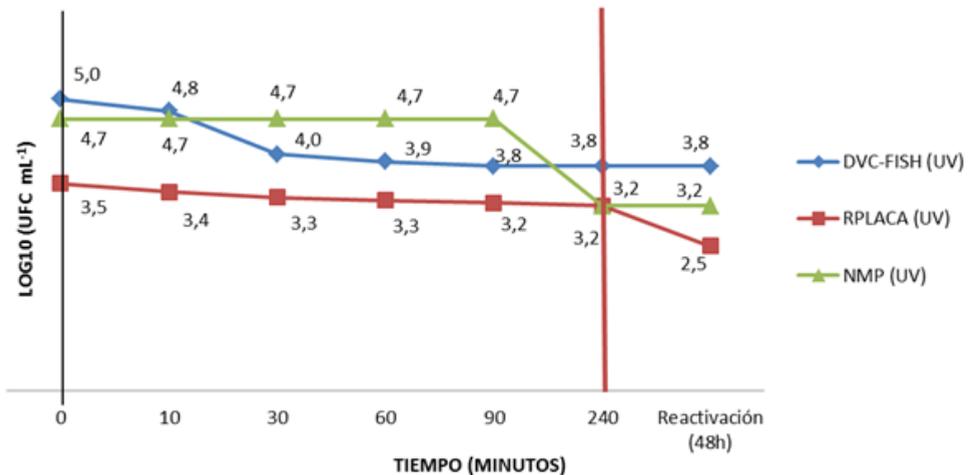
En cuanto al recuento bacteriano, en la figura 4 se observa que el método DVC-FISH cuantifica más bacterias que los otros dos métodos antes de iniciar el proceso de desinfección (tiempo 0), aunque hay que resaltar que con el método NMP la diferencia es solo de 0,3 unidades logarítmicas, mientras que con recuento en placa la diferencia es aproximadamente de 2 unidades logarítmicas y por consiguiente el método NMP es el que tiene recuentos más cercanos al método de referencia en este tiempo inicial (cero). Cuando se sigue la desinfección en el tiempo, se observa que el método NMP a los 10 y 30 minutos detecta más bacterias que el gold estándar DVC-FISH, con la diferencia de 0,3 y 0,1 unidades logarítmicas respectivamente. Esto ocurre porque las bacterias inician un proceso de resistencia al ataque de los agentes oxidantes, que ocasiona un proceso de sobrevivencia donde ocurre una multiplicación bacteriana, causando una sobreestimación. Mientras que en el método DVC-FISH en sus procedimientos utiliza un antibiótico para que las bacterias no formen conglomerados de colonias sino que las bacterias queden sueltas, es decir el antibiótico las separa de las UFC, y hace que a la vez no se multipliquen quedando el número inicial. En el caso del método de recuento en placa en estos dos períodos de tiempo subestima el conteo en 1 unidad logarítmica comparada con el método de referencia DVC-FISH. Siguiendo el tiempo de exposición del proceso de desinfección (Foto-Fenton) se observa que el recuento bacteriano se mantiene en aproximadamente 4 unidades logarítmicas hasta el tiempo de 240 minutos para el método de referencias de DVC-FISH. En el caso de los otros dos métodos su conteo empieza a decaer hasta encontrar el supuesto umbral de daño (muerte total de las bacterias) a los 90 minutos para recuento en placa y la detección de 1,3 unidades logarítmicas para después de 4 horas (240 min) el método NMP.

3.3.1 Recrecimiento pos-tratamiento en la oscuridad. En el período de oscuridad que se inició después de los 240 minutos de exposición al proceso de desinfección hasta completar las 48 horas, se encontró que el método NMP muestra ya el umbral de daño porque no tienen nutrientes, pero si en este momento se le colocaran nutrientes volverían a sobrevivir o activarse, es decir el recuento aumentaría como se ve con el método DVC-FISH, el cual utiliza nutrientes como caldo nutritivo y antibiótico para su conteo, lo que ocasiona que las bacterias no formen conglomerados de colonias sino que las bacterias queden sueltas, como se explicó en el anterior párrafo. Otra posible razón de este fenómeno se explica porque como hay <10 bacterias por mL^{-1} con el NMP a los 240 minutos, estas bacterias siguen haciendo fenton, entonces a las 48 horas de reactivación no se detectan. En cambio el DVC-FISH, demuestra que las bacterias no se murieron sino que conservan su estado viable no cultivable.

3.4. Foto inactivación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium suspendidas en solución salina al 0.85%

3.4.1 Irradiación directa en ausencia de catalizador. Teniendo en cuenta que dentro de la Microbiología es importante evaluar la respuesta *Salmonella* serovariedad Typhimurium a la radiación directa de un simulador solar, en ausencia y presencia de catalizador. También se evaluó el comportamiento bacteriano frente a la ausencia del catalizador, donde la concentración de bacterias cultivables decrece, debido a que la irradiación directa en particular la radiación UV, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y mantenimiento de las poblaciones bacterianas que es más severo a medida que aumenta el tiempo de exposición, denomina fotólisis, como se puede observar en la figura 5, siguiente.

Figura 38. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, cuando son expuestas a la UV, sin el proceso Foto-fenton, a través del tiempo (t0, t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h).



En la figura 5. Se observa la fase características de una curva cinética hombro para el método recuento en placa hasta los 240 minutos, después de este tiempo inicia la etapa de decrecimiento exponencial continuando hasta el período de oscuridad o reactivación. A su vez el método NMP, también cumple las dos primeras fases (hombro y decrecimiento exponencial), haciendo su decrecimiento exponencial a los 90 minutos, pero vuelve a hacer la fase hombro en el periodo oscuridad o reactivación. Analizando el comportamiento del método DVC-FISH, se observa que solo cumple la primera fase (hombro). Por otro lado se observa que a los 240 min de este proceso de fotólisis las bacterias siguen muriendo para el método de recuento en placa, pero para los métodos de NMP y DVC-FISH si se mantienen estables. Esto explica las limitaciones de este método analítico tradicional para oxidar algunos compuestos altamente estables, que pueden aparecer o desaparecer durante los Procesos Avanzados de Oxidación, como posibles productos intermedios del proceso de oxidación.

3.4.2 Recrecimiento pos-tratamiento en la oscuridad. En el Período Oscuridad, a las 48 horas se observa que para el recuento en placa la fase de crecimiento ocurre en esta etapa, mientras que los métodos NMP y DVC-FISH, se mantienen estables y con un recuento un poco más alto.

4- DISCUSIÓN

4.1 Efecto del Foto-fenton en la bacteria *Salmonella* Typhimurium a los 10 minutos de desinfección

¿De acuerdo a los resultados encontrados se puede establecer que durante el proceso de desinfección sí se generan bacterias viables no cultivables que se hacen difícil de detectar con los métodos convencionales.

Por consiguiente dichos resultados son comparables con los encontrados por Baudart y colaboradores [20] 2005, cuando evaluaron la calidad del agua, con los métodos de recuento bacteriano, placa y DVC-FISH.

La detección bacteriana con los medios líquidos (NMP), en esta investigación es más alto a los 10 minutos de desinfección, comparado frente a los otros dos métodos, recuento en placa y DVC-FISH. Esto puede deberse a que en la desinfección con la fotocatalisis heterogénea se puede afectar la vía de asimilación de azúcares como es la vía de Embden-Meyerhof y Entner Doudoroff, pero no la vía de la asimilación de las peptonas o proteínas[21].

Por otro lado para poder llegar a una fase de inhibición o inactivación bacteriana completa con el proceso de desinfección por fotocatalisis se debe Oxidar al Acetil coenzima A, para afectar la cadena respiratoria en el ciclo de Krebs y hacer que el proceso sea irreversible[22].

Finalmente al comparar estas hipótesis con los resultados de este trabajo se puede ver claramente que 10 minutos de desinfección con Fo-

to-fenton o la concentración del catalizador usado y las condiciones como está montado el experimento, no son suficientes porque la bacteria aún continúa en un proceso reversible, por lo tanto, suministrarle medios enriquecidos como los caldos del método NMP y DVC-FISH, puede hacer que las bacterias viables no cultivables regeneren su pared o su daño y puedan ser detectadas en unidades más altas que el recuento en placa.

4.2 Evaluación de la Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos de los métodos de recuento en placa y NMP, frente al Método DVC- FISH, para la cuantificación de inactivación bacteriana con Foto-fenton a los 10 minutos de exposición

4.2.1 Validación del NMP. Antes de que un método sea utilizado corrientemente en un laboratorio, es necesario que una organización exterior, y el propio laboratorio, lo convaliden debidamente.

Por esta razón, se buscaron otros estudios preliminares que emplearán pruebas diagnósticas para evaluar el proceso de desinfección por fotocatalisis, pero no se hallaron. Las páginas consultadas fueron: <http://www.who.int/hinari/en/> y google académico. Asimismo se consultó, el repositorio de revistas con edición electrónica. [Http://www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) y [www.elsevier](http://www.elsevier.com), Las variables consideradas fueron: Desinfección, métodos de recuento, NMP, recuento en placa, DVC-FISH, fotocatalisis, validación de métodos, especificidad, sensibilidad y valores predictivos. En los idiomas inglés y español respectivamente.

Este resultado se debe a que los investigadores de la desinfección se han enfocado, en evaluar el comportamiento del proceso de la desinfección, buscando las concentraciones óptimas de los catalizadores, quizá el tiempo adecuado y otras variables, pero no se ha centrado al mismo tiempo en la sensibilidad y especificidad de los métodos que evalúan estas calidades de aguas.

Por otro lado, el referente académico más cercano encontrado fue el de la investigadora Soler[23] (2006), quien realizó un estudio de comparación de métodos de recuento en placa y NMP para aislar

coliformes totales a partir de muestras de alimentos, pero no halló la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Aún así la investigadora encontró confiables tanto el NMP, como recuento en placa para aislar coliformes totales procedentes de muestras de alimentos.

Pero se debe tener en cuenta que las colonias bacterianas pueden surgir en grupos o células únicas, todas ellas englobadas bajo el término de unidades formadoras de colonias (UFC), El número final depende de la interacción entre las colonias en desarrollo, para el método recuento en placa, haciendo que el mismo presente desventajas, frente a los otros dos métodos NMP y DVC-FISH.

Es decir en el método recuento en placa no siempre las colonias bacterianas crecen lo suficientemente aisladas, fenómeno que contribuye a subestimar el verdadero recuento bacteriano. Es por esta razón que el método recuento en placa presenta resultados con recuentos bacterianos bajos y alta variación en los resultados de sensibilidad, especificidad, VVP y VPN, cuando se comparan frente a los resultados del NMP y DVC-FISH.

Por otro lado al analizarse la proporción de los resultados falsos negativos para el método de recuento en placa se encontró que empieza en la dilución 10^{-2} (17 muestras), dilución 10^{-3} (31 muestras), dilución 10^{-4} (28 muestras), 10^{-5} (20 muestras) y 10^{-6} (1 muestra), pero no detectó falsos positivos lo que determinó un valor predictivo positivo del 100 %, para las diluciones 10^{-1} - 10^{-3} ; por otro lado para el método del NMP, se encuentra que la proporción de falsos negativos empieza en la dilución 10^{-4} con 22 muestras, 10^{-5} (20) y 10^{-6} (1), NMP, indicando esto que existe una sensibilidad del 100% para las tres primeras diluciones. Lo que significa que el método NMP capta correctamente las 35 muestras que son verdaderamente positivas según el Gold estándar, obteniendo un valor predictivo del 100%, en las primeras 3 diluciones.

Esto indica que el método de recuento en placa tiene más falsos negativos cuando se comparan los dos métodos frente al gold estándar DVC—FISH. Estos resultados del método de recuento en placa tienen serias implicaciones económicas y sanitarias ya que el método

está dejando de detectar bacterias viables no cultivables en el proceso de desinfección, que pueden afectar a muchos pacientes inmunodeprimidos con enfermedades de base y/o niños, pero lo que es más delicado, es que el método asegura que se está realizando un proceso de desinfección completo. Al realizarse el análisis del VPP para el recuento en placa, se encontraron valores del 100% para las 3 primeras diluciones, indicando esto que, para la dilución 10^{-1} , de 35 muestras que se desinfectaron con foto-fenton, todas fueron detectadas como positivas por el método, es decir con crecimiento bacteriano.

Al contrario de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , en donde la sensibilidad bajó al 51% y 11% respectivamente, lo que significa que de las 35 muestras (Verdaderamente positivas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium según el patrón de referencia) el método detectó como positivas la mitad, para la dilución 10^{-2} , y para la dilución 10^{-3} , de las 35 muestras, el método solo detectó como positivas 4 muestras, lo que indica que clasificó 17 muestras como falsas negativas, para la dilución 10^{-2} , y 31 muestras para la dilución 10^{-3} , pero no detectó falsos positivos, lo que determinó un valor predictivo positivo del 100%, para ambas diluciones. Por este motivo el software arrojó VPP del 100% para dichas diluciones. Pero este resultado no es real, debido a que para calcular los VPP, se necesita el dato de los falsos positivos de la prueba, los cuales no fueron detectados por el método, si no que por el contrario, hay que resaltar que se detectaron muchos falsos negativos, esto permite que finalmente se altere el resultado de los VPP para estas diluciones.

Por todo lo anteriormente dicho, los resultados de este estudio están a favor de que la técnica evaluada como recuento en placa no es apropiada para su utilización en la evaluación del proceso de la desinfección por foto-fenton, porque se podría descartar un número apreciable de muestras que realmente son positivas, en 10^{-2} (17) y en 10^{-3} (31), esto, debido a que no es capaz de detectar las bacterias viables no cultivables cuando están en concentraciones bajas. Al comparar los resultados de los VPN, se encuentra que para las tres últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}), los porcentajes fueron de 20%, 43% y 97%, respectivamente, indicando esto que, mientras el DVC-

FISH, aun detectaba recuentos bacterianos positivos el recuento en placa los tomó como negativos. Esto pone de manifiesto que el método podría no ser adecuado para descartar una muestra que se ha diagnosticado como contaminada, a pesar de que la especificidad dio 100%, para las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} .

En el caso del NMP, la prueba de la sensibilidad es del 100% para las 3 primeras diluciones y del 21% para la dilución 10^{-4} , indicando esto que detecta más muestras positivas el NMP, al compararlo con recuento en placa; en cuanto a su especificidad, se evidencia que aumenta para las 3 últimas diluciones. Son estos resultados los que hacen pensar que el mejor método para evaluar desinfección por foto-fenton después del DVC-FISH, es el NMP.

Por otro lado se encuentra que los VPP, para las tres primeras diluciones son del 100% y del 75% para la dilución del 10^{-4} , indicando esto que el método detectó como verdaderas positivas las muestras que aún tenían presencia de *Salmonella*.

Por otra parte, se verifica que los VPN se hallaron un poco altos en las 2 últimas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}), pero no alcanzaron el 100%, esto significa que el método clasificó como negativas muestras que aún tenían la presencia de *Salmonella*, pero en cambio para la dilución de 10^{-6} , se encontró un buen dato del VPN, del 97.1, lo cual significa que el método clasificó un buen número de muestras que estaban ya negativas para *Salmonella* serovariedad Typhimurium.

Por consiguiente con estos resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativos tan bajos encontrados en la dilución 10^{-4} para el método NMP, se puede concluir que es una técnica no confiable para descartar una muestra que se ha diagnosticado como positiva cuando su concentración es baja. Es decir, cuando se presume la existencia de < 10 bacterias mL^{-1} ó una bacteria en un mL de la muestra. Por tanto en estas condiciones de muestra éstas deberían concentrarse usando mayor volumen de muestra, (10 mL, 100 mL y/o 1000 mL), lo cual ya es recomendado para mediciones de *E coli*[24].

Resumiendo, se observó que de las dos técnicas evaluadas la que mayor muestras positivas detectó en el proceso de foto-fenton, comparada frente al gold estándar fué el NMP, por consiguiente la técnica que obtuvo un porcentaje más alto de falsos negativos, aseverando que la desinfección había sido completa, fué el método recuento en placa.

4.3 Evaluación del proceso de desinfección Fotocatálisis Homogénea Foto-fenton

La fotocatálisis homogénea es mucho más efectiva que la fotólisis para inactivar bacterias entéricas y otros microorganismos. La influencia del catalizador, la radiación absorbida por el catalizador, la composición de la matriz del agua, la concentración y/o fotocatalizador, la temperatura, aireación, agitación, geometría del reactor, pH, temperatura y el tipo de microorganismo que interviene en el proceso entre otras, son variables que pueden modificar las curvas de desinfección[25, 26,27]. Por tal motivo, dentro de este trabajo se empleó como catalizador $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) y H_2O_2 (Molabs 30%).

Para realizar la fotocatálisis por Foto-fenton, se escogió la concentración 2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2 , la cual es una concentración que está dentro de los rangos propuestos por los investigadores en desinfección por foto-fenton para inactivar bacterias[25]. Como ya se mencionó anteriormente, al realizar el seguimiento de la concentración bacteriana se obtuvieron curvas de desinfección características de concentración bacteriana viables totales contra el tiempo de desinfección. En gran número de investigaciones se ha observado que dichas curvas presentan tres zonas importantes. La primera es llamada hombro y en esta se observa una disminución lenta de la concentración bacteriana ya que en el tiempo inicial de la reacción al proceso de desinfección se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de los agentes oxidantes anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En la segunda zona se da un decrecimiento exponencial y las bacterias inician su muerte rápida, después de haber alcanzado su umbral límite de daño necesario y finalmente una zona de inhibición, debida a los subproductos de la reacción, comúnmente, llamada cola[28,29]. Los resultados de esta investigación demuestran que para, el método recuento en placa si se

cumple esta curva ya descrita, pero para el NMP y DVC-FIHS no; lo anterior, dado que el método NMP detectó 1.3 unidades logarítmicas y el DVC-FISH, detectó 3.9 unidades logarítmicas a los 240 minutos. Esto se debe a que en el proceso se generaron bacterias viables no cultivables y por esta razón el método recuento en placa a los 90 minutos de desinfección ya no las detectó; esto se comprueba cuando lo comparamos frente al método DVC-FISH. Hay que resaltar que investigadores como Baudart y colaboradores[20] en el 2005, obtuvieron resultados similares cuando compararon los dos métodos, tanto recuento en placa como DVC-FISH para cuantificar bacterias “viables no cultivables” presentes en aguas que están en proceso de potabilización, encontrando que se presentan recuentos muy bajos en el método de cultivo comparados frente al DVC-FISH. De igual forma, al hacer la misma comparación en la red de distribución encontraron iguales resultados.

Además, existen otros estudios, donde realizaron procesos de saneamiento con fotocátalisis heterogénea, evaluando la desinfección con recuento en placa, NMP y Fluorescencia con Dapi- CTC (5-Cyano-2.3-ditolyl tetrazolium chloride), para evaluar bacterias viables no cultivables; se concluyó que en el método recuento en placa las bacterias pierden cultivabilidad debido al estrés oxidativo y por consiguiente el método NMP es el que tiene recuentos más cercanos a la técnica Fluorescencia con Dapi; esto indica que NMP si es un método adecuado para evaluar desinfección con fotocátalisis[30]. Ahora bien, estos resultados son comparables con los encontrados en este estudio ya que aquí se encontró que el método DVC-FISH sirve para evaluar recuento inicial, es decir, bacterias sin estrés oxidativo, bacterias viables, a través del tiempo en el proceso de la desinfección y bacterias viables no cultivables en el periodo de oscuridad, mientras el método NMP es mucho más efectivo para evaluar las bacterias viables no cultivables, dado que durante el proceso de la desinfección no sobreestima la población bacteriana; por último, el método recuento en placa sólo detectó bacterias viables.

Por otra parte, en este trabajo se encontró que para la curva de desinfección de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, la fase de

inhibición se alcanza a los 90 minutos, para el método recuento en placa. Estos resultados son similares a los encontrados por Sanabria y colaboradores[21], cuando realizaron un estudio de fotocatalisis heterogénea con *E.coli*, ya que esta bacteria también presenta la fase de inhibición a los 90 minutos para el recuento en placa. De igual manera, en este mismo estudio, al evaluarse el comportamiento de los medios líquidos con azúcares y peptonas, se encontró que *E.coli* en estos medios, después de los 90 minutos, aún seguía viva; resultados que se asemejan a los encontrados en el momento que se evaluó a *Salmonella* serovariedad Typhimurium con el método NMP, ya que la fase de inhibición la hizo en el período de oscuridad a las 48 horas; esto puede deberse a que las pocas bacterias Viabiles no cultivables que detectó el método a los 240 minutos siguen haciendo reacción fenton. Otra posible razón, puede ser que como ya se mencionó anteriormente, la fotocatalisis afecta la vía de asimilación de azúcares como es la vía de Embden-Meyerhof y Entner Doudoroff, pero no la vía de la asimilación de las peptonas o proteínas[21].

Entonces recordando el medio líquido Rappaport (Merck), tiene en su composición proteínas que puede hacer que las pocas bacterias viabiles no cultivables tomen estos nutrientes. Asimismo esta puede ser una de las posibles razones por la cual ocurre un sobre crecimiento entre los 10 y 30 minutos de desinfección y que finalmente, el tiempo de la fase de inhibición con los medios líquidos sea más prolongada.

También se encontró en otro estudio llevado a cabo por Castaño[31], quien realizó la fotocatalisis heterogénea a bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* (las cuales fueron inactivadas después de 3.5 horas, 30 minutos y 1.5 horas respectivamente, cuando se evaluaron en recuento en placa, pero en el momento, que se hizo la comparación con los caldos nutritivos los cuales, también fueron sembrados al tiempo), que todas las muestras presentaron crecimiento, incluso los cultivos en el período de oscuridad, indicando este resultado que las bacterias si entraron en estado viable no cultivable, después de la fotocatalisis y no fueron detectadas por el recuento en placa.

Por otra parte, se encontró que el tiempo efectivo, en las condiciones que se montó el experimento para Foto-fenton, es hasta 10 minutos, en tanto cuando se observó el comportamiento del recuento con el método DVC-FISH, se apreció que de un recuento inicial de 5 unidades logarítmicas, bajó a 4.2 unidades logarítmicas o sea 0.8 unidades logarítmica de diferencia, de ahí en adelante lo que sigue disminuyendo en unidades logarítmicas es poco.

Ahora bien, esto indica que la concentración del catalizador que se empleó, no fue suficiente para inactivar las bacterias totalmente, como lo muestra el método de recuento en placa, ya que están viables, lo que se puede comprobar al observar el recuento del método DVC-FISH.

Asimismo, esto hace pensar en la posibilidad de hacer un montaje para Foto-fenton con diferentes concentraciones del catalizador, para ser más efectivos en la desinfección para bacterias, como lo hicieron los investigadores Bandala y colaboradores[25], en su estudio de Foto-fenton para *E.coli* y *Pseudomonas*.

Por último, el no detectar esas pocas bacterias viables no cultivables que quedan en el proceso de desinfección con foto-fenton, es delicado para la salud humana porque cuando toman un huésped pueden generar síntomas y una enfermedad más agresiva. Asimismo, cuando toman nutrientes pueden sobrevivir de la misma manera que sucede cuando aplicamos el método de conteo directo de Viables no cultivables DVC-FISH. Dicho de otro modo, si se usara agua contaminada con bacterias viables no cultivables en la explotación agrícola, sería un problema para la salud pública. Esta hipótesis se confirma con un estudio realizado por Castro[32], 2011, en donde se investigó si el agua usada para riegos de cultivos era vehículo de transferencia de *Salmonella* sp., demostrándose la existencia de una diversidad de serotipos (variedades) de *Salmonella* encontrados en el agua de uso agrícola, así como una alta resistencia de éstos a varios antibióticos. Además, algunas especies también fueron aisladas de la superficie de los cultivos. De igual manera, otros investigadores como Morales[33] 2009, describen que en su estudio de detección de *Salmonella* spp.,

en melón cantaloupe en unidades de producción y unidades de empaque, fue positivo para el aislamiento de *Salmonella* serovariedad Typhimurium y esto tal vez pudo deberse al agua de irrigación.

4.4 Foto Inactivación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, suspendida en solución salina al 0.85%

4.4.1 Irradiación directa en ausencia de catalizador. En la fotólisis ocurre una cinética de reacción simple en donde se afecta la velocidad de reacción debido a que las bacterias son expuestas sólo a los agentes oxidantes generados por la Luz Ultravioleta como el anión superóxido. Por lo tanto se debe tener en cuenta que este tipo de desinfección bacteriana es más lenta. Cuando se compararon los métodos recuento en placa y NMP, para evaluar este tipo de desinfección, se encontró que la fase de hombro es más lenta para el método de recuento en placa a los 240 minutos, mientras que para el método NMP, es más rápido a los 90 minutos. Esto puede deberse a que ocurre una disminución lenta de la concentración bacteriana, ya que en el tiempo inicial de la reacción se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de las especies oxidantes[28,29]. Por consiguiente como ya se mencionó anteriormente el estrés oxidativo, puede ocasionar en las bacterias daños que pueden ser reversibles o irreversibles, lo cual trae como consecuencia el estado viable no cultivable[33]. Como se observa en estos resultados, aún no hay una total desinfección con el método UV, esto puede deberse a que como no se usa un catalizador que acelere la reacción de desinfección y se sigan generando más productos intermedios del oxígeno, las bacterias tengan tiempo de activar sus mecanismos de defensa genéticos y sigan presentando resistencia.[34]

Asimismo, ya se han hecho estudios previos para evaluar el proceso de bacterias Viables no cultivables generadas en el proceso de desinfección, como es el caso del trabajo de Villarino y colaboradores[33], quien indujo estrés oxidativo a la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), empleando diferentes dosis de luz ultravioleta, encontrando que al sembrar estas bacterias en cajas petri con medios sólidos, éstas no crecieron; pero cuando se realizó la técnica del conteo de bacterias

viables mediante hibridación *in-situ* con fluorescencia (DVC-FISH), estas fueron observables. Estos resultados son muy parecidos a los encontrados en este trabajo ya que aquí se encontró que el método recuento en placa detectó menos bacterias (3.2 unidades logarítmicas), a los 240 minutos de desinfección y a las 48 horas en el período de reactivación o oscuridad (2.5 unidades logarítmicas), comparado frente al DVC-FISH, el cual detectó 3.8 unidades logarítmicas a los 240 minutos y a las 48 horas período de oscuridad.

A los 240 minutos de desinfección se encontró que tanto recuento en placa como NMP, detectaron, el mismo recuento bacteriano (3.2 unidades logarítmicas), pero al evaluarse el período de reactivación a las 48 horas se observó que el método NMP, detectó más, obteniendo un recuento de 3.2 unidades logarítmicas, es decir este método no varió su recuento en el período de oscuridad mientras que recuento en placa bajó a 2.5 unidades logarítmicas, indicando esto que si se generaron bacterias viables no cultivables, y se puede confirmar esta hipótesis al comparar los resultados frente al DVC-FISH, el cual detectó en la fase de oscuridad o reactivación 3.8 unidades logarítmicas. Finalmente se puede observar que en este proceso aún hay bacterias que tienen daños reversibles que al ser cambiadas a medios enriquecidos o condiciones favorables pueden reactivarse nuevamente, esto puede deberse a la falta de un catalizador que acelere la reacción de la desinfección o la falta de tiempo de exposición.

4.5 Cuantificación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium en el periodo de pos tratamiento en la oscuridad, mediante los tres métodos, recuento en placa, NMP y DVC- FISH

La fotocatalisis, heterogénea o homogénea es un método de desinfección que ha demostrado buenos resultados en la reducción de microorganismos patógenos, especialmente *E.coli*, tanto en estudios de laboratorio como en agua potable. Sin embargo, se ha observado un aumento en el número de bacterias horas después de culminado el proceso de iluminación[12]. Por el contrario, en otros resultados obtenidos por Castillo[35], se observó que *E.coli* si se inactivó totalmente con fotocatalisis heterogénea, es decir, no hubo re crecimiento en el período de oscuridad, pero bacterias como *Shigella* spp. y *Sal-*

monella spp., si re crecieron después de haber llegado a una inactivación o fase de inhibición cuando fueron evaluadas con recuento en placa. Posteriormente, en otro trabajo de Castaño[31], 2006, se encontró que aunque las bacterias *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* fueron inactivadas después de 3,5 horas, 30 minutos y 1,5 horas cuando fueron evaluadas por el método de recuento en placa, pero cuando se hizo la comparación de los caldos nutritivos que también fueron sembrados al tiempo, se encontró que todos presentaron crecimiento, incluso los caldos en el período de oscuridad, indicando este resultado que las bacterias si entraron en estado viable no cultivable después de la fotocatalisis y no fueron detectadas por el recuento en placa. Aquí hay que resaltar que *E.coli*, cuando fue evaluada en el período de oscuridad con el método de recuento en placa, no presentó recrecimiento, pero si se obtuvo crecimiento con los medios líquidos, caldos nutritivos. Por otro lado, al analizar a *Salmonella* y *Shigella* en el período de oscuridad, se encontró que estas bacterias presentaron recrecimiento a las 24 pero no a las 48 de horas de reactivación, cuando fueron sembradas en método de recuento en placa.

Concluyendo, estos resultados indican que las pocas bacterias viables no cultivables se hicieron indetectables con el recuento en placa, pero en realidad no habían muerto.

Al seguir comparando los resultados encontrados en este trabajo se puede resaltar que aquí se empleó fotocatalisis con Foto-fenton y que la fase de inhibición para recuento en placa empezó a los 90 minutos y no se obtuvo recrecimiento posteriormente en la oscuridad, es decir, este método evalúa el proceso como una desinfección completa (ver figura 4). Por otra parte, tanto el método NMP hace su fase de inhibición en el período de oscuridad a las 48 horas, dado que a los 240 minutos de desinfección ya hay <10 bacterias mL^{-1} , al tiempo que las pocas bacterias viables no cultivables que quedaron siguieron haciendo reacción fenton y al final ya no fueron detectadas por el NMP. En comparación con el DVC-FISH, este método nos muestra a través del tiempo que las bacterias nunca llegaron a fase de inhibición total, ni aún en el período de oscuridad; la explicación para este fenómeno

es que las bacterias se vuelven viables no cultivables para los métodos de recuento en placa, pero además aclara que las bacterias jamás han hecho recrecimiento, por el contrario, simplemente se volvieron indetectables a cierto grado y horas de estrés oxidativo generado por la desinfección.

También, al comparar el estudio de Castaño[31], 2006 en el que evaluó la desinfección por fotocátalisis heterogénea de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, con el método de recuento en placa, se encontró que la bacteria se inhibió a las 3,5 horas, pero obtuvo crecimiento a las 24 horas en el período de oscuridad; mientras en este trabajo, en el que se desinfectó con Foto-fenton, no se obtuvo crecimiento del mismo microorganismo por el método de recuento en placa en el período de oscuridad.

Para entender un poco más estos resultados y el proceso del periodo en la oscuridad, algunos investigadores como Wist[12], proponen que el aumento en la población bacteriana en la etapa de la oscuridad puede tener lugar por la acción de los tres fenómenos diferentes: recrecimiento, reactivación y activación.

El recrecimiento hace referencia a la capacidad que tienen los microorganismos que resistieron al proceso fotocatalítico de crecer, reproducirse y dar origen a una nueva población a expensas de detritus y células muertas [12]. La reactivación, a diferencia del recrecimiento, aumenta el número de microorganismos debido a la capacidad que tienen las bacterias de entrar en estado viable no cultivable durante la iluminación para luego volver a su estado normal cuando las condiciones son favorables. La existencia de células viables pero no cultivables puede ser una respuesta fisiológica de las bacterias para sobrevivir a condiciones de estrés medio ambiental [36,34].

Al comparar estas hipótesis con los resultados de este trabajo se puede concluir que la reactivación es lo más cercano que le puede estar pasando a las bacterias cuando se desinfectan con Foto-fenton ya que el método recuento en placa no las detecta después de 90 minutos de desinfección por la resistencia que ellas generaron al

proceso de desinfección haciéndose viables no cultivables y a esto hay que sumarle que tal vez hubo daño a nivel de DNA, membranas y pared, pero no hubo oxidación del Acetil coA, lo cual si hubiese sido letal [22]. Pero otra posible hipótesis es que se afectó la vía de la asimilación de azúcares pero no la vía de la asimilación de peptonas [21], lo que haría posible que cuando las bacterias tuviesen las condiciones favorables, durante el período de oscuridad, pudieran tomar los nutrientes de los caldos DVC-FISH y NMP y ser detectadas, como sucedió en los experimentos de este estudio.

La activación se produce cuando bacterias que se encontraban en forma inactiva antes de la fotocatalisis, se activan gracias a la irradiación, bajo las condiciones de estrés producidas durante el tratamiento. Al activarse con la irradiación pueden ser detectadas por el método microbiológico de análisis y generar de esta forma un aumento en las diferentes poblaciones de bacterias.

Finalmente, de acuerdo con todos los resultados encontrados tanto en el período de iluminación como de oscuridad, se puede concluir que las bacterias jamás han sido inactivadas o inhibidas totalmente en el proceso de desinfección con Foto-fenton y lo que sucede es que las bacterias tienen daños reversibles que las hacen viables no cultivables en los métodos de recuento en placa, pero si estas bacterias tienen las condiciones favorables como medios líquidos con proteínas pueden restablecer su daño y hacerse cuantificable para los métodos DVC-FISH y NMP.

5. CONCLUSIONES

Se demostró que la sensibilidad del método NMP es mayor que la del método tradicional Recuento en placa, teniendo en cuenta que el método de NMP clasificó correctamente el mayor número de muestras que son verdaderamente positivas hasta una dilución más que el Recuento en placa (NMP hasta la concentración bacteriana 10^{-3} , mientras que el método de Recuento en placa alcanzó su máxima sensibilidad cuando la concentración bacteriana era 10^{-2}).

El método de recuento del NMP es apto para evaluar el proceso de desinfección por Foto-fenton, ya que presenta una sensibilidad, especificidad y valores predictivos más altos frente al método de recuento en placa para detectar bacterias viables no cultivables.

Se realizó la validación del método de recuento NMP para evaluar aguas tratadas con foto catálisis frente al Gold estándar DVC-FISH.

El VPP del método NMP y recuento en placa fue muy bueno hasta la dilución 10^{-3} donde obtuvieron el 100%, mientras que en la dilución de 10^{-4} , recuento en placa perdió la posibilidad de confirmar muestras positivas, mientras que NMP la conservó con una probabilidad del 75%.

Los resultados obtenidos de la especificidad y el valor predictivo negativo de los dos métodos es baja hasta la dilución 10^{-5} , lo que implica que las dos técnicas no son lo suficientemente específicas para confirmar muestras negativas cuando realmente lo son, ni para confirmar la ausencia de *Salmonella* en dichas muestras.

El método recuento en placa no es válido y apto para evaluar el proceso de desinfección por fotocatalisis (Foto-fenton), ya que es un método no confiable cuando la concentración bacteriana es baja (10^{-3} hasta 10^{-6}), debido a que su capacidad discriminatoria no permite detectar las muestras verdaderamente positivas y aumenta el diagnóstico de falsos negativos.

El NMP es un método que puede evaluar la desinfección por Foto-fenton a través del tiempo cuando se compara frente al método DVC-FISH.

La concentración del catalizador empleado en el proceso de desinfección por Foto-fenton, no fue suficiente para inactivar las bacterias de *Salmonella* serovariedad Typhimurium totalmente, ya que a las 4 horas de desinfección aún se encontraron bacterias viables por los métodos de recuento NMP y DVC-FISH.

El método DVC-FISH, sirve para evaluar recuento inicial, es decir bacterias sin estrés oxidativo, bacterias viables, a través del tiempo en el proceso de la desinfección y bacterias viables no cultivables en el período de oscuridad. Mientras que el método NMP, es mucho más efectivo para evaluar las bacterias viables no cultivables, porque en el proceso de la desinfección, no sobreestima la población bacteriana; por último, el método recuento en placa solo detecta bacterias viables.

Los resultados de este trabajo permiten aumentar el fortalecimiento de la Vigilancia de la calidad del agua en Salud Pública. Ya que con los resultados obtenidos en esta investigación se observa la necesidad de implementar aproximaciones como la aquí realizada y usar los datos para realizar ajustes al protocolo definido por el INS, para evaluar la calidad de la agua en el país. Además, el método NMP, permitiría evidenciar la magnitud de los eventos de Interés en Salud Pública al aumentar el número de casos detectados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos El presente trabajo fue financiado por el proyecto BIOSOLAR-DETOX en el marco del convenio EPFL SUIZA -UNIVALLE, los autores agradecen especialmente por su apoyo a Dany Mercedes Acevedo, Leidy P. Bedoya, Luis E Mora por el apoyo en el desarrollo de los ensayos, Dra Beatriz Olaya, Angela Cubides, Andrey Payan, Julian Muñoz y en general al grupo GAOX, por sus aportes en la discusión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WHO. OECD, “Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Methods,” *Sci. Total Environ*, London, 2003.
- [2] FM. Reiff, “El estado de la desinfección del agua potable en América Latina y el Caribe”, *ILSi* , Washington, pp. 101-13, 1996.
- [3] D. C. Cáceres, E. Estrada, R. DeAntonio, and D. Peláez, “La enfermedad diarreica aguda: un reto para la salud pública en Colombia,” *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 17, no. 1, pp. 6–14, 2005.
- [4] OMS, “Guidelines for Drinking-water Quality,” *Atención Primaria*, vol. 23, no. Vdv, p. 7, 2006.
- [5] M. F. Gutiérrez *et al.*, “Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona Ecuatorial,” *Colomb. Med.*, vol. 36, no. 4 SUPPL. 3, pp. 6–14, 2005.
- [6] U and WHO, “Tratamiento Clínico de la Diarrea,” Nueva York, 2004.
- [7] INd. Salud, “Estadísticas de la Vigilancia en Salud Pública - Serotipos y Patrones de Susceptibilidad Microbiana *Salmonella* spp.” Dic. 2010. [Online]. Available: <http://www.ins.gov.co/?id-categoria=6138#>.
- [8] P. Fernández and P. Díaz, “Pruebas diagnósticas,” pp. 1–6, 2003.
- [9] K. Lemarchand and P. Lebaron, “Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: Relationship with fecal indicators,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 218, no. 1, pp. 203–209, 2003.
- [10] M. Leal, “Tecnologías convencionales de tratamiento de agua y sus limitaciones,” *Esc. Posgrados, UNSAM, Buenos Aires*, pp. 57–66, 2005.
- [11] M. Litter, “Tecnologías avanzadas de oxidación: tecnologías solares,” *Esc. Posgrados, UNSAM, Buenos Aires*, pp. 57–66, 2005.

- [12] J. Wist, J. Sanabria, C. Dierolf, W. Torres, and C. Pulgarin, "Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, pp.241-6, 2002.
- [13] S. P. Rivera, L. J. Flórez, and J. Sanabria, "Standardization of a quantification method for Salmonella spp . and Shigella spp . in specific liquid media Standardization of a quantification method for Salmonella spp . and Shigella spp . in specific liquid media," *Colomb. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 60–70, 2010.
- [14] S. P. Rivera, "Estandarización de un método microbiológico para cuantificación de Salmonella sp y Shigella sp. y validez de dos métodos de cuantificación, empleados en el diagnóstico de Salmonella sp., presente en aguas artificiales tratadas mediante el proceso de desinfección Foto-Fenton" Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia, 2011.
- [15] T. Garcia-Armisen and P. Servais, "Enumeration of viable E. coli in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization," *J. Microbiol. Methods*, vol. 58, no. 2, pp. 269–279, 2004.
- [16] S. Nordentoft, H. Christensen, and H. C. Wegener, "Evaluation of a fluorescence-labeled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of Salmonella serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 2642–2648, 1997.
- [17] ME. Legues, CG. Franco, and CP. Bertin, "Pilot study of PML/RARalpha fusion by fluorescence in situ hybridization (FISH) method in acute promyelocytic leukemia," *Rev méd, Chile*, vol.130 no. 7, pp. 737-44, 2002.
- [18] S. Lemeshow, H. D, J. Klar, and S. Lwanga, "Determinación del tamaño de muestras en Estudios Sanitarios Ginebra" *Org. Mundial de la Salud*, 1991.
- [19] Fao, *Manuales para el control de calidad de los alimentos 14. Calidad En El Laboratorio Químico De Control De los alimentos*. Roma, 1996.

- [20] J. Baudart, A. Olaizola, J. Coallier, V. Gauthier, and P. Laurent, "Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable Enterobacteriaceae cells in drinking water," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 243, no. 2, pp. 405–409, 2005.
- [21] J. Sanabria, J. Wist, and C. Pulgarin, "Photocatalytic disinfection treatments: viability, cultivability and metabolic changes of e. coli using diferent measurements methods," *Rev. Dyna*, vol. 78, no. 166, pp. 178–187, 2011.
- [22] P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby, "Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 9, pp. 4094–4098, 1999.
- [23] J. P. Soler León, "Validación Secundaria Del Método De Número Más Probable Y Recuento En Placa Profunda Para Coliformes Totales Y Fecales En Muestras De Alimentos Basada En La Norma ISO NTC 17025," pp. 1–81, 2006.
- [24] APHA, AWWA, and WEF, "Standard methods for the examination of water & wastewater," 21st Ed. American Public Health Association American Water Works Association Water Enviroment Federation, 2005.
- [25] E. R. Bandala *et al.*, "Application of azo dyes as dosimetric indicators for enhanced photocatalytic solar disinfection (ENPHOSODIS)," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 218, no. 2–3, pp. 185–191, 2011.
- [26] AK. Benabbou, Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune, and C. Guillard, "Photocatalytic inactivation of Escherischia coli: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation". *Applied Catalysis B: Environmental*, pp. 246, 2007.
- [27] A. G. Rincón and C. Pulgarin, "Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on E. coli K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: Implications in solar water disinfection," *Appl.*

- Catal. B Environ.*, vol. 51, no. 4, pp. 283–302, 2004.
- [28] K-SE. Dalrymplea, MA. Troztb, D.Goswami, and A. Yogi, “review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection,” *Science Direct*, Julio, vol.98,no.1, pp. 27-38, 2010.
- [29] F. M. Salih, “Formulation of a mathematical model to predict solar water disinfection,” *Water Res.*, vol. 37, no. 16, pp. 3921–3927, 2003.
- [30] KN. Josset, MC. Lett, JM. Ledoux, and V. Keller, Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms,” *Chem Soc Rev*, no. 37, pp. 744-55, 2008.
- [31] O. Castaño, “Comparación del nivel de inactivación de *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Shigella sonnei*, en condiciones controladas usando fotocatalisis heterogénea,” Univ. del Valle, Santiago de Cali, 2006.
- [32] N. Castro del Campo, “El agua de uso agrícola como vehículo de transferencia de *Salmonella* sp.” 2011, Available: http://www.fps.org.mx/divulgacion/index.php?option=com_content&view=article&id=711:el-agua-de-uso-agricola-como-vehiculo-de-transferencia-de-salmonella-sp&catid=37:sinaloa-produce&Itemid=373
- [33] G. R.-S. y T. S. Lucía Morales-Hernández, Ana María Hernández-Anguiano, Cristóbal Cháidez-Quiroz, “Detección de *Salmonella* spp. en Melón Cantaloupe en Unidades de Producción y Unidad de Empaque.” *Agric. Técnica en México.*, vol. 35, pp. 135–145, 2009.
- [34] J. Ramírez Santos, G. Contreras Ferrat, and M. C. Gómez Eichelmann, “La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*,” *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 3–4, pp. 92–101, 2005.
- [35] Castillo JA, Sanabria GIJ, Wist J, Pulgarín GC. Evaluation of the photocatalytic treatment for the removal of pathogenic agent from different biological wastewater treatment effluent.

Water & Environmental Management Series (WEMS). 139-54,
2005

- [36] K. S. McDougald D., Rice S., Weichart D., “Nonculturability:
adaption or debilitation?” *Microbiol. Ecol.*, vol. 25, no. 1998,
pp. 1-9, 1998

ACERCA DE LOS AUTORES



MARGARITA ZULETA BUSTAMANTE

Fue docente del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por casi 40 años y fue la pionera de la mutagénesis en Colombia, siendo maestra de reconocidos investigadores Colombianos. Después de terminar sus estudios de postgrado en Estados Unidos en el área de genética en la década de los 60, llegó a Colombia y fundó el laboratorio de genética de la Universidad de Antioquia, en dónde trabajó inicialmente con el modelo de *D. melanogaster* introduciendo la escuela de Morgan y Muller en Colombia. Su gran preocupación por el cáncer la motivó a desarrollar un camino investigativo en el área de la mutagénesis ambiental.

JOSÉ FERNANDO OÑATE G

Biólogo de la Universidad del Cauca. Realizó sus estudios de maestría y doctorado en la Universidad de Antioquia en las áreas de mutagénesis y bioquímica. Actualmente desarrolla su estancia postdoctoral en la Universidad Santiago de Cali en temas relacionados con el desarrollo y nano-encapsulación de antibióticos. También, se desempeña como docente de dedicación exclusiva en esta Universidad. Ha realizado trabajos multidisciplinarios publicados en revistas internacionales reconocidas a nivel mundial. Entre sus líneas de trabajo se encuentran la remoción de contaminantes mutagénicos por medio de biotecnología y procesos avanzados de oxidación. Paralelamente, trabaja en el diseño, síntesis, nano-encapsulación y mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos.

Correo: jose.onate00@usc.edu.co
<https://orcid.org/0000-0002-9069-8902>

ARY FABIÁN PARUMA

Biólogo universidad del Cauca y Antioquia con amplia formación en citogenética, toxicología genética y mutagénesis ambiental. Realizo sus estudios de maestría en la universidad de Manizales en las áreas de educación y diversidad. Actualmente se desempeña como docente de aula e investigador en la institución educativa los comuneros de la ciudad de Popayán adscrito a la secretaria de educación municipal de Popayán. Ha realizado trabajos publicados en revistas nacionales e internacionales. Entre sus líneas de trabajo se encuentran la detección de agentes mutagénicos en aguas y estudios sobre diversidad y educación.

Correo: a_fabito83@hotmail.com

IVÁN MELÉNDEZ GELVES

En 1985 ingresa al programa de biología de la Universidad de Antioquia, donde culmina sus estudios de pregrado bajo la dirección de la profesora Margarita Zuleta, con quien trabajó en el área de la Mutagénesis realizando su tesis “Formación de Mutágenos Volátiles en Plátano Maduro Expuesto a Altas Temperaturas: Efecto Potenciador de la Creatina y Ácidos Grasos”. Posteriormente ingresa al posgrado de Ciencias Básicas Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, allí, realiza el trabajo “Detección de mutágenos en aguas de consumo tratadas en la planta Villa hermosa. Genotoxicidad de esta agua en células humana” también bajo la dirección de la profesora Zuleta. Inicia sus estudios de doctorado en el programa de biología de la Universidad de Antioquia, pero no logra terminarlo por varias razones, dentro de las cuales se puede mencionar el fallecimiento de su tutora, la profesora Margarita Zuleta. En la actualidad está tratando de darle la continuidad a su doctorado bajo la dirección del profesor Carlos Alberto Peláez del grupo interdisciplinario de estudios moleculares (GIEM). Desde el año 2003, se vinculó con la Universidad de Pamplona, al departamento de biología, en esta institución continua sus trabajos en el área de la Mutagénesis, formando estudiantes de pregrado y posgrado, dirigiendo grupos de investigación y proyectos de investigación. Producto de sus investi-

gaciones, el profesor Meléndez ha publicado varios artículos relacionados con el área de la Mutagénesis. Uno de sus principales objetivos es continuar con el legado que tanto le inculco su asesora y es no dejar que la investigación en el área se la Mutagénesis en Colombia desaparezca.

Email: jorivan2010@hotmail.com

CARLOS ALBERTO PELÁEZ

Biólogo Genetista de la Universidad de Antioquia, Magister en Química Orgánica de la Universidad de Antioquia y Doctor en Química (área Bioquímica) de la Universitat Ramon LLULL de Barcelona-España. Actualmente es profesor en el Instituto de Química de la Universidad de Antioquia en las áreas de Bioquímica y Química Ambiental. Líder del Grupo de Investigación de Estudios Moleculares (GIEM).

Email: directorgiem@gmail.com

FERNANDO BONILLA MILLÁN

Estudiante del Programa de Química, miembro del Semillero de Investigación en Dinámica Molecular (SEDIM), Estudiante con el mejor resultado en Examen de Estado de Calidad de la Educación Superior año 2018 para la Facultad de Ciencias Básicas, desarrolló su trabajo en el Laboratorio de Dinámica Molecular (LADIM) del Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO) de la Universidad Santiago de Cali.

Email: ferbomi@hotmail.com

HÉCTOR CÁRDENAS

Biólogo de la Universidad de Antioquia. Actualmente vinculado a la Secretaría de Educación de Medellín, orientando cursos de química en básica secundaria.

Email: hhcph77@yahoo.com.mx
<https://orcid.org/0000-0001-7137-1309>

JHON ALEXANDER RODRÍGUEZ ESTRADA

Químico de la Universidad Santiago de Cali, durante sus estudios fue miembro del Semillero de Investigación en Dinámica Molecular (SEDIM), desarrolló su trabajo en el Laboratorio de Dinámica Molecular (LADIM) del Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO) de la Universidad Santiago de Cali.

Email: j.alex1206@gmail.com

OSCAR EDUARDO ROJAS ÁLVAREZ

Químico de la Universidad Santiago de Cali y Magister en Ciencias Moleculares de la Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, desarrolló trabajo de grado en el Computer-Chemie-Centrum (CCC) bajo la dirección del Profesor Tim Clark, después de finalizar estudios en Alemania retorna a Colombia y crear el Laboratorio de Dinámica Molecular (LADIM) donde actualmente es Profesor Tiempo Completo de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali en las áreas de Fisicoquímica y Química Computacional, miembro del Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO).

Email: oerojas@usc.edu.co

FAUSTINO ANDREAS TOBA

Biólogo egresado de la Universidad Central de Venezuela (2000). Es PhD en Microbiología, graduado en la Universidad de Cornell, NY, EEUU (2008). En ese mismo año inició un postdoctorado en la Universidad de Columbia, NY, EEUU (2010). En el año 2010, se une a la empresa MedInstill Development LLC, en donde actualmente es el VP de Operaciones y se encarga de dirigir todas las actividades de operación (cadena de suministro, almacenamiento, formulación y composición) utilizando tecnologías intactas.

*Email: atoba@medinstill.com
<https://orcid.org/0000-0001-6345-1560>*

AURA FALCO

Bióloga egresada de la Universidad Central de Venezuela (2003). Es Doctor en Ciencias, mención Microbiología, graduada del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2010). Desde el año 2007, se desempeñó como docente/investigador de planta y a dedicación exclusiva, adscrita al Departamento de Biología Celular, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (2013). En el período comprendido entre el año 2013 y 2016 realizó un postdoctorado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. En el año 2017, fue contratada como profesor dedicación exclusiva por la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali, Colombia, donde a partir del año 2018 se desempeña como director del programa de Microbiología. Pertenece al Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA).

*Email: aura.falco00@usc.edu.co
<https://orcid.org/0000-0002-8653-4868>*

CARLOS ANDRÉS ARANAGA

Biólogo egresado de la Universidad del Tolima (2005). Es MSc. en Microbiología, graduado del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2011). Seguidamente se desempeña como Profesional Asociado a la Investigación adscrito al Laboratorio de Genética Molecular, ubicado en el Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2013). De forma paralela del año 2008 al 2014, se desempeñó como Docente Temporal en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, mientras que del año 2014 al 2015, como *Medical Science Liason* (Enlace médico Científico) en Abbott Laboratories (Caracas, Venezuela). Para el año 2016, se desempeñó como Interventor para el Programa de Asistencia Técnica Directa Rural por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en Ibagué, Tolima. En el año 2017 fue contratado como profesor tiempo completo por la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali, Colombia y pertenece al Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO).

Email: carlos.aranaga00@usc.edu.co
<https://orcid.org/0000-0003-1806-657X>

GUILLERMINA ALONSO

Bióloga egresada de la Universidad Central de Venezuela (1980). Es Doctor en Ciencia, mención Biología Celular, graduada de la Universidad Central de Venezuela (1990). Desde el año 1993, se desempeñó como docente/investigador de planta y a dedicación exclusiva, adscrita al Departamento de Biología Celular, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Desde el año 2005 es Profesor Titular. Se desempeñó como Directora de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela desde el año 2006 hasta el 2011 y desde el año 2018, se desempeña como la Coordinadora Académica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Email: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

<https://orcid.org/0000-0002-1664-7728>

SANDRA PATRICIA RIVERA SÁNCHEZ

Bacterióloga: Egresada de la Universidad del Valle, (2002). Con Maestría en Ciencias Básicas Médicas (2011). Se ha desempeñado como Bacterióloga del área de Microbiología del Laboratorio de Salud Pública Departamental del Valle y es Docente de la Universidad Santiago de Cali del Programa de Microbiología. Perteneció al Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA).

Email: sandrapatriciarivera82@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6564-3061>

LILIANA JANETH FLOREZ ELVIRA

Estadística Profesional con Magister en Epidemiología de la Universidad del Valle, Profesora Hora Cátedra de la Universidad Icesi en la Facultad de Ciencias de la Salud, Calle 18 No. 122 -135. Asesora Metodológica del Centro de Investigaciones Clínicas (CIC) de la Fundación Valle del Lili, Cra 98 #18-49, Cali, Colombia

Email: liflorez27@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8836-9088>

JANETH SANABRIA GÓMEZ

Licenciada en Bioquímica, Microbióloga Ph. D. Directora del Postgrado en Ingeniería Sanitaria Ambiental, de la Universidad del Valle, Coordinadora del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad del Valle, Directora del grupo de Investigación Procesos Avanzados para tratamientos Químicos y Biológicos-GAOX, (Grupo A1 Colciencias) 2016-2017

Email: janeth.sanabria@correounivalle.edu.co

PARES EVALUADORES



Enrique Pardo Pérez

Universidad de Córdoba

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6467-5790>

Edisson Duarte Restrepo

Universidad de Cartagena

Adriana Correa Bermúdez

Corporación Centro Internacional de Entrenamiento e
Investigaciones médicas CIDEIM

Alexander Luna Nieto

Fundación Universitaria de Popayán

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9297-8043>

Alexander López Orozco

Universidad de San Buenaventura

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0068-6252>

Carlos Andrés Rodríguez Torijano

Universidad de los Andes

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9783>

Carlos David Grande Tovar

Universidad del Atlántico

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6243-4571>

Ingrid Paola Cortes Pardo

Pontificia Universidad Javeriana

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0282-0259>

Jean Jader Orejarena Torres

Universidad Autónoma de Occidente

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0401-3143>

John James Gómez Gallego

Universidad Católica de Pereira

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6685-7099>

Juan Manuel Rubio Vera

Servicio Nacional de Aprendizaje Sena

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1281-8750>

Margaret Mejía Genez

Universidad de Guanajuato

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5142-5813>

María Alexandra Rendón Uribe

Universidad de Antioquia

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1062-6125>

Willian Fredy Palta Velasco

Universidad de San Buenaventura

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1888-0416>

Yenny Patricia Ávila Torres

Universidad Tecnológica de Pereira

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1399-7922>

Diana Milena Díaz Vidal

Universidad de San Buenaventura

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6428-8272>

Marco Antonio Chaves García

Fundación Universitaria María Cano

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7226-4767>

Nelson Jair Cuchumbé Holguín

Universidad del Valle

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9435-9289>

Ángela María Salazar Maya

Universidad de Antioquia

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7599-1193>

Este libro fue diagramado utilizando fuentes tipográficas Minion Pro en sus respectivas variaciones a 12 y 13 puntos, y Aileron para los títulos a 15 y 20 puntos. Se Terminó de imprimir en noviembre en los talleres de SAMAVA EDICIONES E.U. POPAYÁN - COLOMBIA 2018.

Fue publicado por la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali.