



Trabajo final de carrera
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Microbiología

Purificadores de agua: ¿fuente potencial de contaminación microbiológica?

Milly Buzzo

Orientadora

Dra. Adalgisa Martínez-Silveira

Co-orientadora

B.C. Soledad Martínez

Laboratorio de Biotecnología
Facultad de Química, Udelar
Julio 2022

Agradecimientos

A Pía Cerdeiras, por abrirme las puertas del laboratorio de Biotecnología y darme la oportunidad de hacer mi tesina en esta temática tan linda e interesante. Por su tiempo en las reuniones de avance y sus correcciones.

A mi tutora Adalgisa Martínez y co-tutora Soledad Martínez, por aceptar dirigir este trabajo en un contexto de incertidumbre. Por tenerme confianza y paciencia en el laboratorio; por ayudarme con el sembrado y el filtrado en los días largos, y por todos los conocimientos que me han transmitido. Tuve mucha suerte con las tutoras que me tocaron y por ello estoy muy agradecida.

A las evaluadoras, Dra. María Inés Siri y Dra. Virginia Ferreira por aceptar ser parte del tribunal y destinar su tiempo a la evaluación de este trabajo.

A Tania García, por donarnos medio de cultivo para sembrar una de mis bacterias. A la Dra. Claudia Gutierrez y su equipo de la CHLA-EP por la extracción de ADN de *M. avium*, la preparación de medio para el cultivo de este microorganismo, y su búsqueda en las muestras de agua.

Al Intendente de Facultad de Química, Sr. Horacio Machado, por facilitar el acceso a los puntos de muestreo y colaborar con información sobre los purificadores. A Mariana Barcia por ayudarme a muestrear y realizar las determinaciones fisicoquímicas de mis muestras.

A mi tutora de carrera Adriana Migliaro y a Gabriela Bedó, por ayudarme con las gestiones administrativas de la carrera en el contexto de incertidumbre en el nuevo Plan.

A mis profesoras Bettina Tassino y Magela Laviña, porque al igual que a mi, han inspirado a muchos estudiantes en el estudio de la Biología y la Microbiología. Ojalá todas las personas que dictan clases lo hicieran con su vocación.

A Melanie Nuesch, por darme para adelante cuando necesité un empujón para seguir.

A Felipe Clavijo del Laboratorio de Microbiología Molecular, por prestarme reactivos y darme una mano tantas veces, siempre con una sonrisa por debajo del tapabocas.

A las compañeras del 14, por darme una mano cada vez que necesité ayuda y por hacer del laboratorio un lugar tan lindo y ameno para trabajar.

A Angi, mi compañera y amiga, por siempre darme para adelante y acompañarme todo este tiempo.

A Pablo, por siempre haber creído en mí.

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 El agua como recurso	2
1.2 Microorganismos patógenos en agua	3
1.3 El análisis de agua: métodos moleculares y métodos dependientes de cultivo	5
1.4 Multiplex qPCR	5
1.5 Aproximación a una optimización de multiplex qPCR	6
2. Objetivos	8
2.1. Objetivos generales	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. Materiales y métodos	9
3.1: Puesta a punto de la multiplex qPCR	9
3.1.1 Microorganismos	9
3.1.2 Extracción de ADN	9
3.1.3 Cuantificación de las extracciones de ADN	10
3.1.4 Reactivos y oligonucleótidos utilizados en singleplex y multiplex qPCR	10
3.1.5 Reacciones singleplex y multiplex qPCR	12
3.1.6 Aproximación a la optimización de multiplex qPCR mediante diseño factorial	13
3.1.7 Análisis estadísticos	13
3.1.8 Estudio de la linealidad de multiplex qPCR	13
3.2 Análisis de muestras de agua	16
3.2.1 Sistema en estudio	16
3.2.2 Metodología de muestreo	17
3.2.3 Determinaciones fisicoquímicas	17
3.2.4 Análisis microbiológicos	17
3.2.4.1 Detección de coliformes totales y E. coli en 100 mL de muestra	18
3.2.4.2 Recuento de heterótrofos	18
3.2.4.3 Detección de Pseudomonas aeruginosa en 10 mL de muestra	18
3.2.4.4 Caracterización de muestras positivas de caldo asparagina	19
3.2.4.5 Detección de Mycobacterium spp. en 500 mL de muestra	19
3.2.5 Extracción de ADN total a partir de membranas de filtración	20
3.2.6 Análisis molecular de las muestras de agua por multiplex qPCR	20
3.2.7 qPCR ARNr 16S	20
3.2.8 qPCR Mycobacterium spp.	21
4. Resultados y discusión	23
4.1: Aproximación a optimización de la multiplex qPCR	23
4.1.1 Evaluación in silico de los cebadores y sondas utilizados	23
4.1.2 Extracción y cuantificación de ADN	25

4.1.3 Especificidad de cebadores y sondas y concentración mínima de ADN detectable	25
4.1.3.1 Singleplex <i>P. aeruginosa</i> y <i>M. avium</i> 10 μ M 0,0025 μ g/mL y 0,005 μ g/mL	26
4.1.3.2 Multiplex qPCR <i>P. aeruginosa</i> y <i>M. avium</i> 10 μ M 0,005 μ g/mL	29
4.1.4 Experimentos de qPCR del diseño factorial	30
4.1.5 Estudio de la linealidad de multiplex qPCR	37
4.1.5.1 Linealidad <i>P. aeruginosa</i>	38
4.1.5.2 Linealidad <i>M. avium</i>	40
4.1.5.3 Evaluación de la linealidad del pool de ADN	43
4.1.5.3.1 Linealidad del ADN de <i>P. aeruginosa</i> en pool	43
4.1.5.3.2 Linealidad del ADN de <i>M. avium</i> en pool	45
4.2 Del análisis de las muestras de agua	47
4.2.1 Determinaciones fisicoquímicas	47
4.2.2 Análisis microbiológicos	49
4.2.2.1 Detección de coliformes totales y <i>E. coli</i> en 100 mL de muestra	49
4.2.2.2 Recuento de heterótrofos	50
4.2.2.3 Búsqueda de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 10 mL de muestra	53
4.2.2.4 Búsqueda de <i>Mycobacterium</i> spp. en 500 mL de muestra	55
4.2.3 Extracción de ADN total a partir de membranas de filtración	57
4.2.4 Estimación de carga bacteriana por qPCR ARNr 16S	59
4.2.5 Detección del género <i>Mycobacterium</i> spp. por qPCR	61
4.2.6 Análisis molecular de las muestras de agua por multiplex qPCR	64
5. Conclusiones y perspectivas	66
ANEXO	67
Figuras	67
Tablas	68
Preparación de soluciones	69
Medios de cultivo	70
BIBLIOGRAFÍA	72

Resumen

Pseudomonas aeruginosa y *Mycobacterium avium complex* son microorganismos patógenos oportunistas formadores de biofilms que pueden encontrarse en los sistemas secundarios de distribución de agua potable, alterando la calidad de la misma y presentando potenciales riesgos para consumidores inmunocomprometidos.

Para el análisis microbiológico de agua los métodos más utilizados son los bioquímicos y dependientes de cultivo, seguidos de métodos moleculares como la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Debido a la ausencia de normativa, en nuestro país no se conoce la eficacia de la purificación de agua por carbono granular activado. El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la calidad del agua potable de muestras de agua de red, agua de tanque, y de agua purificada de la Facultad de Química según los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la norma UNIT 833:2008.

Se realizó la búsqueda de *Mycobacterium* spp. en 500 mL de muestra. Se empleó el método de qPCR para la determinación de la carga bacteriana de cada muestra y la detección molecular de *Mycobacterium* spp. Adicionalmente, se planteó realizar los primeros pasos para optimizar una *multiplex* qPCR (mqPCR) para la detección y cuantificación de un *pool* de ADN de *M. avium* y *P. aeruginosa* en agua potable.

Se realizó el análisis *in silico* y experimental de especificidad de cebadores y sondas a utilizar en mqPCR. Se realizó además un diseño factorial, y se evaluaron los modelos obtenidos para llegar a la mejor concentración de sondas y cebadores a emplear en la detección de *M. avium* y *P. aeruginosa* en las muestras recolectadas.

Mediante mqPCR se determinó la ausencia de *M. avium* y *P. aeruginosa* en todas las muestras. Las mismas cumplieron con los valores máximos permitidos para las determinaciones fisicoquímicas establecidos por la normativa disponible. Todas las muestras resultaron conformes para la ausencia de coliformes totales y *E. coli* en 100 mL de muestra, así como para la ausencia de *P. aeruginosa* en 10 mL de muestra.

Tres muestras de agua purificada y dos muestras de agua de tanque no cumplieron con el valor máximo permitido para el recuento de heterótrofos. Las muestras de agua de red pre y post filtrado presentaron los recuentos de heterótrofos y estimación de carga bacteriana más bajos.

Respecto a la presencia de *Mycobacterium* spp., mediante el método de cultivo se encontraron bacterias de este género en dos muestras de agua purificada, identificándose *M. fortuitum* en una de ellas. No se encontró la presencia de bacterias de este género en muestras de entrada de agua. La detección de este género por qPCR determinó su presencia en el 100% de las muestras.

1. Introducción

1.1 El agua como recurso

El agua es uno de los recursos naturales más importantes para nuestra existencia y la de todo organismo vivo. Es vital para la matriz productiva de cada país, el bienestar de las personas y nuestra vida diaria, en particular nuestra alimentación, salud e higiene. Así, la Organización de las Naciones Unidas ha catalogado el acceso al agua potable y el saneamiento como un derecho humano, ya que éste garantiza la capacidad de hacer efectivos todos nuestros derechos (O.N.U., 2010). Es por esto que todos los esfuerzos destinados a monitorear y garantizar la calidad del agua que utilizamos son de gran importancia.

En Uruguay, según el Decreto del Poder Ejecutivo No. 375/11 (Uruguay, 2011), se define al agua potable como “el agua apta para consumo humano, que no represente riesgos para la salud durante toda la vida del consumidor o que no genere rechazo por parte del mismo.” El tratamiento que reciben las aguas en nuestro país garantiza una calidad del agua potable que cumple con ciertos parámetros fisicoquímicos y biológicos establecidos por la norma UNIT 833:2008 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2010) y adoptada por el decreto mencionado. Dicho tratamiento implica, entre otros, la cloración, la ósmosis inversa y el tratamiento con luz ultravioleta y del agua bruta, lo que es capaz de producir agua apta para el consumo de la población (O.S.E., 2022). Sin embargo, pueden existir microorganismos patógenos (bacterias, virus, protozoarios) remanentes en el agua de grifo o punto de uso que por distintos mecanismos de resistencia pueden escapar a estos tratamientos y estar presentes en el agua suministrada.

Según lo establecido en el Decreto N° 110/011 (Uruguay, 2011), el agua distribuida por O.S.E. debe cumplir con ciertos parámetros microbiológicos, físicos y químicos que establecen los límites aceptables que debe cumplir el agua para consumo final. Entre ellos se encuentra el recuento de bacterias heterótrofas, la detección de microorganismos indicadores de contaminación, el color del agua, su pH y turbidez, así como los metales, aniones, cloro libre y contaminantes orgánicos que el agua pueda presentar (Impo, 2011).

Sin embargo, es posible que el agua presente ciertas características como olor o gusto particulares, lo que ha llevado paulatinamente a algunos consumidores a elegir equipos dispensadores de agua con filtros incorporados para su consumo. Esta preferencia se ha visto pronunciada en los últimos años debido a la contaminación que presenta el río Santa Lucía (Diario *El País*, 2015), recurso hídrico que abastece a la ciudad de Montevideo y algunas ciudades del departamento de Canelones (O.S.E., 2022).

En el caso del agua obtenida a partir de equipos dispensadores de agua, actualmente no existe reglamentación que establezca parámetros análogos a los mencionados anteriormente para el

agua de grifo. Estos equipos se promocionan como una solución y afirman proveer agua libre de sabor y olor extraños, así como de contaminantes orgánicos (Hidrored, 2022); pero debido al vacío legal mencionado, no es posible verificar la veracidad de estas afirmaciones. Existe evidencia de que factores como el agua estancada en el equipo, la temperatura del agua dispensada, así como la estructura y dimensiones de los elementos para el filtrado pueden promover la acumulación de componentes orgánicos que generan un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos (Park et al., 2019).

1.2 Microorganismos patógenos en agua

Son diversos los microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades infecciosas en toda la población por el consumo de agua contaminada, y dentro de estos microorganismos se encuentran aquellos con un comportamiento oportunista. La presencia de este tipo de microorganismos hacen aún más vulnerable a la población de individuos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, y forman parte entonces de poblaciones de riesgo (van der Wielen & van der Kooij, 2013), que al entrar en contacto con dicha agua pueden sufrir consecuencias más severas que los individuos sanos. Las enfermedades que pueden ser transmitidas por el consumo de agua contaminada son una amenaza global, responsable de un estimado de 2,2 millones de muertes anuales, así como de enfermedades entre las que se incluyen diarrea y enfermedades gastrointestinales (Ramírez-Castillo et al., 2015).

En particular, la presencia de microorganismos patógenos oportunistas en el agua para consumo implica un riesgo adicional más allá de los factores de virulencia individuales que éstos puedan presentar, y es que pueden adoptar una forma de vida en comunidad denominada *biofilm*. Como toda comunidad, implica comunicación y coordinación, intercambios y sinergia entre sus integrantes, facilitando así la permanencia y desarrollo en el contexto en que ésta se encuentre. Para las bacterias que existen en *biofilms* (que es una forma preponderante de organización para las mismas) (Lee & Yoon, 2017), esta forma de vida les permite existir y permanecer en ambientes donde de otra forma no prosperarían, entre ellos, los ambientes acuáticos (Li et al., 2015), pues les permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes, así como ver incrementados sus mecanismos de resistencia a antimicrobianos (Lee & Yoon, 2017).

Son múltiples los microorganismos que pueden adoptar esta forma de vida: bacterias, virus, hongos y protozoarios parásitos (Percival et al., 2014). Algunos son capaces de formar *biofilms de novo* o adherirse a *biofilms* ya existentes (Percival et al., 2014). Respecto a los factores bacterianos que intervienen en la formación de estas comunidades, son importantes aquellos que les permitan adherirse a la superficie, como fimbrias, flagelos y adhesinas, así como la producción de alguna sustancia polimérica extracelular (Rodney, 2002). En última instancia, esta forma de vida colabora en su permanencia en las distintas superficies (tanques y caños por los que el agua potable es transportada, por ejemplo), y su resistencia a los distintos mecanismos de desinfección.

Por otro lado, existen también factores relacionados al contexto ambiental particular que pueden contribuir al desarrollo y proliferación de microorganismos que forman *biofilms*. Un ejemplo de ello son los sistemas secundarios de distribución de agua potable (SSDAP) (cañerías, bombas presurizadoras, y tanques de agua que forman parte de la infraestructura de un edificio, Li et al., 2018), cuya función es el almacenamiento y transporte del agua desde la red principal hasta el consumidor final. Se ha demostrado que factores inherentes a los SSDAP como la disponibilidad de desinfectante residual, la temperatura del agua y los tiempos de retención de la misma pueden promover el desarrollo de patógenos oportunistas en el agua para consumo (Li et al., 2018), y de este modo comprometer la potabilidad de la misma.

Naturalmente, son de especial interés aquellos microorganismos que pueden encontrarse en *biofilms* que tienen un impacto directo en la salud humana y animal. Algunos patógenos capaces de formar biofilms en agua son *Legionella spp.*, *Naegleria fowleri*, algunas cepas de *Mycobacterium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Percival et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa y *Mycobacterium avium complex* son microorganismos con potencial de causar muerte y enfermedades (Ramírez-Castillo et al., 2015). La primera de ellas es un bacilo gram negativo aerobio, y patógeno oportunista muy exitoso que puede ser resistente a antimicrobianos (Ryan et al. 2011). Es agente etiológico de infecciones leves en individuos sanos, pero responsable de enfermedades como endocarditis, sepsis, neumonía bacteriana y meningitis en individuos inmunocomprometidos (Lee & Yoon, 2017). Esta bacteria está muy bien adaptada a los *biofilms*, y de hecho constituye el modelo de estudio de *biofilm* bacteriano (Lee & Yoon, 2017).

M. avium complex, una agrupación de diversas cepas relacionadas, aerobias, ácido-alcohol resistentes y gram positivas, es resistente al calor, al tratamiento con cloro, y a la desinfección por radiación ultravioleta (Ramírez-Castillo et al., 2015). Los miembros del *M. avium complex* son agentes etiológicos de enfermedades pulmonares principalmente, y es especialmente perjudicial en aquellos individuos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Ryan & Ray, 2011). Estos microorganismos han sido reportados presentes en agua y asociados a materia en suspensión, con una buena correlación con la turbidez del agua en la que están presentes (Percival et al., 2014). Por lo mencionado anteriormente, es pertinente la búsqueda de este grupo de bacterias en el contexto de agua para consumo.

Adicionalmente, los microorganismos pertenecientes a este complejo ven incrementado su potencial de permanencia en agua debido a su crecimiento y multiplicación dentro de amebas de vida libre confinados en vacuolas, lo que también tiene efectos muy positivos para la bacteria en términos de su virulencia (Percival et al., 2014).

En este sentido, es de vital importancia la naturaleza de los procedimientos destinados a la detección de patógenos en el agua. En particular, aquellos que han sido asociados a enfermedades transmitidas por agua, con el fin de construir normativas que sean referencia

para el control de estos microorganismos y asegurar la inocuidad del agua que se distribuye a la población.

1.3 El análisis de agua: métodos moleculares y métodos dependientes de cultivo

Los antecedentes de búsqueda microbiológica de patógenos para evaluar la calidad del agua se han basado principalmente en la utilización de métodos bioquímicos y dependientes de cultivo tradicionales (Fan et al., 2008). El avance en el conocimiento ha dado paso al empleo de nuevas metodologías cuya ventaja por encima de los métodos mencionados radica en una mayor sensibilidad y rendimiento, el poder detectar microorganismos viables no cultivables, y poder hacerlo en tiempos menores a aquellos requeridos para el cultivo (Fan et al., 2008). Estos aspectos son especialmente importantes en el estudio de muestras de agua, donde la concentración de bacterias es muy baja, y requiere métodos cuyos límites de detección sean apropiados (Li et al., 2015).

Por esta razón, es evidente la utilidad y la necesidad de aplicar métodos moleculares independientes de cultivo con la capacidad de identificar con exactitud y en poco tiempo aquellos microorganismos presentes en la muestra. Dentro de estos métodos se encuentra la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR por sus siglas en inglés). Ésta técnica es rápida y sensible, a la vez que funciona como una alternativa a los métodos dependientes de cultivo, ya que aquellas bacterias viables no cultivables podrán ser identificadas en la muestra por la presencia de una región conservada presente en su ácido nucleico. Respecto a este punto, vale destacar igualmente que una limitación intrínseca a la técnica es la detección de ácido nucleico que puede implicar la presencia tanto de microorganismos vivos como aquellos no viables, dando lugar como consecuencia a una posible sobreestimación en la detección y cuantificación (Behets et al., 2007). De manera adicional, esta técnica presenta la ventaja de prescindir de un procesamiento post reacción, por oposición a una PCR convencional, y por este motivo se ven reducidas las probabilidades de contaminación.

En el contexto de la técnica, el empleo del gen de ARN ribosomal 16S de procariotas como gen a amplificar resulta de gran utilidad en el análisis de muestras ambientales. Dicho gen está constituido por secuencias altamente conservadas que permiten el establecimiento de relaciones filogenéticas, así como regiones variables que difieren entre especies (Woese, 1987). Por ello, el análisis dirigido a la cantidad de copias presentes de este gen en una muestra ambiental, puede ser indicador de la composición microbiana existente en la misma.

1.4 *Multiplex* qPCR

Una de las variantes de la qPCR estándar o *singleplex* (aquella en la que se realiza la amplificación y cuantificación de una única secuencia nucleotídica objetivo con un único par de

cebadores), es la *multiplex* qPCR. La técnica consiste en una reacción en la que es posible amplificar más de una única secuencia diana, pudiendo realizar la detección simultánea de dos o más regiones conservadas provenientes del ácido nucleico de los microorganismos que podrían estar presentes en la muestra analizada. El desafío de esta aproximación radica en la optimización de las condiciones de amplificación, en particular, las concentraciones de los reactivos que participan en la reacción así como las posibles combinaciones entre ellas. Esto es debido a que la amplificación de una secuencia objetivo indefectiblemente afectará la amplificación de las otras secuencias diana que se amplifiquen en un mismo tubo de reacción.

En particular, la concentración de cebadores, así como de las sondas de hidrólisis dirigidos a las secuencias de los genes diana de cada microorganismo, son claves para una detección sensible y eficaz, teniendo en cuenta además las posibles interacciones que estos reactivos puedan experimentar en sus distintas concentraciones.

1.5 Aproximación a una optimización de *multiplex* qPCR

De acuerdo a lo anterior, para la aproximación de optimización de la técnica de *multiplex*, se plantea una aproximación metodológica basada en el concepto del diseño experimental de tipo factorial de dos factores. Este tipo de aproximación consiste en la evaluación de condiciones experimentales y sus réplicas correspondientes con el objetivo de observar cómo se ve afectada una variable respuesta. Estas condiciones difieren en los distintos niveles que los factores como variables independientes pueden adoptar (Selvamuthu D. & Das D., 2018). De esta forma, es posible la detección de posibles interacciones que existan entre los factores involucrados así como aquellos que tengan efectos positivos o negativos sobre la variable respuesta y la magnitud de éstos. Por el contrario, esta información no puede obtenerse en una optimización tradicional, y por ello la misma no redundará en una mayor eficiencia de los procesos que se quieran optimizar. En este sentido, el número de experimentos necesarios para llevar a cabo este tipo de optimización conduce a un notable aumento de tiempo y costos.

En un análisis factorial, el comportamiento de los factores y su incidencia en la variable respuesta son representados en un modelo con sus correspondientes parámetros y significancia estadística, por lo que es posible realizar predicciones en base al mismo. Son estas herramientas las que hacen posible la evaluación de cada condición respecto al ideal que se quiera obtener de la variable respuesta, y la consecuente elección de la condición que cumpla con ese ideal o condición óptima.

Pese a que los métodos moleculares de análisis ofrecen precisión y rapidez en la detección, en nuestro país los métodos tradicionales de cultivo siguen siendo el estándar para el análisis microbiológico de la contaminación microbiana del agua. Por este motivo, las muestras recolectadas en este trabajo también se evaluarán según la norma UNIT 833:2008 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2010). Este análisis cumple la función adicional de validación de la técnica que se quiere optimizar.

Se propone entonces como objetivo de este trabajo final, la puesta a punto de una qPCR *multiplex* para la detección conjunta de *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium avium*, y su empleo en el análisis de muestras de agua recolectadas de purificadores de agua de Facultad de Química. Estos resultados serán comparados con el análisis microbiológico tradicional de cultivo según lo establecido en la norma UNIT 833:2008. El análisis molecular comprenderá además qPCRs para cuantificación total bacteriana por *ARNr 16S* y *Mycobacterium* spp..

2. Objetivos

2.1. Objetivos generales

Evaluar la calidad del agua proveniente de tanque, de red, y de equipos purificadores de un edificio educativo mediante técnicas microbiológicas tradicionales y moleculares.

Realizar una aproximación a la optimización de la técnica *multiplex* qPCR que permita la detección simultánea de dos patógenos oportunistas si estuvieran presentes en una muestra de agua.

2.2. Objetivos específicos

Evaluar la calidad microbiológica de muestras de agua potable del sistema secundario de distribución de agua potable de la Facultad de Química por técnicas tradicionales de acuerdo a lo establecido en la norma UNIT 833:2008.

Poner a punto una *multiplex* qPCR que permita la detección conjunta de *Mycobacterium avium* y *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua.

Comparar las técnicas tradicionales de estimación de carga microbiana y búsqueda de *Mycobacterium* spp. con la técnica de detección molecular.

Evaluar la influencia de los purificadores de agua utilizados en la Facultad de Química sobre la calidad de agua para consumo obtenida.

3. Materiales y métodos

3.1: Puesta a punto de la *multiplex* qPCR

3.1.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este trabajo pertenecen a la colección del Área Microbiología de la Facultad de Química.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Pseudomonas fluorescens* 1-2016
- *Pseudomonas putida* 1-2015
- *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
- *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ATCC 25291

Además, fueron utilizados los aislamientos 364 y 394 provenientes de muestras de agua potable, aislados e identificados como *Pseudomonas aeruginosa* por la Unidad de Análisis de Agua de la Facultad de Química (UAA).

3.1.2 Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN empleado y mencionado a continuación se basó en Salvà-Serra (2018) con algunas modificaciones.

La extracción de ADN de las cepas de *Pseudomonas* fue realizada a partir de 2 mL de cultivo en caldo nutriente (incubación a 37 °C por 24 horas). Los correspondientes *pellets* obtenidos (centrifugación 10 minutos a 10.000 rpm) fueron lavados con 600 µL de suero fisiológico estéril. A continuación fueron adicionados 200 µL de buffer TE pH 8, 10 µL de lisozima 100 mg/mL y el contenido fue incubado a 37 °C durante 15 minutos. Luego, fueron adicionados 350 µL de buffer TE, 3 µL de proteinasa K 20 mg/mL, y 30 µL de buffer SDS 10 %. La incubación en este paso fue a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, fueron agregados 100 µL de NaCl 5M y 80 µL de CTAB/NaCl y la incubación fue realizada a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, fueron adicionados 800 µL de cloroformo/isoamílico (24:1:1), y el contenido fue homogeneizado y centrifugado durante 10 minutos a 10.000 rpm. A la fase acuosa le fueron adicionados 2,5 µL de ARNasa 10 mg/mL libre de DNAsa, seguido de una incubación durante 60 minutos, la adición de 0,6 volúmenes de isopropanol frío y centrifugación a 0 °C durante 5 minutos a 10.000 rpm. Los *pellets* fueron lavados 2 veces con 900 µL de EtOH 70 % y secados en estufa a 45 °C durante 30 minutos, hasta la desaparición del EtOH. El ADN extraído fue resuspendido en 50 µL de agua Milli-Q estéril, e incubado a 65 °C durante 30 minutos.

La extracción de ADN de *Mycobacterium smegmatis* fue realizada según el protocolo de Salvà-Serra (2018), con las diferencias mencionadas a continuación. El medio de cultivo de

partida fue caldo Mueller Hinton (Oxoid, USA), y el paso posterior a la resuspensión del *pellet* en buffer TE pH 8 incluyó la adición de 0,5 g de perlas de vidrio de 0,5 mm (Biospec, USA).

La calidad de las extracciones de ADN y la integridad del mismo fue evaluada mediante gel de agarosa al 0,8 % como se detalla en el Anexo. Todas las extracciones fueron purificadas empleando el *kit* de purificación DNA Clean Concentrator (Zymo Research, USA).

De manera adicional, las extracciones de ADN de todas las cepas de *Pseudomonas* y *Mycobacterium smegmatis* fueron realizadas con el *kit* de extracción ZR Soil Microbe DNA Miniprep™ (Zymo Research, USA).

La extracción de ADN de *Mycobacterium avium* fue realizada por el Departamento de Laboratorios de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP). El *kit* empleado para la extracción de ADN de este microorganismo fue GenoLyse® kit Hain Lifescience.

3.1.3 Cuantificación de las extracciones de ADN

Todas las extracciones de ADN fueron cuantificadas con el fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA) a partir de 2 µL de ADN.

3.1.4 Reactivos y oligonucleótidos utilizados en *singleplex* y *multiplex* qPCR

Para la detección molecular de los microorganismos de interés fueron elegidas las secuencias conservadas correspondientes a los genes *regA* de *Pseudomonas aeruginosa*, codificante del regulador positivo de la expresión de la exotoxina A (Zimniak, L., Dayn, A., & Iglewski, B. H. (1989); y el gen *ARNr 16S* de *M. avium*.

Los oligonucleótidos empleados en la técnica fueron tomados de la investigación de van der Wielen & van der Kooij, (2013), y la evaluación de sus características y especificidad fue llevada a cabo en la plataforma Primer3Plus (Untergasser et al., 2021). El detalle de estas secuencias se encuentra en la Tabla 1.

La complementariedad entre las secuencias nucleotídicas de los genes de interés y los cebadores y sondas empleados en los experimentos de qPCR fue verificada utilizando el algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (RRID:SCR_001598) (Altschul et al., 1990).

Tabla 1. Nombres y secuencias de los cebadores y sondas empleados en las qPCR

Microorganismo	Gen objetivo	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>regA</i>	Cebador F	ATCGAGTACCTGAACCGGC
		Cebador R	TGGTGCAGTTCCTCATTGTC
		Sonda	HEX-CCAGATGCTTTGCCTCAAC
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>ARNr 16S</i>	Cebador F	GCCTCTTCGGAGGTAAGTCG
		Cebador R	ACCAGAAGACATGCGCTTTG
		Sonda	FAM-CAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAG

Los experimentos de qPCR fueron realizados en un termociclador Rotor-Gene® Q MDx 5PLEX HRM (Qiagen). Todas las reacciones¹ fueron llevadas a cabo (con concentraciones variables de cebadores y sondas según la condición experimental), de acuerdo al siguiente detalle:

Tabla 2. Composición de las reacciones *singleplex* qPCR

Componente	Volumen (μL)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. avium</i>
Agua Milli-Q	2,2	1,6
IQ Supermix BIO-RAD	5,0	5,0
BSA 20 mg/mL Thermo Scientific	0,2	0,2
Cebador <i>forward</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,2	-
Cebador <i>reverse</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,2	-
Sonda de hidrólisis HEX	0,2	-
Cebador <i>forward</i> <i>M. avium</i>	-	0,2
Cebador <i>reverse</i> <i>M. avium</i>	-	0,2
Sonda de hidrólisis FAM	-	0,2
ADN	2,0	2,0
Volumen total	10	

Tabla 3. Composición de las reacciones *multiplex* qPCR

Componente	Volumen (μL)
Agua Milli-Q	1,6
IQ Supermix BIO-RAD	5
BSA 20 mg/mL Thermo Scientific	0,2
Cebador <i>forward</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,2
Cebador <i>reverse</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,2
Sonda de hidrólisis HEX	0,2
Cebador <i>forward</i> <i>M. avium</i>	0,2
Cebador <i>reverse</i> <i>M. avium</i>	0,2
Sonda de hidrólisis FAM	0,2
ADN	2
Volumen final	10

¹ Todos los cebadores y sondas utilizados en qPCR fueron producidos en Macrogen (Seul, Corea).

El ciclo de amplificación utilizado en los experimentos de qPCR *singleplex* y *multiplex* consistió en un paso inicial de desnaturalización del ADN durante 120 segundos a 95 °C, seguido por 43 ciclos de 20 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

Un rango de lectura de fluorescencia de 5FI-10FI fue establecido para los canales de ambas sondas de hidrólisis (verde para la sonda FAM, y amarillo para la sonda HEX, por sus respectivas longitudes de onda de emisión), siguiendo las recomendaciones del manual de usuario del termociclador empleado para este tipo de química de detección.

La visualización y análisis de los experimentos de qPCR fue realizada en el programa Rotor-Gene Q Series (Rotor-Gene Q Series Software versión 2.3.1 (Build 49)).

3.1.5 Reacciones *singleplex* y *multiplex* qPCR

Las reacciones de cada experimento de qPCR fueron realizadas por triplicado, tanto para las muestras como para los controles negativos, positivos, y blancos (en adelante *NTC*: “no template control”, en los que el ADN fue sustituido por agua Milli-Q estéril).

Las concentraciones finales de ADN empleadas en *singleplex* qPCR, tanto de *P. aeruginosa* como de *M. avium*, y los controles de reacción fueron 0,0025 µg/mL y 0,005 µg/mL, con los volúmenes de reacción descritos en Tabla 2, y con las dos sondas y juegos de cebadores respectivos en concentración 10 µM. La reacción también fue testada en *multiplex*, con concentración de ADN a 0,005 µg/mL y oligonucleótidos a 10 µM, de acuerdo a la tabla Tabla 3.

Estas reacciones fueron evaluadas en cuanto a la especificidad de cada par de cebadores y sonda con su respectiva secuencia, en la medida que sólo tuviera lugar una amplificación exclusiva del ADN *target*. Para ello, se determinó que valores de ciclos superiores a 35 corresponden a la amplificación esperada en tubos *NTC*.

Los controles positivos y negativos para la amplificación y detección de *P. aeruginosa* y *M. avium* se detallan en la tabla a continuación.

Tabla 4. Controles de qPCR

	Control positivo	Control negativo
Detección <i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P. fluorescens</i> 1-2016
	<i>P. aeruginosa</i> 364	<i>P. putida</i> 1-2015
	<i>P. aeruginosa</i> 394	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ATCC 25291
Detección <i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ATCC 25291	<i>M. smegmatis</i> ATCC 607
		<i>P. fluorescens</i> 1-2016
		<i>P. putida</i> 1-2015
		<i>M. smegmatis</i> ATCC 607

3.1.6 Aproximación a la optimización de *multiplex* qPCR mediante diseño factorial

El diseño factorial fue realizado utilizando el programa Design Expert 13 (StatEase Inc., Minneapolis, MN, USA). El mismo fue de único bloque, sin punto central y de tipo 2², por lo que fueron realizados 4 experimentos de qPCR, con tres réplicas por condición experimental.

Los factores incluidos en el diseño fueron la sonda de hidrólisis HEX y los cebadores de *P. aeruginosa*, y la sonda de hidrólisis FAM y los cebadores de *M. avium*. Ambos factores fueron examinados en un nivel mínimo de 5 µM, y un nivel máximo de 15 µM.

Las respuestas dependientes de los factores mencionados fueron los valores del ciclo de cuantificación (*quantification cycle*, *Cq* por sus siglas en inglés), del *pool* de ADN obtenidos en qPCR para la detección del ADN de *P. aeruginosa* y *M. avium*.

Los controles negativos de estos ensayos de qPCR fueron *P. fluorescens* y *M. smegmatis*. *M. avium* y *P. aeruginosa* fueron los controles positivos. También fueron incluidos los correspondientes controles *NTC*.

3.1.7 Análisis estadísticos

Los resultados experimentales de qPCR (valores de *Cq*) fueron comparados por ANOVA (análisis de varianza) de una vía, y las medias de cada grupo fueron comparadas por el test *LSD* (*least significant difference*) de Fisher en el *software* Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Diferencias con un $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

3.1.8 Estudio de la linealidad de *multiplex* qPCR

Para estudiar la linealidad de la técnica luego de definidas las condiciones de puesta a punto, fueron llevados a cabo experimentos de qPCR con diluciones de ADN estándar de *P. aeruginosa* y *M. avium*.

Los amplicones de ADN estándar de *P. aeruginosa* y *M. avium* fueron obtenidos por PCR a tiempo final. Los mismos corresponden a un fragmento del gen *regA* (80 pb) de *P. aeruginosa*, y

un fragmento del gen *ARN16S* (127 pb) de *M. avium*. Junto a ellos, fueron incluidos los correspondientes controles *NTC* conteniendo la *mix* de reacción y 1 μ L de agua Milli-Q estéril.

El ADN de partida utilizado fue obtenido a partir de la extracción por *kit* comercial como se describió en el punto 3.1.2 para ambos microorganismos. Los cebadores utilizados para la amplificación corresponden a aquellos descritos en la tabla 1.

Tabla 5. Composición de la reacción de PCR convencional para amplificación de ADN estándar

Componente	Volumen (μ L)
10X PCR Buffer	2,5
dNTP mix 10 μ M	2
Cebador <i>forward</i>	1,25
Cebador <i>reverse</i>	1,25
Agua Milli-Q	16,5
<i>High Taq DNA polymerase</i>	0,5
ADN	1
Volumen final	25

La verificación de la presencia de los productos de amplificación fue realizada mediante gel de agarosa al 2%, a partir del cual fueron purificadas las bandas correspondientes a cada amplicón. La purificación de bandas fue realizada con el *kit* QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, USA). La cantidad de copias de cada fragmento amplificado fue determinada en base a la cuantificación por Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA) del ADN purificado obtenido.

Para la construcción de las respectivas curvas de calibración, fueron preparadas diluciones seriadas en base 10 de cada ADN estándar, así como de un *pool* compuesto por ambos estándares de ADN en igual proporción. Los valores de *C_q* obtenidos fueron representados gráficamente frente a la concentración de ADN (n° de copias/ μ L), y los puntos resultantes fueron ajustados a una recta mediante una regresión lineal.

En cada experimento de linealidad fueron sembrados por triplicado las diluciones de cada estándar, controles *NTC*, una dilución de ADN genómico de *P. aeruginosa* así como de *M. avium* a 0,005 μ g/mL, y un *pool* de ADN genómico de *P. aeruginosa* y *M. avium* de concentración 0,005 μ g/mL.

La sensibilidad analítica de la técnica, representada por el límite de detección (Limit of detection, *L.O.D.* por sus siglas en inglés), fue establecido como la resta entre el promedio de los valores de *C_q* de los *NTC* (si estos tuvieran uno), y 3,32 ciclos de amplificación. En ausencia de valores de *C_q* para los *NTC*, el *LOD* fue definido como la mínima concentración de dilución de ADN estándar detectable. Este resultado definió aquel valor de *C_q* asociado a la mínima concentración de ADN *target* que fue posible detectar por la *multiplex* qPCR en las condiciones definidas en el diseño factorial. Las muestras positivas fueron aquellas con valores

de C_q inferiores al LOD para 2 de sus 3 réplicas. Aquellas muestras con valores de C_q promedio superiores al LOD fueron consideradas negativas.

El límite de cuantificación (Limit of quantification, L.O.Q. por sus siglas en inglés), fue definido como el C_q promedio correspondiente la dilución mayor del estándar con un coeficiente de variación asociado menor al 25% (Kralik, P., & Ricchi, M., 2017). Este valor fue calculado como el cociente entre la desviación estándar del número de copias/ μ L para cada estándar y el promedio de este valor, multiplicado por 100. Las muestras cuyo valor de C_q promedio se ubicó entre el LOQ y el LOD fueron consideradas detectables no cuantificables.

3.2 Análisis de muestras de agua

3.2.1 Sistema en estudio

Todas las muestras de agua fueron recolectadas en instalaciones de la Facultad de Química, su edificio central y el Instituto de Química. Las muestras fueron obtenidas de 4 equipos purificadores de agua como el que se muestra en la figura 1, así como agua de red de O.S.E., y agua proveniente de tanque de abastecimiento tanto para el edificio central como para el Instituto de Química.

El material responsable del filtrado del agua en los equipos purificadores muestreados es carbono granular activado acompañado de polipropileno, ambos con poros de 5 μm .



Figura 1. Equipo purificador Hidrored C3000.

3.2.2 Metodología de muestreo

El muestreo para el análisis microbiológico fue realizado según UNIT-ISO:19458:2006 “Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico”. El agua fue recolectada en bolsas estériles Whirl-Pak de 2 L con una concentración final de tiosulfato de sodio de 0,01 g/L, y bolsas Whirl-Pak® Thio-Bags® de 0,3 L con una concentración final de tiosulfato de sodio de 0,083 g/L.

Luego de la desinfección del punto de salida del agua, se procedió a la purga de la línea durante 5 minutos. Fueron recolectados 3,3 L de agua que fueron almacenados en cámara de refrigeración a 2 - 10 °C y procesados dentro de las 24 horas siguientes.

Tabla 6. Detalle de las muestras recolectadas para análisis

	Código	Punto de muestreo
Salidas de agua	ESP1	Equipo Salida Piso 1 Central
	ESIQ	Equipo Salida Instituto Química
	ESPI	Equipo Salida salón Piedra
	ESSS	Equipo Salida Subsuelo
Entradas de agua	ATEP1	Agua Tanque Entrada Piso 1 Central
	ATEIQ	Agua Tanque Entrada Instituto Química
	ATEPI	Agua Tanque Entrada salón Piedra
	ARSS	Agua Red Subsuelo

3.2.3 Determinaciones fisicoquímicas

En cada punto de muestreo fueron realizadas las siguientes determinaciones fisicoquímicas en colaboración con el Área de Muestreo de la Unidad de Análisis de Agua. Las mismas fueron llevadas a cabo según la norma ISO:5667-5 “Calidad del agua. Muestreo. Guía para muestreo de agua potable de las usinas de tratamiento y sistemas de distribución”.

- Temperatura (Termómetro Digital Rt320)
- pH (pHmetro OAKTON® modelo pHTest)
- Turbidez (turbidímetro HACH® 2100Q)
- Cloro libre (colorímetro HACH® Pocket II)
- Conductividad (HACH Pocket Pal™)

3.2.4 Análisis microbiológicos

Para evaluar la calidad microbiológica de las muestras de agua fueron realizados los análisis microbiológicos de conformidad con lo requerido por la norma UNIT 833:2008. Para ello, todas las muestras fueron homogeneizadas (según la sección 1060 A del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (*SMEWW* por sus siglas en inglés) (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017), y el volumen correspondiente fue sembrado en distintos medios de

cultivo según lo requerido por dicha normativa. El detalle de los mismos puede encontrarse en el Anexo.

Los microorganismos utilizados como controles positivo o negativo según el análisis microbiológico fueron *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739 (pertenecientes a la colección de microorganismos de la UAA, Facultad de Química). Ambos fueron tomados a partir de cultivo fresco en medio Agar Triptona de Soya (TSA), e incubados a 35 - 37 °C durante 48 horas.

3.2.4.1 Detección de coliformes totales y *E. coli* en 100 mL de muestra

El procedimiento empleado para esta búsqueda se basó en la sección 9223 del *SMEWW* (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017).

Un volumen de 100 mL de cada muestra fue transferido asépticamente a bolsas estériles de análisis con un sobre del medio comercial Colitag™ (Neogen, USA), y el contenido fue homogeneizado por agitación suave.

Los controles positivo y negativo consistieron en la inoculación de 100 mL agua destilada estéril con *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Todas las muestras fueron sometidas a una pre-incubación a $44,5 \pm 1,0$ °C por 7 minutos en baño termostatzado. Posteriormente, fueron incubadas a $35,0 \pm 1,5$ °C durante 16 - 22 horas. La observación del desarrollo de turbidez y color amarillo intenso constituyeron una prueba positiva para coliformes totales. Además, la visualización de fluorescencia azul brillante en luz UV a 365 nm fue considerada como resultado positivo para la presencia de *E. coli*.

3.2.4.2 Recuento de heterótrofos

El recuento de heterótrofos fue llevado a cabo según el método descrito en la sección 9215B del *SMEWW* (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017). Fueron sembrados 0,1 mL y 1 mL de muestra incorporados en medio de cultivo R2A (BD Difco™, USA), seguido de su incubación a 35°C - 37°C durante 48 horas.

3.2.4.3 Detección de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 mL de muestra

El método empleado para esta búsqueda se basó en el apartado 9213 F del *SMEWW* (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017). Para el ensayo presuntivo, 10 mL de cada muestra fueron sembrados asépticamente en caldo asparagina de doble concentración (preparado a partir de los componentes), e incubados en estufa a $35,5 \pm 1,5$ °C durante 24 - 48 horas. Los controles positivo y negativo consistieron en la inoculación del agua destilada estéril con *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente. Además, fue incluido un control blanco con 10 mL de agua destilada estéril en el medio de cultivo. La turbidez de cada tubo fue evaluada así como la fluorescencia detectable bajo luz ultravioleta a 365 nm. Un resultado positivo presuntivo fue aquel en el que se observó turbidez y el desarrollo de un pigmento verde fluorescente y fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Para el ensayo confirmatorio, 100 uL del caldo positivo presuntivo fueron sembrados asépticamente en 10 mL de caldo acetamida (preparado a partir de los componentes), e incubados a 35 - 37 °C durante 24 - 48 horas. Las cepas control para este ensayo fueron las mismas que las del caldo asparagina. La identificación de un resultado positivo confirmatorio de la presencia de *P.aeruginosa* se determinó por el viraje del medio hacia un color violeta o fucsia intenso. De manera adicional, el caldo positivo presuntivo en asparagina fue sembrado en agar cetrimide e incubado a 42 °C por 48 horas, empleando *P. aeruginosa* como control positivo.

3.2.4.4 Caracterización de muestras positivas de caldo asparagina

Las muestras positivas en caldo asparagina que no confirmaron la presencia de *P. aeruginosa* fueron sembradas en placas de agar TSA a los efectos de la caracterización fenotípica y bioquímica de los microorganismos presentes. Cada reislamiento fue sembrado en un nuevo caldo asparagina y evaluado con los criterios de positividad mencionados previamente para este medio de cultivo. Los resultados de los reislamientos en el mismo determinaron otra serie de pruebas para contribuir a la identificación de los microorganismos en cuestión a nivel de género.

Cada reislamiento que verificó el crecimiento en caldo asparagina fue sembrado en medio de cultivo Hugh-Leifson (BD DIFCO™, USA), con la adición de glucosa e incubado a 35 - 37 °C durante 48 horas. De manera adicional, a cada uno de ellos se le realizó la tinción de Gram y prueba de oxidasa. Aquellos reislamientos cuyo comportamiento en estas pruebas coincidió con el género *Pseudomonas*, fueron sembrados en agar King A (Merck Millipore, Alemania), y agar Cetrimide (Merck Millipore, Alemania), e incubados a 35 - 37 °C por 48 horas, y en caldo nutriente incubados a 42 °C durante 24 horas.

3.2.4.5 Detección de *Mycobacterium spp.* en 500 mL de muestra

Todas las muestras fueron homogeneizadas y un volumen de 0,5 L por muestra fue filtrado con bomba de vacío por membrana estéril de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius™, Alemania). Todas las muestras fueron descontaminadas de acuerdo al procedimiento N° 2 de descontaminación de muestra y cultivo establecido en el apartado 9260 M para *Mycobacterium* en el SMEWW (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017).

A cada membrana de filtración le fueron adicionados 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 g de perlas de vidrio de 2,5 mm (Biospec, USA). Luego, los tubos fueron agitados a 1200 rpm durante 5 minutos y se les adicionaron 10 mL de solución 1M de NaOH. Posteriormente, fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 6000 rpm a 4°C durante 20 minutos. A continuación fueron adicionados a los *pellets* 5 mL de solución de ácido oxálico al 5% para luego ser incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos, repitiendo el paso de centrifugación con un lavado con 30 mL de agua destilada estéril. El *pellet* resultante fue resuspendido en 0,7 mL de agua destilada estéril. Para cada muestra de salida de agua purificada, fueron tomados 0,1 mL de esta descontaminación y sembrados en superficie en

medio de cultivo Middlebrook (preparado a partir de los componentes). Para las muestras de entrada de agua a los equipos de filtración, el mismo volumen fue sembrado en superficie en medio de cultivo Löwenstein-Jensen (preparado por la CHLA-EP). La incubación de estos medios de cultivo fue realizada por 14 días a 35 - 37°C.

La identificación molecular a nivel de género de las colonias presuntas *Mycobacterium* spp. obtenidas en ambos medios fue realizada con el test GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience GmbH, Alemania) por la CHLA-EP.

3.2.5 Extracción de ADN total a partir de membranas de filtración

Las muestras fueron homogeneizadas y un volumen de 2 L por muestra fue filtrado por membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius™, Alemania). La extracción de ADN total de cada membrana de filtración fue realizada con el kit Qiagen PowerSoil (Qiagen, USA).

Para la concentración del ADN extraído, el mismo fue centrifugado durante 20 segundos previo a su concentración por evaporación al vacío en Speed Vac (Thermo Scientific, USA) durante 45 minutos a 45 °C y 6,8 torr. El ADN concentrado a sequedad fue resuspendido en 50 µL de agua Milli-Q estéril, y sometido a agitación a 300 rpm durante 60 minutos. El mismo fue almacenado en freezer a - 20 °C hasta su utilización en el análisis molecular de cada muestra por qPCR.

3.2.6 Análisis molecular de las muestras de agua por *multiplex* qPCR

Cada muestra fue analizada en la *multiplex* qPCR en las condiciones seleccionadas (5 µM para todos los cebadores y ambas sondas). En este experimento se incluyeron además, por triplicado, controles *NTC*, *P. aeruginosa* y *M. avium* como controles positivos, así como el *pool* de ADN de estos microorganismos en una concentración de 0,005 µg/mL.

3.2.7 qPCR *ARNr 16S*

La cuantificación del número de copias del gen *ARNr 16S* en las muestras recolectadas fue realizada a partir de una curva de calibración con un estándar de ADN de $2,0 \times 10^9$ copias del fragmento del gen/µL. El mismo fue obtenido por PCR como fue mencionado en el punto 3.1.8. Para la amplificación por PCR fueron utilizados los oligonucleótidos detallados en la Tabla 7, tomados de Douterelo, I., et al. (2018). Cabe destacar que la amplificación del fragmento de este gen fue realizada a partir de ADN genómico extraído de una muestra de agua y no de una cepa pura.

A partir del ADN estándar fueron realizadas 5 diluciones seriadas en base 10 para la construcción de la curva de calibración. En este experimento de qPCR fueron incluidos el control *NTC*, el ADN proveniente de cada muestra de agua, *P. aeruginosa* como control positivo, y las diluciones del estándar en un rango de $2,0 \times 10^7$ - $2,0 \times 10^3$ copias del fragmento del gen/µL. Los cebadores fueron empleados en una concentración de 10 µM. La composición de esta reacción puede encontrarse en la Tabla 8.

Tabla 7. Nombres y secuencias de los cebadores y sondas empleados

Microorganismo	Gen objetivo	Nombre	Secuencia (5'-3')
Bacteria	ARNr 16s	Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
		Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG

Tabla 8. Composición de la reacción de qPCR ARNr 16S

Componente	Volumen (μL)
Agua Milli-Q	3
IQ SYBR Green supermix	5
Cebador <i>forward</i>	0,5
Cebador <i>reverse</i>	0,5
ADN	1
Volumen final	10

El límite de detección de este ensayo fue definido como el promedio de los valores de *Cq* de *NTC* - 3,3 ciclos. El límite de cuantificación fue determinado como el valor promedio de *Cq* de la dilución del estándar con un coeficiente de variación inferior al 25% (Kralik, P., & Ricchi, M., 2017). El cálculo del mismo fue realizado de la misma forma que para la linealidad de la *multiplex* qPCR.

3.2.8 qPCR *Mycobacterium* spp.

Los experimentos de qPCR para la detección de *Mycobacterium* spp. en las muestras de agua fueron realizados con cebadores y sonda tomados de van der Wielen & van der Kooij, (2013) en una concentración de 10 μM. El detalle de los mismos puede encontrarse en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Nombres y secuencias de los cebadores y sondas empleados en la qPCR

Microorganismo	Gen objetivo	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>Mycobacterium</i> spp.	ARNr 16S	Cebador F	GGGCGATACGGGCAGAC
		Cebador R	GAAACCGACACCTAGTACC
		Sonda	CAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTA

El experimento incluyó el control *NTC*, *P. aeruginosa* como control negativo, *M. avium* y *M. smegmatis* como controles positivos, y el ADN correspondiente a cada una de las 8 muestras de análisis. Además, con la finalidad de construir la correspondiente curva de calibración, se incluyeron 6 diluciones seriadas en base 10 del estándar (producto de PCR del amplicón del fragmento gen *target* ARNr 16S cuya secuencia es conservada para este género), en un rango

de $9,8 \times 10^6$ - $9,8 \times 10^1$ copias del fragmento del gen/ μL . El detalle de la composición de esta reacción puede encontrarse en la tabla Tabla 10.

Tabla 10. Composición de la reacción de qPCR *Mycobacterium* spp.

Componente	Volumen (μL)
Agua Milli-Q	2,2
IQ Supermix BIO-RAD	5
BSA 20 mg/mL Thermo Scientific	0,2
Cebador <i>forward</i>	0,2
Cebador <i>reverse</i>	0,2
Sonda de hidrólisis	0,2
ADN	2
Volumen final	10

El *LOD* para este ensayo fue definido como el promedio de los valores de *Cq* de *NTC* - 3,3 ciclos. El límite de cuantificación fue definido y calculado de la misma forma que para la linealidad de la *multiplex* qPCR.

4. Resultados y discusión

4.1: Aproximación a optimización de la *multiplex* qPCR

4.1.1 Evaluación *in silico* de los cebadores y sondas utilizados

La evaluación *in silico* de los cebadores a ser empleados en un experimento de qPCR es fundamental para llevar a cabo experimentos robustos y específicos previo a su validación experimental en el laboratorio. Para el caso del cebador *forward* de *P. aeruginosa*, se obtuvo que el mismo presenta una temperatura de *melting* de 60,1°C, mientras que la del cebador *reverse* es de 59,7°C. La temperatura de *melting* del cebador *forward* de *M. avium* es de 60,0°C, y la de su cebador *reverse* de 58,9°C.

Teniendo en cuenta que una diferencia entre cebadores de hasta 2 °C en su temperatura de *melting* es aceptable (Thornton, B., & Basu, C., 2011), los cebadores empleados en este trabajo cumplieron con este requisito. Por esto, sería esperable que no tuviera lugar una formación de horquillas y no se viese afectada la eficiencia de la amplificación. Respecto al porcentaje de guanina y citosina en los cebadores utilizados, para los cebadores *forward* y *reverse* de *P. aeruginosa* el mismo es de 57,9 y 50,0 respectivamente, mientras que para los cebadores de *M. avium* estos porcentajes son de 63,2 para el cebador *forward*, y de 50,0 para el cebador *reverse*. Este porcentaje también es relevante para el desempeño de los cebadores debido a que es necesario cierto nivel de estabilidad entre el oligonucleótido y el ADN *template*, y porque a medida que este porcentaje aumenta, puede verse dificultada la desnaturalización en qPCR. Los porcentajes obtenidos para los cuatro cebadores son aceptables debido a que es recomendable que este valor se encuentre entre 30% y 80% (Bio-Rad, 2022).

Del análisis *in silico* se obtuvo además que los cebadores *forward* y *reverse* de *M. avium* no forman dímeros, pero sí pueden formar estructuras secundarias de alta y moderada estabilidad respectivamente, lo que podría afectar su hibridación con el ADN *template* de *M. avium* en una reacción de qPCR. Respecto a los cebadores de *P. aeruginosa*, este análisis determinó que ninguno de ellos forma dímeros ni estructuras secundarias que pudieran afectar su desempeño en la reacción.

Los cuatro cebadores empleados en la técnica presentan una longitud que se encuentra en el rango óptimo de 18 - 24 nucleótidos. Esta característica de los cebadores es importante para descartar que bajas eficiencias experimentales puedan deberse a *mismatches* por tener una longitud menor a la recomendada, o requerir un incremento en la temperatura de hibridación en el caso opuesto (Bio-Rad, 2022).

La especificidad entre el *template* de ADN que se quiere amplificar y los cebadores y sondas diseñados para ello también son determinantes. El análisis de la especificidad realizado en Primer3Plus mostró que los cebadores *forward* y *reverse* de *M. avium* y *P. aeruginosa* hibridan

con sus secuencias objetivo, logrando productos de amplificación de una longitud de 127 pares de bases para el fragmento del gen de *ARN16S* de *M. avium*, y de 80 pares de bases para el fragmento del gen *regA* de *P. aeruginosa*.

Cuando fue evaluada *in silico* la especificidad de las sondas de hidrólisis en la plataforma mencionada, se observó que la sonda dirigida a la amplificación del ADN de *P. aeruginosa* no interactúa con la secuencia de ADN *target* de *M. avium* y viceversa.

La búsqueda realizada en BLASTn con el objetivo de determinar las coincidencias de las secuencias de las dos sondas y los dos juegos de cebadores con la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information), también contribuyó a la evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos a ser utilizados en la qPCR.

Se encontró que los cebadores para *M. avium* tenían coincidencias con la secuencia del gen *ARN16S* de diferentes especies del género *Mycobacterium*, mostrando especificidad hacia este género exclusivamente. Este resultado coincide con el análisis realizado por los autores (van der Wielen & van der Kooij, 2013). Las especies encontradas fueron:

M. avium subsp. *avium*, *M. lepraemurium*, *M. florentinum*, *M. genavense*, *M. helveticum*, *M. mantonii*, *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. colombiense*, *M. vulneris*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Para la sonda de hidrólisis FAM, la búsqueda por BLASTn filtrando por aquellas secuencias tipo (*sequences from type material*), mostró que su secuencia tiene coincidencias con múltiples especies del género *Mycobacterium*, algunas de ellas no pertenecientes a *M. avium complex*. Estas secuencias fueron agregadas recientemente a NCBI y son de relevancia clínica, ya que han sido asociadas a enfermedades e infecciones en humanos y animales (Abe, Y. et al. 2022, Ghielmetti, G., et al., 2021). A los efectos prácticos del objetivo de este trabajo, teniendo en cuenta que estas secuencias también corresponden a patógenos oportunistas y que este análisis indicó que la detección de microorganismos pertenecientes a *M. avium complex* es factible empleando los cebadores de *M. avium* y la sonda FAM, se decidió utilizarlos en la qPCR.

En el caso de los cebadores para *P. aeruginosa*, la búsqueda arrojó coincidencias exclusivamente con distintas cepas de este microorganismo. El mismo tipo de búsqueda para la sonda de hidrólisis mostró que la secuencia de la sonda HEX es específica para el género *Pseudomonas* y la especie *aeruginosa*.

Respecto a la evaluación *in silico* de los oligonucleótidos empleados en qPCR, vale destacar que este tipo de análisis no necesariamente es un fiel reflejo del comportamiento experimental de los mismos, e incluso puede no ser una garantía de especificidad cuando se trata de ADN proveniente de muestras ambientales (So et al., 2020).

4.1.2 Extracción y cuantificación de ADN

Tanto la extracción realizada con *kit* comercial como aquella realizada en base al protocolo de Salvà-Serra (2018) fueron exitosas, obteniéndose las concentraciones de ADN detalladas en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación de ADN

Microorganismo	ADN (µg/mL)	
	Manual	Kit comercial
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,603	58
<i>P. aeruginosa</i> 394	2,88	409
<i>P. fluorescens</i> 1-2016	16,4	42,5
<i>P. putida</i> 1-2015	1,73	42,5
<i>P. aeruginosa</i> 364	2,35	258
<i>M. smegmatis</i> ATCC 607	1,77	47,7

Los valores de cuantificación fueron mayores en todos los casos para las extracciones realizadas con *kit* comercial de extracción. Por este motivo, los experimentos de qPCR fueron realizados con el ADN obtenido por dicho procedimiento.

Por otro lado, también fueron cuantificadas las extracciones de ADN de *M. avium* recibidas desde la CHLA-EP, que por este motivo no fueron incluidas en la comparación mencionada anteriormente. El resultado promedio de dicha cuantificación fue de 2,48 µg/mL.

En base a los resultados de cuantificación, fueron realizadas las diluciones de ADN correspondientes a las dos concentraciones a testear en qPCR para la optimización: 0,0025 µg/mL y 0,005 µg/mL.

4.1.3 Especificidad de cebadores y sondas y concentración mínima de ADN detectable

Como fue mencionado previamente, la especificidad de un ensayo de qPCR es fundamental para la obtención de resultados válidos que informen con precisión la presencia de microorganismos que impliquen potenciales riesgos para la salud. De igual forma, la sensibilidad de esta técnica también es objeto de optimización, especialmente trabajando con agua potable, ya que la misma ha sido sometida a tratamientos de desinfección, por lo que se espera que los microorganismos oportunistas que se encuentren en ella estén en bajas concentraciones (Huang et al., 2021). Adicionalmente, debido a que este trabajo buscó acercarse a las mejores condiciones para la detección simultánea del ADN de *P. aeruginosa* y *M. avium*, los ensayos de qPCR también incluyeron un *pool* del ADN de estos microorganismos.

Para cumplir con este objetivo, fueron llevados a cabo experimentos *singleplex* para estudiar la especificidad de los cebadores y sondas, y la capacidad de detección.

4.1.3.1 *Singleplex P. aeruginosa* y *M. avium* 10 μ M 0,0025 μ g/mL y 0,005 μ g/mL

Estos ensayos de qPCR fueron realizados empleando la sonda HEX (detección de *P. aeruginosa*), los cebadores regA-R y regA-F de *P. aeruginosa*; y la sonda FAM (detección de *M. avium*) y los cebadores de *M. avium* Mycav-F y Mycav-R, todos ellos en una concentración de 10 μ M para cada experimento *singleplex*.

En primera instancia, la técnica fue evaluada en una concentración final mínima de ADN *template* permitida por el *kit* de 0,0025 μ g/mL, y luego esta concentración fue incrementada a 0,005 μ g/mL para mejorar la detección. *P. aeruginosa* y *M. avium* fueron los controles positivos en sus respectivas *singleplex*, mientras que *Pseudomonas no aeruginosas* y *M. smegmatis* fueron los controles negativos de ambas reacciones.

Respecto a la capacidad de detección de la técnica a la menor concentración de ADN permitida por la *supermix* utilizada (0,0025 μ g/mL), en la *singleplex* de *P. aeruginosa* fueron obtenidos resultados favorables ya que hubo detección tanto para el control positivo como para las cepas de *P. aeruginosa* provenientes de muestras de agua potable. Debido a que este estudio tiene dentro de sus objetivos la detección de esta especie en agua para consumo, se consideró el valor de *Cq* promedio de las 3 cepas para tener en cuenta la variabilidad biológica de las mismas. Para estas condiciones el mismo fue 27,10. Para los *NTC*, las *Pseudomonas no aeruginosas*, *M. avium* y *M. smegmatis*, este valor superó los 35 ciclos, por lo que se consideró que el ADN de estos microorganismos no interfiere con el ADN *target*. Este resultado implica entonces que existe una relación de especificidad entre los cebadores y su secuencia objetivo en el gen *RegA*, y entre la sonda de hidrólisis HEX y esta misma secuencia.

Las curvas de amplificación representativas del ensayo *singleplex* 10 μ M 0,005 μ g/mL para *P. aeruginosa* pueden apreciarse en la figura 2.

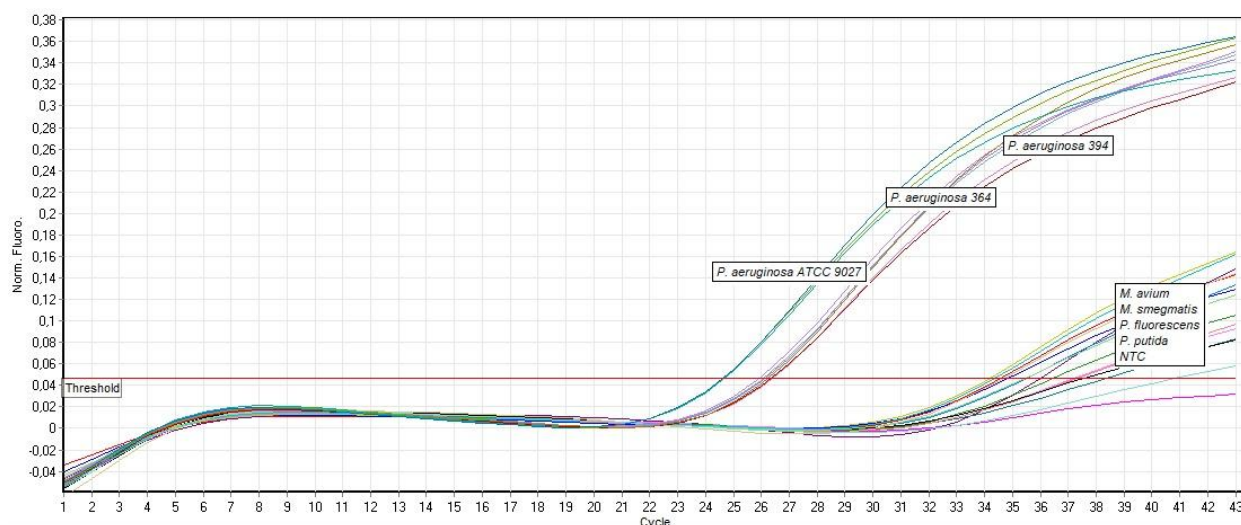


Figura 2. Curvas de amplificación de qPCR *singleplex* *P. aeruginosa*. ADN 0,005 μ g/mL. Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación.

Como se observa en la figura 2, la amplificación específica fue exclusivamente para *Pseudomonas*, tanto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 como para los aislamientos provenientes de la UAA. El análisis de varianza (ANOVA) con comparación *LSD* de Fisher de los valores de *C_q* para los aislamientos *P. aeruginosa* 364, 394, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. fluorescens* y *P. putida* mostró que los valores de *C_q* para las tres *P. aeruginosa* fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) a aquellos de *P. fluorescens* y *P. putida*.

Cuando la concentración de ADN fue incrementada al doble (0,005 μ g/mL), el valor promedio de *C_q* disminuyó a 26,19 (Fig. 2), una disminución concordante con una detección más temprana del ADN. El análisis ANOVA de estos resultados y la posterior comparación por *LSD* indicaron que las medias de los *C_q* para cada concentración fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). Es decir que la detección de ADN ocurre a ciclos significativamente más tempranos cuando el mismo se encuentra en una concentración de 0,005 μ g/mL respecto a una concentración de 0,0025 μ g/mL.

Por otro lado, para el caso de la detección de *M. avium*, empleando la sonda FAM, y los cebadores Mycav-F y Mycav-R en una concentración de 10 μ M, la *singleplex* qPCR mostró la especificidad de los cebadores y sonda con la secuencia objetivo. En este caso no fueron obtenidos valores de *C_q* para los controles negativos, y la amplificación fue exclusivamente del ADN de *M. avium* (Fig. 3).

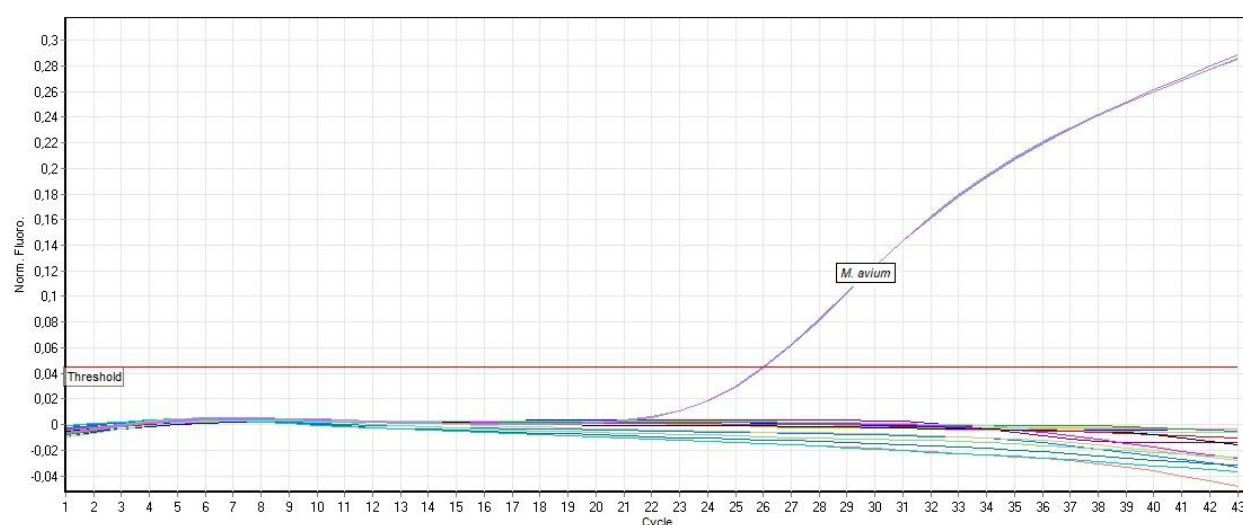


Figura 3. Curvas de amplificación de qPCR *singleplex M. avium*. ADN 0,005 µg/mL. Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación.

Con la concentración mínima de ADN, la detección de *M. avium* se dio con un valor promedio de *C_q* de 26,95, mientras que con una concentración de 0,005 µg/mL, este valor disminuyó a 26,03.

Para evaluar la significancia estadística de la disminución de los *C_q* al emplear la concentración superior de ADN, fue realizado el mismo análisis mencionado para los *C_q* de detección del ADN de *P. aeruginosa*. Este indicó que la diferencia entre las medias de los valores de *C_q* en la detección de ADN para las concentraciones 0,0025 µg/mL y 0,005 µg/mL es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), mostrando así el mismo comportamiento que la detección de *P. aeruginosa* a una mayor concentración de ADN.

Estos resultados indican que la técnica presenta la capacidad de detectar la concentración mínima de ADN testeada, lo que es de gran relevancia. Ello es debido a que como fue mencionado previamente, el tipo de microorganismos que se busca detectar se presentan en muy bajas concentraciones en el agua para consumo (Huang et al., 2021). Debido a que el desempeño de los experimentos fue superior a una concentración de ADN de 0,005 µg/mL, y en virtud de que la concentración de ADN no fuera un factor limitante en la optimización, se decidió continuar los experimentos empleando dicha concentración.

En su totalidad, estos resultados también validan los procedimientos *upstream* de extracción de ADN para cada microorganismo empleado y la calidad del mismo, así como el análisis *in silico* de la especificidad entre los oligonucleótidos utilizados y las secuencias a las que están dirigidos.

4.1.3.2 Multiplex qPCR *P. aeruginosa* y *M. avium* 10 μ M 0,005 μ g/mL

Para este ensayo fueron empleados todos los cebadores y sondas en una concentración de 10 μ M, con una concentración de ADN de 0,005 μ g/mL. Esta configuración tiene base en la observación de que a estas concentraciones la detección en *singleplex* se vio mejorada, y por ello fue el punto de partida para la aproximación a la optimización de la *multiplex*. Los controles positivos fueron *M. avium* y *P. aeruginosa*, mientras que los controles negativos fueron *P. putida* y *M. smegmatis*. Las curvas de amplificación obtenidas para el canal de detección de fluorescencia correspondiente a la sonda HEX (detección de *P. aeruginosa*) se muestran a continuación (figura 4, ilustrativa de este experimento).

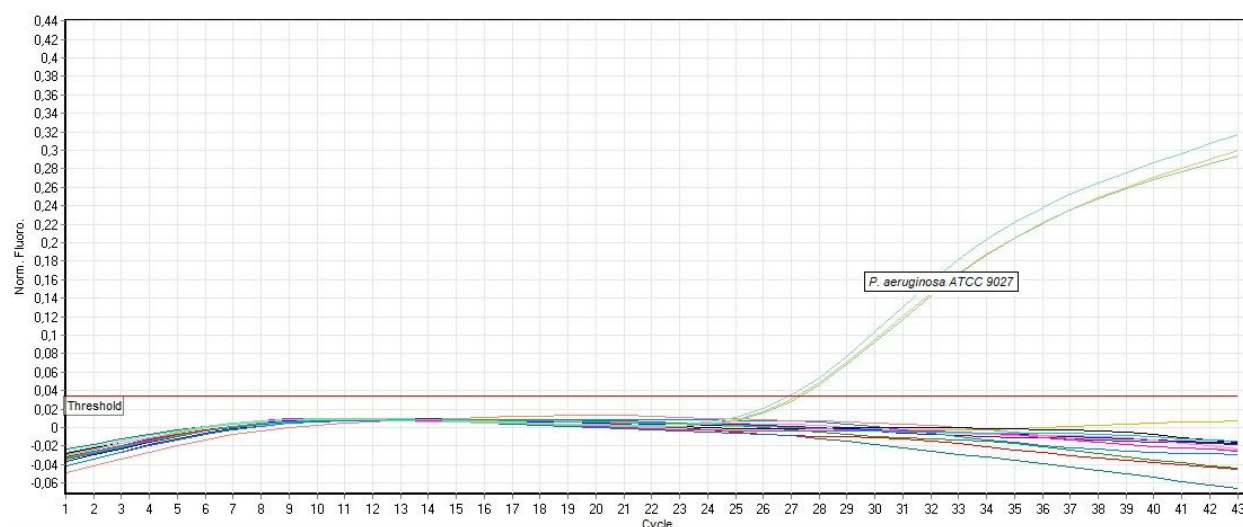


Figura 4. Curvas de amplificación de qPCR *multiplex*.

Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación. Canal de detección amarillo (HEX-*P.aeruginosa*).

Las curvas de amplificación obtenidas en el canal correspondiente a la detección de la sonda HEX, mostraron que la detección fue exclusivamente de *P. aeruginosa* ATCC 9027. El valor de *Cq* promedio de las réplicas del ADN de *P. aeruginosa* fue de 26,73.

Como fue mencionado previamente, los valores de *Cq* obtenidos de los ensayos *multiplex* y *singleplex* para la detección del ADN de *P. aeruginosa* a la misma concentración de ADN (0,005 μ g/mL) fueron 26,73 y 26,19 respectivamente, que por análisis de varianza no resultaron significativamente diferentes ($p > 0,05$). En un ensayo de tipo *duplex*, puede existir competencia por los reactivos comunes (dNTPs y Taq polimerasa) entre los dos *targets*, y esto puede tener un efecto negativo en la detección, así como las posibles interacciones de inhibición que puedan ocurrir entre los distintos cebadores y sondas (Applied Biosystems, 2010). El retraso de 0,54 *Cq* en la detección podría deberse entonces a la competencia de reactivos comunes que tiene lugar en el contexto de *multiplex*.

La figura 5 muestra las curvas de amplificación obtenidas en este experimento para el canal de detección de fluorescencia correspondiente a la sonda FAM.

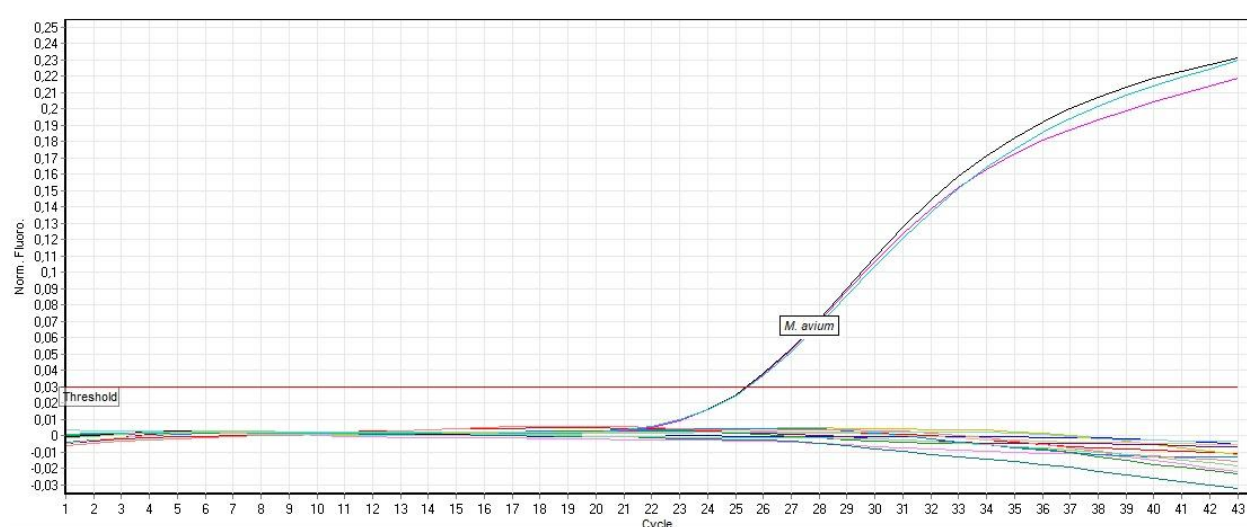


Figura 5. Curvas de amplificación de qPCR *multiplex*.

Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación. Canal de detección verde (FAM-*M. avium*).

Respecto a la detección del ADN de *M. avium* en *multiplex* y en *singleplex*, los valores promedio de *C_q* fueron 25,07 y 26,03 respectivamente. Los resultados del análisis ANOVA y la comparación LSD indicaron que esta diferencia no es significativa ($p > 0,05$).

Para ambos canales de detección de fluorescencia, en este ensayo de *multiplex* qPCR (oligonucleótidos a 10 μ M y ADN a 0,005 μ g/mL), las réplicas correspondientes a los controles *P. putida* y *M. smegmatis* no arrojaron valores de *C_q*, lo que es esperable para los controles negativos.

4.1.4 Experimentos de qPCR del diseño factorial

El diseño factorial fue realizado con el objetivo de apreciar el efecto que los oligonucleótidos empleados tienen en la *multiplex* qPCR, ya que éstos son fundamentales en la capacidad de detección de la técnica y su desempeño en general (Bustin et al., 2017).

Mediante este diseño fue posible establecer las distintas combinaciones a testear de concentraciones de los cebadores y sondas de *P. aeruginosa* y *M. avium*, y así encontrar aquellas que minimicen los valores de *C_q* del *pool* de ADN asociados a su detección por *multiplex* qPCR.

Para lograr este objetivo, fueron analizados los efectos de los factores involucrados en la reacción, así como sus posibles interacciones. Como concentración mínima para la evaluación de los factores (y límite inferior del diseño factorial), fue establecida 5 μ M, ya que es la mínima concentración de cebadores y sondas aceptable por la *supermix* empleada en estos experimentos. El punto central del diseño fue la concentración de 10 μ M (concentración ensayada previamente), y por lo tanto el límite superior fue establecido en 15 μ M. Las

respuestas evaluadas corresponden a los valores de *Cq* para *M. avium* y *P. aeruginosa* en *pool* de ADN.

En la Tabla 12 pueden observarse los valores de *Cq pool* obtenidos por qPCR *multiplex* para cada una de las respuestas en las distintas concentraciones de los factores A (sonda HEX y cebadores de *P. aeruginosa*), y B (sonda FAM y cebadores de *M. avium*) de acuerdo al diseño factorial.

Tabla 12. Diseño factorial para los factores A y B y promedio de las respuestas asociadas a cada condición experimental

Factor A (μM)	Factor B (μM)	Promedio Cq R1	Promedio Cq R2
5	5	22,52	26,12
5	15	22,43	26,5
15	5	23,03	27,03
15	15	23,51	25,63

Factor A: Sonda HEX y cebadores de *P. aeruginosa*.

Factor B: Sonda FAM y cebadores de *M. avium*.

R1: Valores de *Cq* del *pool* obtenidos en qPCR para la detección del ADN de *P. aeruginosa*.

R2: Valores de *Cq* del *pool* obtenidos en qPCR para la detección del ADN de *M. avium*.

Los resultados para ambas respuestas fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA). El efecto de un factor fue considerado como estadísticamente significativo si su valor *p* asociado fue inferior a 0,05.

Para la respuesta 1 (valores de *Cq pool* para *P. aeruginosa*), el resultado de este análisis puede observarse en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultado del análisis de varianza. Efecto de los factores A y B en los valores de *Cq pool* de *P. aeruginosa*.

Fuente de variación	SC	gl	MC	F-valor	p-valor
Modelo	2,24	3	0,7458	51,17	< 0,0001
A-HEX/Cebadores <i>P. aeruginosa</i>	1,89	1	1,89	129,55	< 0,0001
B-FAM/Cebadores <i>M. avium</i>	0,1083	1	0,1083	7,43	0,026
AB	0,2408	1	0,2408	16,52	0,0036
Pure Error	0,1166	8	0,0146		
Total	2,35	11			

SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad, MC: media cuadrática.

Respecto a los factores involucrados en esta respuesta, el análisis determinó que tanto la concentración de cebadores y sonda de *M. avium* y *P. aeruginosa*, así como la interacción entre ellos, tienen un efecto significativo ($p < 0,05$) en los valores de *Cq pool* para *P. aeruginosa*. Este

resultado implica entonces que los cebadores y la sonda empleados para la amplificación del ADN de esta bacteria son determinantes en su detección.

Adicionalmente, el efecto significativo de los factores y su interacción fue positivo, como puede observarse en la figura 6. Este tipo de representación gráfica es de gran utilidad ya que permite visualizar qué factor o factores e interacción entre estos tienen influencia significativa para el acercamiento a una optimización (Jiju, A., 2014).

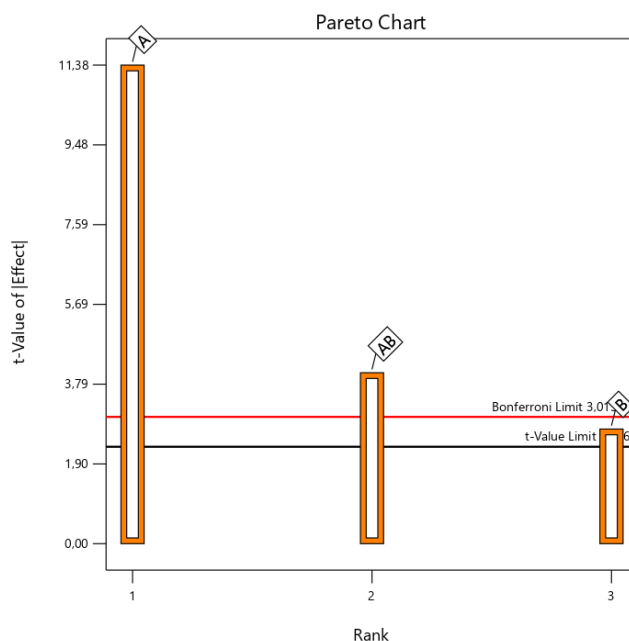


Figura 6. Gráfico de Pareto para la respuesta 1. Eje y: valor absoluto de los efectos de cada factor. Eje x: Factores en orden de significancia. **A:** Sonda HEX y cebadores para *P. aeruginosa*. **B:** Sonda FAM y cebadores de *M. avium*. **AB:** Interacción de los factores A y B. Los efectos positivos se observan en anaranjado.

El gráfico de Pareto ilustra que el efecto correspondiente al factor A, y la interacción de factores (AB) superaron el Límite de Bonferroni y el Valor Límite t, por lo que éstos tienen una influencia significativa más importante en la respuesta que el factor B (valores de *Cq pool* para *M. avium*). Es decir que cuando las concentraciones de sonda y cebadores de *P. aeruginosa* son incrementadas, esto no redundará en una detección más temprana, sino que la respuesta 1 se ve incrementada, lo que se traduce en valores superiores de *Cq*.

Por otro lado, se observa que el factor B (concentración de los cebadores y sonda de *M. avium*) tiene un efecto positivo sobre la detección del ADN de *P. aeruginosa* en el *pool*, que podría deberse al consumo de dNTPs que realiza el sistema *avium*. Contemplando estos resultados en su totalidad, los mismos indican que un aumento en las concentraciones del factor A es más perjudicial para la respuesta 1 que el aumento de aquellas del factor B.

La expresión matemática del modelo propuesto para describir los valores de C_q de *P. aeruginosa* en *pool* (R1) en el rango evaluado se presenta a continuación:

$$R1 = 22,4566 + 0,0226A + 0,0376B + 0,0056AB$$

La capacidad predictiva para el modelado de la respuesta 1 se vio respaldada por dos resultados. Dicho modelo tuvo un p-valor menor a $< 0,0001$, y el valor de R^2 asociado al mismo fue de 0,9505, por lo que es capaz de explicar un 95% de la variabilidad en los valores de C_q *pool* para *P. aeruginosa*, y es útil para predecir los valores de la respuesta cuando varían las concentraciones de cada factor.

Utilizando el modelo propuesto, fue posible predecir qué C_q *pool* para *P. aeruginosa* serían obtenidos empleando distintas concentraciones de los factores A y B en el rango evaluado.

El gráfico que representa la interacción entre el factor A (concentración de los cebadores y sonda de *P. aeruginosa*) y el factor B (concentración de los cebadores y sonda de *M. avium*), puede observarse en la figura 7.

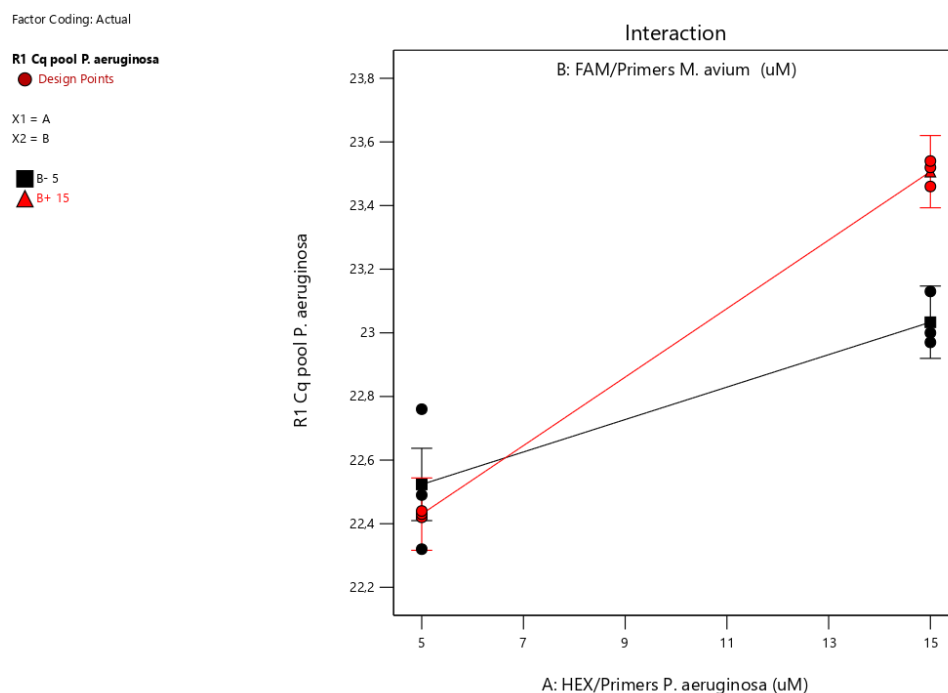


Figura 7. Interacción entre las concentraciones de los cebadores y sonda de *P. aeruginosa* y *M. avium* (eje x) en los valores de C_q *pool* para *P. aeruginosa* (eje y).

En la figura 7 es posible apreciar cómo varían los valores de C_q *pool* para *P. aeruginosa* (R1, eje y), en función de las distintas concentraciones que puede tomar el factor A (concentración

de los cebadores y sonda de *P. aeruginosa*, eje x), cuando el factor B toma los valores 5 µM y 15 µM.

El análisis de la interacción entre los factores sugirió que cuando la concentración para el factor A es 5 µM, se obtienen los menores valores de *Cq* para *P. aeruginosa*, independientemente de la concentración del factor B. Por lo que puede concluirse que cuando el factor A es 5 µM, no se ven casi diferencias en los valores de *Cq pool P. aeruginosa* al variar el factor B. Además, el mínimo valor de *Cq* se obtuvo cuando ambos factores fueron 5 µM, por lo que este valor para ambos factores fue el candidato de concentración de los factores a ser considerado, siendo la mínima concentración ensayada, lo que implicaría un menor consumo de reactivos.

Los resultados del análisis ANOVA para la respuesta 2 (valores de *Cq* en el *pool* de *M. avium*) pueden observarse en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultado del análisis de varianza para la respuesta 2. Efecto de los factores A y B en los valores de *Cq pool* de *M. avium*.

Fuente de variación	SC	gl	MC	F-valor	p-valor
Model	3,14	3	1,05	5,86	0,0204
A-HEX/Cebadores <i>P. aeruginosa</i>	0,001	1	0,001	0,0056	0,942
B-FAM/Cebadores <i>M. avium</i>	0,7752	1	0,7752	4,33	0,071
AB	2,37	1	2,37	13,23	0,0066
Pure Error	1,43	8	0,179		
Cor Total	4,58	11			

SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad, MC: media cuadrática.

La expresión matemática correspondiente al modelo obtenido para *M. avium* fue la siguiente:

$$R2 = 25,0325 + 0,1795A + 0,1268B - 0,0177AB$$

El mencionado modelo resultó significativo según el análisis ANOVA, con un p-valor de 0,0204. El R^2 asociado al modelo fue de 0,6871, por lo que pese a que el mismo tuvo un $p < 0,05$, un valor de R^2 tan bajo fue un indicador de que el modelo no tiene una buena capacidad predictiva de la respuesta en cuestión (valores de *Cq* en el *pool* de *M. avium*).

La interacción de los factores (AB) resultó significativa para $R2$, mientras que el factor B (concentración de los cebadores y sonda de *M. avium*) resultó no significativo, con un p valor de 0,071. Es decir, que la detección del ADN de *M. avium* en un *pool* de ADN estaría sujeta a variabilidad en una mayor medida por la interacción de los reactivos (factores A y B), que por los propios cebadores y sonda dirigidos a la detección.

Por otro lado, el gráfico de Pareto obtenido (Fig. 8) en el que se ilustra la magnitud del efecto que cada factor tiene sobre los valores de C_q en el *pool* de *M. avium*, fue coherente con los resultados del análisis ANOVA. En el gráfico puede observarse que el efecto de la interacción entre factores es de carácter negativo, y es la única que tiene significancia en los valores de C_q en el *pool* de *M. avium* (este efecto resultó por encima del límite de Bonferroni y el Valor Límite t).

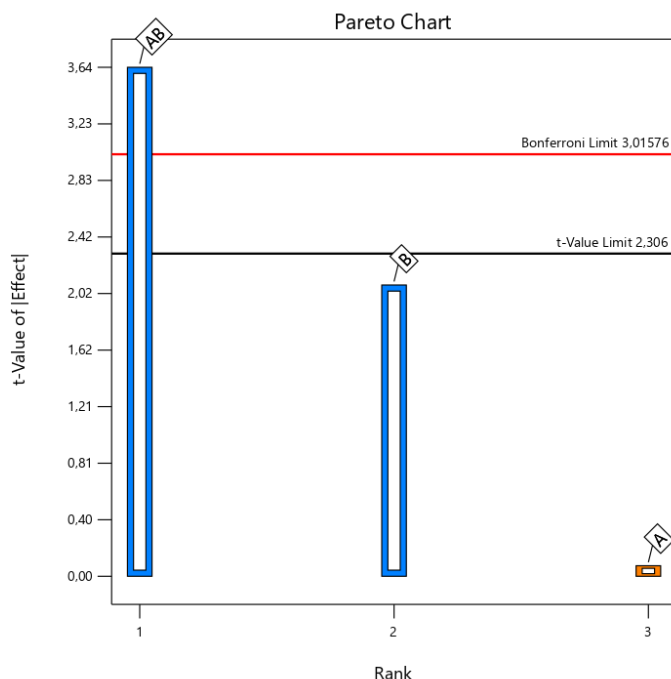


Figura 8. Gráfico de Pareto para la respuesta 2. Eje y: valor absoluto de los efectos de cada factor. Eje x: Factores en orden de significancia. **A:** Sonda HEX y cebadores para *P. aeruginosa*. **B:** Sonda FAM y cebadores de *M. avium*. **AB:** Interacción de los factores A y B. El efecto positivo se observa en anaranjado. Los efectos negativos se observan en azul.

El efecto del factor B no superó los límites mencionados, pero también fue propuesto como un factor con efecto negativo en la respuesta, por lo que un aumento en la concentración de los cebadores y/o sonda tendrían como resultado menores C_q .

El efecto del factor A (concentración de los cebadores y sonda de *P. aeruginosa*) fue de tipo positivo, aunque el mismo no es significativo de acuerdo a los resultados del análisis ANOVA, y presenta un efecto menor que el efecto positivo que ejerce factor B en la respuesta 1.

Los resultados del análisis de la interacción entre factores sobre la respuesta 2 pueden observarse en la figura 9. En la misma es posible observar cómo varían los valores de C_q *pool* para *M. avium* (R2, eje y), en función de las distintas concentraciones del factor B (concentración de los cebadores y sonda de *M. avium*, eje x), cuando el factor A toma los valores 5 μ M y 15 μ M.

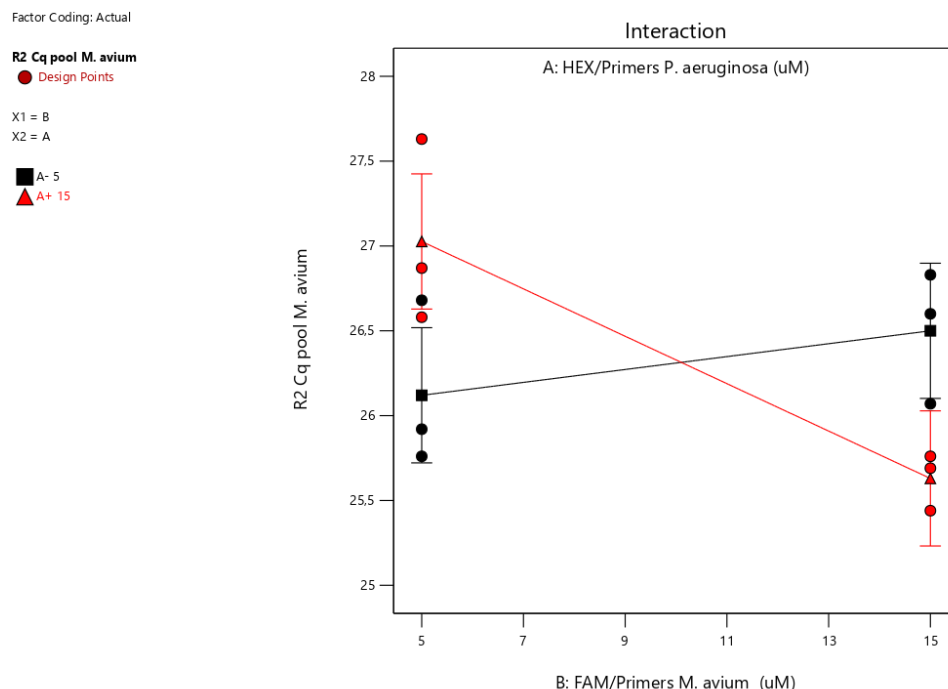


Figura 9. Interacción entre las concentraciones de los cebadores y sonda de *P. aeruginosa* y *M. avium* (eje x) en los valores de *Cq pool* para *M. avium* (eje y).

Cuando los factores A y B fueron 15 μM y 5 μM respectivamente, los valores de *Cq pool* para *M. avium* fueron máximos, por lo que esta combinación no es favorable para esta respuesta. Sin embargo, cuando ambos factores tuvieron un valor de 15 μM , la respuesta analizada fue mínima (óptimo de la respuesta 2, valores de *Cq pool* para *M. avium*). Cuando esta configuración de factores fue trasladada a la respuesta 1 (valores de *Cq pool* para *P. aeruginosa*), se observó que dicha respuesta fue máxima, por lo que no sería una buena candidata.

Para evaluar las condiciones que produjeran valores mínimos de *Cq* para cada respuesta de manera independiente, fueron empleados los modelos propuestos para cada una de ellas. Así, cuando el valor de ambos factores fue 15 μM , la respuesta 1 fue de 24,61 *Cq*, y la respuesta 2 fue 25,64 *Cq*. Por otro lado, cuando el valor de ambos factores fue 5 μM , la respuesta 1 fue de 22,89 *Cq*, y la respuesta 2 fue 26,12 *Cq*.

Es decir que cuando ambos factores fueron 15 μM (óptimo para R2), los valores de *Cq* en *pool* para *P. aeruginosa* aumentaron 1,72 *Cq*, y cuando ambos factores fueron 5 μM (óptimo para R1), los valores de *Cq* en *pool* para *M. avium* aumentaron 0,48 *Cq*. En conjunto, estos resultados fueron indicativos de que globalmente, ambas respuestas son mínimas cuando los factores A y B se fijan en 5 μM .

Por otro lado, con los valores de *Cq* obtenidos para cada respuesta, fue realizada una optimización numérica para cada una de ellas, con el objetivo de encontrar la combinación de factores que las minimizaran. Para la aproximación a una optimización, el diseño fue

configurado para que el *software* considerara los factores en el rango evaluado (5 μ M - 15 μ M). Este análisis determinó que las respuestas son mínimas si ambos factores son fijados en 5 μ M, con una deseabilidad asociada de 0,758 (idealmente, este valor debe ser lo más cercano posible a 1). Esta optimización numérica seleccionó entonces la misma concentración de los factores que aquellos resultantes del análisis descriptivo realizado previamente.

De acuerdo a los análisis realizados anteriormente, fue determinado que el experimento de *multiplex* qPCR a emplear para la detección de *P. aeruginosa* y *M. avium* en las muestras de agua, fuera realizado en condiciones de 5 μ M para los cebadores y sonda de ambos microorganismos.

La aproximación a la optimización propuesta por el diseño factorial permitió llegar a una configuración experimental en la que ambos *targets* pueden ser detectados y amplificados en simultáneo. Sin embargo, es evidente que existe un margen de mejora, ya que la deseabilidad de la optimización numérica fue 0,758. Estas mejoras podrían incluir el contemplar variables adicionales, o independizar los cebadores de las sondas como factores independientes en el diseño, y la posterior evaluación de las respuestas frente a estas modificaciones.

Debido a que en estas condiciones la detección simultánea fue eficaz, se eligió continuar con esta configuración de reactivos para el análisis molecular de las muestras de agua.

4.1.5 Estudio de la linealidad de *multiplex* qPCR

Los ensayos de qPCR de tipo de cuantificación “absoluta” o con curva de calibración son empleados para determinar el número de moléculas de un ADN o ARN de interés en una muestra problema (Aguilera et al., 2013). Para realizar dicha cuantificación, es necesario contar con un estándar de concentración conocida de estas moléculas, y realizar diluciones a partir de él con la finalidad de contemplar un espectro de concentraciones donde las muestras puedan encontrarse. De esta forma, cuando las diluciones del estándar son sometidas a qPCR, sus valores de *C_q* asociados pueden ser relacionados gráficamente con el logaritmo de la concentración conocida de ese estándar mediante una curva. La ecuación que describe dicha curva permite interpolar los valores de *C_q* de las muestras problema, y obtener su concentración (siempre que las mismas se encuentren dentro del rango de concentraciones de las diluciones del estándar donde se verifica una relación lineal entre los valores de *C_q* y la concentración del mismo).

La PCR convencional realizada para la amplificación de los estándares de ADN de *P. aeruginosa* y *M. avium* fue evaluada mediante la visualización del gel de agarosa al 2% (ver figura 10) bajo luz ultravioleta. En el mismo pudo observarse la presencia de bandas correspondientes al producto de amplificación del fragmento del gen *regA* de *P. aeruginosa* con un peso molecular de 80 pb, así como el producto de amplificación del fragmento del gen *ARNr 16S* de *M. avium* con un peso molecular de 127 pb. Estos resultados indican que la amplificación fue exitosa (y un indicio de la eficacia de los cebadores), y por lo tanto fue posible seguir adelante con la purificación de bandas para la obtención del ADN contenido en ellas.

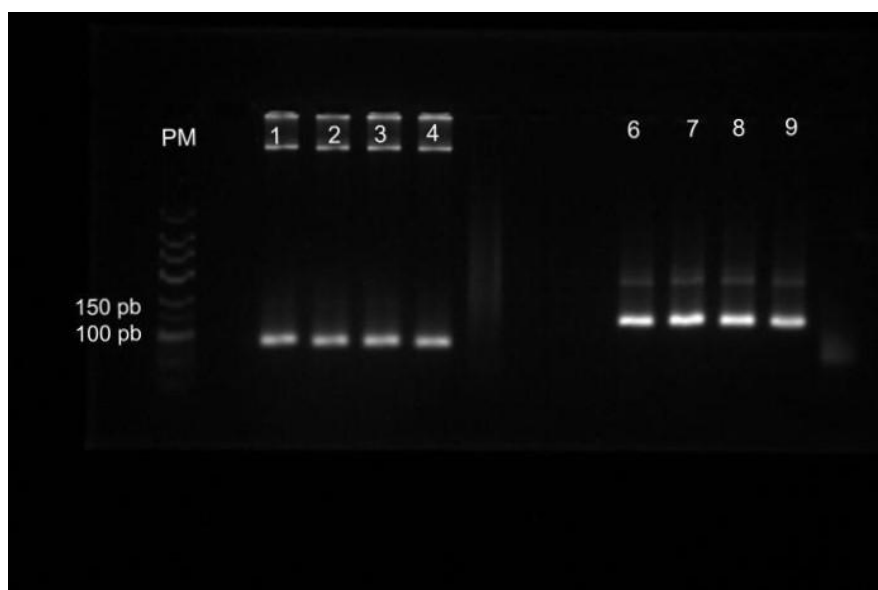


Figura 10. Gel de agarosa al 2%. Carriles 1-4 producto de PCR fragmento de *regA* de *P. aeruginosa*. Carriles 6-9 producto de PCR fragmento de *ARNr 16S* de *M. avium*.

Para las condiciones que fueron seleccionadas en este trabajo para la qPCR *multiplex*, se estudió la linealidad de *P. aeruginosa* y *M. avium* empleando diluciones seriadas de concentración conocida del ADN de cada microorganismo. Para estudiar la linealidad de la técnica optimizada, los estándares fueron sometidos a su amplificación en *multiplex* qPCR por separado, y en *pool*, de forma de evaluar si la misma puede ser empleada para la cuantificación de los microorganismos de interés. En todos los casos, la técnica fue llevada a cabo en las condiciones elegidas previamente (todos los cebadores y ambas sondas en una concentración de 5 μ M).

4.1.5.1 Linealidad *P. aeruginosa*

La cuantificación del ADN estándar de *P. aeruginosa* correspondiente al fragmento *regA* (purificado a partir de bandas de PCR convencional) fue de 13,3 ng/ μ L. El cálculo del número de copias de dicho fragmento fue realizado como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ copias fragmento } regA &= (13,3 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 6,023 \times 10^{14} \text{ Da/ng}) / (80 \text{ pb} \times 660 \text{ Da}) \\ &= 1,52 \times 10^{11} \text{ copias}/\mu\text{L de ADN estándar} \end{aligned}$$

La evaluación de linealidad de la *multiplex* qPCR en la amplificación del estándar de *P. aeruginosa* fue realizada empleando 6 diluciones del estándar ($1,52 \times 10^9$ - $1,52 \times 10^3$). Las diluciones mayores a 10^3 (10^2 - 10^0) no fueron consideradas debido a que no alcanzaron una repetibilidad mayor o igual a 95% o no hubo amplificación.

La eficiencia de este ensayo fue de 99% con un R^2 de 0,99767. La curva de calibración obtenida puede observarse en la figura 11.

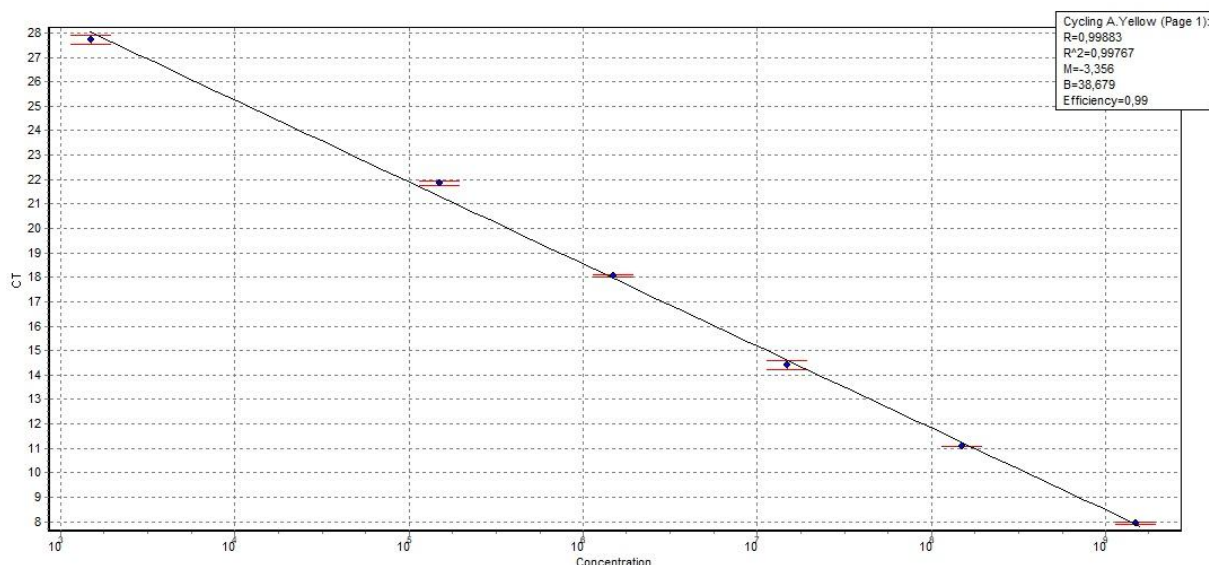


Figura 11. Curva de calibración para diluciones seriadas de ADN estándar de *P. aeruginosa* ($1,52 \times 10^9$ - $1,52 \times 10^3$ copias/μL). Eje y: Cq. Eje x: Concentración (n° copias/μL)

La ecuación asociada a la curva de calibración fue la siguiente:

$$Cq = -3,356 * \text{Log} (\text{concentración}) + 38,679$$

Utilizando dicha ecuación fueron calculados los números de copias//μL asociados a cada dilución del estándar así como a los correspondientes controles del experimento.

Tabla 15. Cálculo del número de copias² del estándar de *P. aeruginosa*.

Estándar	Cq promedio	N° copias/μL promedio	Coefficiente de variación
1,52x10 ⁹	7,91	1.486.770.358,95	7,95
1,52x10 ⁸	11,09	167.408.809,31	0,00
1,52x10 ⁷	14,40	17.553.625,86	24,12
1,52x10 ⁶	18,04	1.422.691,36	4,12
1,52x10 ⁵	21,84	104.870,77	8,52
1,52x10 ³	27,70	1.903,44	19,90

Debido a la obtención de valores de *Cq* para los *NTC* en el canal de detección de *P. aeruginosa* (HEX), el *LOD* fue establecido como el promedio de estos valores (31,52) menos 3,3 ciclos, resultando en un *LOD* = 28,22 *Cq*, en el entorno de la dilución 10³ del estándar.

Como se observa en la Tabla 15, la dilución mayor del estándar con un coeficiente de variación asociado inferior al 25% fue aquella correspondiente a la dilución 1,52x10³, con un valor de *Cq* promedio de 27,70, que es igual al *LOQ* (Kralik, P., & Ricchi, M., 2017).

En el canal de detección de HEX (*P. aeruginosa*), la detección observada fue aquella correspondiente al control positivo (*P. aeruginosa* ATCC 9027).

Cuando fue evaluado el canal de detección verde (para evaluar detección de ADN por la sonda FAM), se observaron las curvas de qPCR correspondientes a la detección de *M. avium*. Este resultado sugiere que no existió interacción inespecífica entre la sonda FAM y el ADN de *P. aeruginosa*.

4.1.5.2 Linealidad *M. avium*

La cuantificación del ADN estándar de *M. avium* (purificado a partir de bandas de PCR convencional) correspondiente al fragmento del gen *ARNr 16S* fue de 24,3 ng/μL. El cálculo del número de copias de dicho fragmento fue realizado como se muestra a continuación:

² En todos los casos, el valor de *Cq* y el número de copias calculado corresponden al promedio de tres réplicas. El coeficiente de variación corresponde al porcentaje calculado.

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ copias fragmento } ARNr \text{ 16S} &= (24,3 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 6,023 \times 10^{14} \text{ Da/ng}) / (127 \text{ pb} \times 660 \text{ Da}) \\ &= 1,75 \times 10^{11} \text{ copias}/\mu\text{L} \text{ de ADN estándar} \end{aligned}$$

La evaluación de linealidad de la *multiplex* qPCR en la amplificación del estándar de *M. avium* fue realizada empleando 7 diluciones del estándar ($1,75 \times 10^{10}$ - $1,75 \times 10^4$). Las diluciones mayores a 10^4 (10^3 - 10^0) no fueron consideradas debido a que no alcanzaron una repetibilidad mayor o igual a 95% o no hubo amplificación. La eficiencia de este ensayo fue de 90%, con un R^2 de 0,99768. La curva de calibración obtenida puede observarse en la figura 12.

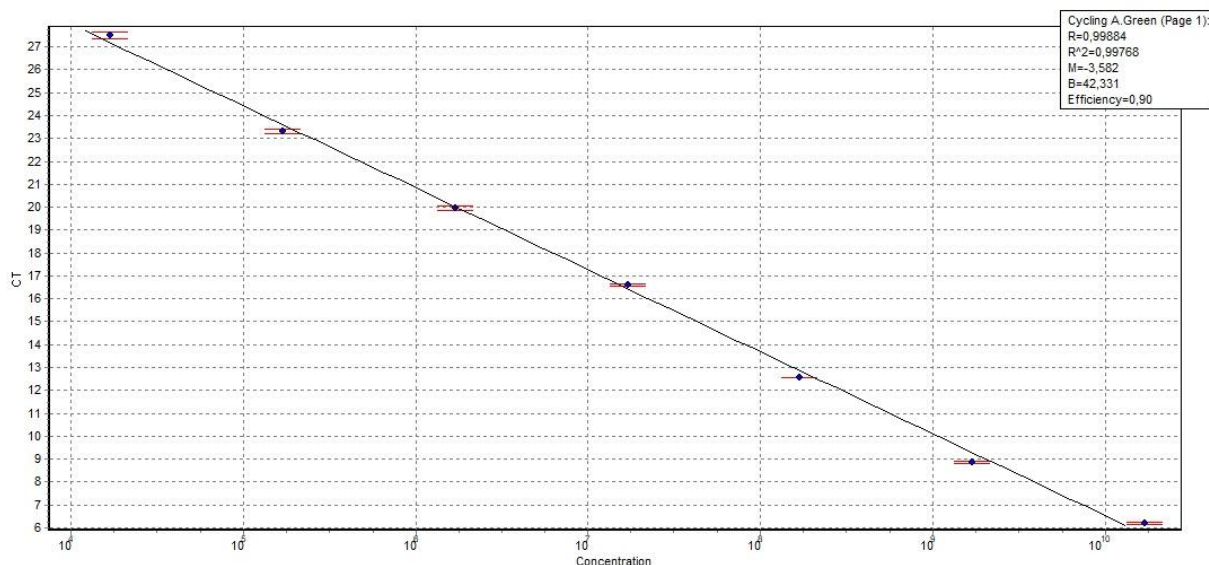


Figura 12. Curva de calibración. Diluciones seriadas de ADN estándar de *M. avium* ($1,75 \times 10^{10}$ - $1,75 \times 10^4$ copias/ μL). Eje y: C_q . Eje x: Concentración (n° copias/ μL)

La ecuación asociada a esta curva de calibración, y en la cual pueden interpolarse los valores de C_q para realizar la cuantificación fue la siguiente:

$$C_q = -3,582 * \text{Log}(\text{concentración}) + 42,331$$

Los valores de C_q obtenidos en este ensayo y el número de copias calculado a partir de los mismos se observan en la Tabla 16.

Tabla 16. Cálculo del número de copias del estándar de *M. avium*

Estándar	Cq promedio	N° copias/μL promedio	Coefficiente de variación
1,75x10 ¹⁰	6,2	12.231.757.431,69	6,80
1,75x10 ⁹	8,84	2.239.640.164,52	5,04
1,75x10 ⁸	12,58	202.193.518,83	2,24
1,75x10 ⁷	16,61	15.175.072,05	5,94
1,75x10 ⁶	19,98	1.745.522,22	9,08
1,75x10 ⁵	23,32	203.743,47	10,71
1,75x10 ⁴	27,51	13.855,54	16,99

En este caso, el *LOD* fue de 31,38, mientras que el *LOQ* fue de 27,51.

Cuando fue examinado el canal de detección amarillo, en el que teóricamente sólo debiera haber amplificación para las réplicas correspondientes al control positivo de *P. aeruginosa*, se verificó que a concentraciones altas del estándar de *M. avium* (1,75x10¹⁰ - 1,75x10⁸) hubo detección de fluorescencia emitida por la sonda HEX, por lo que se puede inferir que si *M. avium* se encontrara presente en altas concentraciones, tendría lugar una sobreestimación de la presencia de *P. aeruginosa*.

Estos resultados podrían estar reflejando una interacción inespecífica (que no se observó *in silico*) entre la sonda HEX destinada a la detección del ADN de *P. aeruginosa* en presencia de altas concentraciones de ADN no *target*.

4.1.5.3 Evaluación de la linealidad del *pool* de ADN

El ensayo de qPCR para el estudio de la linealidad de la técnica con los estándares en *pool* se realizó a partir de diluciones seriadas de un patrón concentrado de $8,2 \times 10^{10}$ copias/ μL . Los controles positivos de este ensayo fueron *P. aeruginosa* y *M. avium* para sus respectivos canales de detección de fluorescencia. Cuando el *pool* fue evaluado en los experimentos de *multiplex* qPCR, pudo constatar que el ADN de cada microorganismo era detectado en su respectivo canal de detección. La utilidad de este experimento radica en evaluar si es posible además, establecer un rango lineal en el que el ADN de *M. avium* y *P. aeruginosa* puedan ser cuantificados si se encontraran de manera simultánea en una muestra de agua.

4.1.5.3.1 Linealidad del ADN de *P. aeruginosa* en *pool*

La evaluación de linealidad de la *multiplex* qPCR en la amplificación del *pool* fue realizada empleando 4 diluciones del estándar ($8,2 \times 10^5$ - $8,2 \times 10^3$). Las diluciones mayores a 10^3 (10^2 - 10^0) no fueron consideradas debido a que no alcanzaron una repetibilidad mayor o igual a 95% o no hubo amplificación. En cuanto a las diluciones menores (10^{10} - 10^6), las mismas tampoco fueron consideradas ya que sus valores de C_q fueron menores a los esperados, y con una diferencia menor a los 3,3 ciclos concordantes con diluciones 1:10. Este comportamiento denota una interacción a altas concentraciones de *M. avium*, que deriva en una sobreestimación de la cantidad de copias del gen *target* de *P. aeruginosa*.

El resultado de la evaluación del rango lineal para la cuantificación del ADN de este microorganismo en *pool* puede observarse en la figura 13. La curva de calibración indicó una eficiencia de 100% con un R^2 de 0,98122.

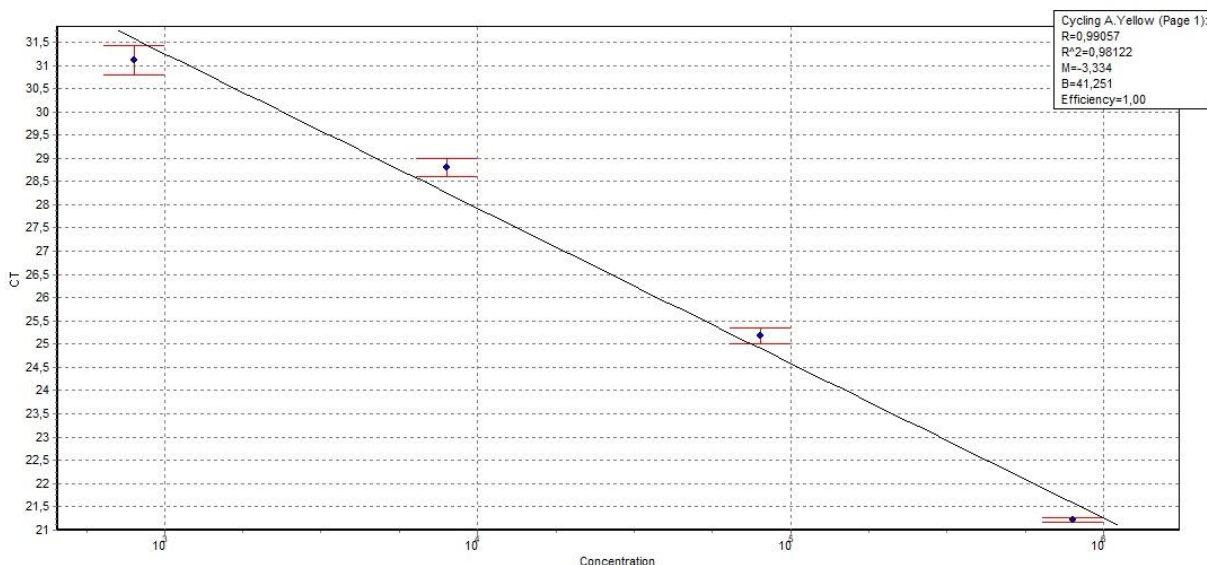


Figura 13. Curva de calibración. Diluciones seriadas del *pool* ADN estándar de *P. aeruginosa* ($8,2 \times 10^5$ - $8,2 \times 10^3$ copias/ μL). Eje y: C_q . Eje x: Concentración (n° copias/ μL)

La ecuación asociada a esta curva de calibración fue la siguiente:

$$Cq = -3,334 * \text{Log}(\text{concentración}) + 41,251$$

A partir de ella fue calculado el número de copias/μL presente en cada dilución del estándar como se muestra a continuación.

Tabla 17. Cálculo del número de copias del estándar de *P. aeruginosa* en pool

Estándar	Cq promedio	N° copias/μL promedio	Coefficiente de variación
8,2x10 ⁶	21,21	1.029.943,23	7,12
8,2x10 ⁵	25,18	67.234,83	21,37
8,2x10 ⁴	28,79	5.580,43	25,51
8,2x10 ³	31,11	1.146,53	32,80

De acuerdo a los resultados de la tabla 17, el límite de cuantificación fue establecido en un valor de Cq de 25,18, mientras que el LOD fue de 28,51.

Para poder realizar cuantificaciones precisas se ha recomendado que el rango dinámico contemple al menos 5 diluciones seriadas de concentraciones del estándar (Bustin et al., 2009). En este experimento se observó una relación lineal entre los valores de Cq y las concentraciones del estándar para tan sólo 4 diluciones, por lo que el rango de cuantificación fue muy acotado e insuficiente para realizar una cuantificación robusta del número de copias del ADN *target* presentes en una muestra con altas o bajas concentraciones del mismo.

4.1.5.3.2 Linealidad del ADN de *M. avium* en pool

En la figura a continuación puede observarse la curva de calibración obtenida para este experimento, que arrojó una eficiencia de 96% y un R^2 de 0,94765.

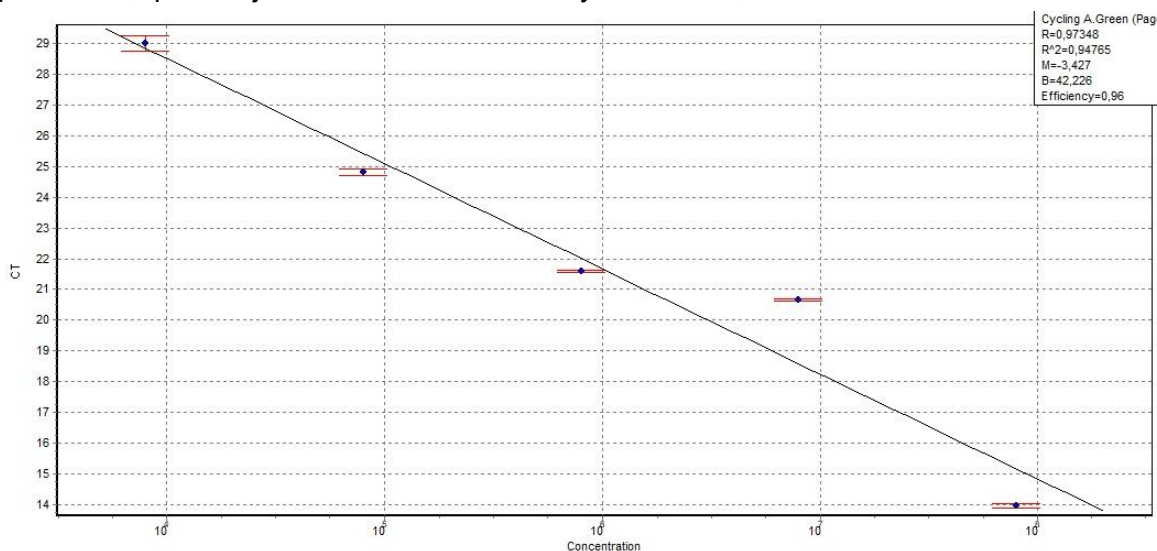


Figura 14. Curva de calibración. Diluciones seriadas del pool ADN estándar de *M. avium* ($8,17 \times 10^8$ - $8,17 \times 10^4$ copias/ μ L). Eje y: Cq. Eje x: Concentración (n° copias/ μ L)

En este caso, la ecuación obtenida fue la siguiente:

$$Cq = -3,427 * \text{Log}(\text{concentración}) + 42,226$$

Empleando dicha ecuación fue calculado el número de copias para cada estándar, como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 18. Cálculo del número de copias del estándar de *M. avium* en *pool*

Estándar	Cq promedio	N° copias/ μ L promedio	Coeficiente de variación
$8,2 \times 10^8$	13,95	179.250.678,70	10,41
$8,2 \times 10^7$	20,65	1.973.332,19	4,42
$8,2 \times 10^6$	21,58	1.060.773,05	3,08
$8,2 \times 10^5$	24,82	120.927,89	13,30
$8,2 \times 10^4$	29,00	7.424,99	25,13

Las diluciones seriadas del ADN de *M. avium* en *pool* no mostraron la diferencia esperada de 3,32 Cq aproximados entre diluciones, lo que le quita validez a la cuantificación que se pretenda hacer con la curva de calibración obtenida a partir de estos datos. Teniendo en cuenta además que en la detección del *pool* en estas condiciones (concentración de ADN 0,005 μ g/mL y 5 μ M de sondas y cebadores) no se obtienen curvas de qPCR, y que la especificidad entre la secuencia *target* y la sonda y cebadores fue verificada, es razonable afirmar que la técnica sí es capaz de la detección del ADN de *M. avium* en *pool*, pero no de su cuantificación.

A su vez, las curvas obtenidas en la amplificación del ADN de *M. avium* en *pool* presentaron un aspecto deformado, por oposición a aquellas obtenidas en la linealidad del ADN en exclusivo, lo que sugiere que no sería posible la cuantificación precisa del ADN de este microorganismo en un *pool*. Estos resultados indican claramente que existen interacciones a nivel molecular que resultan en una sobreestimación del ADN de *P. aeruginosa* cuando el mismo se encuentra en *pool*, lo que haría que esta *multiplex* pudiera emplearse para la detección de estos patógenos oportunistas y no para la cuantificación de los mismos.

4.2 Del análisis de las muestras de agua

4.2.1 Determinaciones fisicoquímicas

La norma 833:2008 establece los valores máximos permitidos y límites dentro de los cuales deben ubicarse las distintas determinaciones fisicoquímicas que se le realizan al agua para consumo.

Estas determinaciones son importantes para evaluar la eficacia de los tratamientos a los que el agua es sometida previo a su recorrido por los sistemas de distribución. Además, las mismas son realizadas de forma más ágil que las determinaciones microbiológicas, y sirven como indicadores de cambios en el agua que luego son analizados con la metodología correspondiente (Dufour et al., 2003).

El valor del pH del agua para consumo es un parámetro químico inorgánico fundamental que influye en otros aspectos del agua. Por ejemplo, un nivel de pH muy alto puede alterar el sabor del agua, y ser detrimental para la eficacia del tratamiento con cloro. Análogamente, niveles muy bajos de este parámetro facilitan la disolución de metales pesados en el agua, y pueden provocar la corrosión de materiales en contacto con la misma, afectando así sus propiedades organolépticas (Omer, 2019).

Por otro lado, el nivel de turbidez del agua tratada que ingresa al sistema de distribución es otro indicador del éxito de los distintos tratamientos de coagulación-floculación y posterior filtrado del agua. En este sentido, se ha demostrado que la presencia de partículas de materia orgánica, solutos inorgánicos y otros componentes en suspensión el agua, pueden presentar una correlación con la presencia de microorganismos en ella, ya que estas partículas sirven como refugio para la evasión de la actividad desinfectante (Huang et al., 2021), y pueden ser bacterias propiamente dichas.

La conductividad es otro de los parámetros que deben ser monitoreados según la norma de aguas de nuestro país. Este parámetro es de utilidad en el monitoreo de la calidad del agua ya que evidencia la presencia de minerales, así como sales disueltas y otros compuestos inorgánicos; y ha mostrado una correlación significativa con otros parámetros como el pH, la temperatura, la dureza del agua y el cloro, entre otros (Kumar & Sinha., 2010).

Cada muestra fue codificada a los efectos de hacer más fácil la identificación de su origen; agua de salida de un equipo (ES), agua de tanque (AT) o agua de red (AR), seguido de su ubicación. Los resultados de las determinaciones fisicoquímicas de las muestras pueden encontrarse en la tabla a continuación.

Tabla 19. Resultados de las determinaciones fisicoquímicas para todas las muestras

	Código	Determinaciones fisicoquímicas <i>in situ</i>				
		Temperatura (°C)	pH	Turbidez (NTU)	Cloro libre (mg/L)	Conductividad (μS/cm)
Salidas de agua	ESP1	20,0	7,25	0,29	0,01	360
	ESIQ	20,5	7,15	0,24	0,03	340
	ESPI	21,0	7,04	0,21	0,06	340
	ESSS	22,0	6,76	0,19	0,38	350
Entradas de agua	Atep1	21,0	7,11	0,39	0,02	350
	ATEIQ	21,0	7,08	0,39	0,02	340
	ATEPI	22,0	7,05	0,75	0,01	330
	ARSS	21,0	6,68	0,17	0,50	350
Valor máximo permitido según UNIT 833:2008		-	6,5 - 8,5	1,00	2,5	2000

ESP1: Equipo Salida Piso 1, ESIQ: Equipo Salida Instituto Química, ESPI: Equipo Salida salón Piedra, ESSS: Equipo Salida Subsuelo, ARSS: Agua Red Subsuelo, ATEP1: Agua Tanque Entrada Piso 1, ATEIQ: Agua Tanque Entrada Instituto Química, ATEPI: Agua Tanque Entrada salón Piedra

Como puede observarse en la Tabla 19, todas las muestras de agua analizadas cumplieron con los valores máximos permitidos establecidos por la norma UNIT 833:2008. Algunos investigadores han evidenciado que puede existir correlación entre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de evaluación de calidad del agua, como una correlación positiva entre la presencia de *Escherichia coli* y sólidos disueltos totales (Singh et al., 2019), entre microorganismos heterótrofos y la turbidez (El Mourabit et al., 2020), y una relación inversa entre la supervivencia bacteriana y cloro libre (Luo et al., 2018). Teniendo en cuenta únicamente los resultados de los parámetros fisicoquímicos, es posible discutir que ninguna de las muestras mostró indicios de eventos que sugirieran contaminación bacteriológica, al menos de manera evidente.

Cuando fueron consideradas las entradas de agua respecto a los parámetros fisicoquímicos, la muestra con el valor mínimo de pH y turbidez, y máximo de cloro libre fue aquella obtenida del agua de red de O.S.E. (ARSS). Estos resultados son indicativos de que el agua de red que llega desde el sistema de distribución lo hace en perfectas condiciones para su consumo en lo que a estos parámetros respecta. El nivel de pH y el cloro libre se relacionan en la medida que éste último es la combinación de ácido hipocloroso e ion hipoclorito (WHO, 2011), por lo que es esperable que estos parámetros sean opuestos en agua potable que ha sido tratada. Sin embargo, este resultado no fue representativo de todas las muestras de entrada de agua.

Para el caso de los resultados obtenidos de los valores de turbidez de las entradas de agua correspondiente a las muestras ATEPI, ATEP1, y ATEIQ (provenientes de tanque), los mismos fueron superiores que sus respectivas salidas y que el agua de red. Un nivel de turbidez superior para el agua de tanque respecto al agua de red puede deberse a distintos factores relacionados con el almacenamiento de la misma. Algunos investigadores (Fard et al., 2019; Slavik et al., 2020; Ziadat, 2013; Clark et al., 1996) han evidenciado la relación de la calidad del agua almacenada con su frecuencia de uso, el material con el que ha sido construido del

tanque, la formación de sedimento, así como la regularidad con la que sea limpiado, entre otros.

La frecuencia de uso del agua almacenada tiene efectos directos en la cantidad de cloro residual en el agua, en la medida que mayores tiempos de retención promueven la disminución del mismo, así como crecimiento bacteriano que, como fue mencionado previamente, también contribuye en este parámetro (Slavik et al., 2020). Por lo tanto, los resultados obtenidos son esperables para la turbidez de agua proveniente de tanques previo a su filtración.

Por otro lado, las salidas de agua tuvieron, en promedio, valores mayores de pH que las entradas. Según Fanner, et al., 1996, el carbón activado (elemento filtrante de los equipos purificadores) puede tener efectos en el nivel de pH del agua incrementándolo, en la medida que existe una interacción entre aniones y protones presentes en el agua y la superficie del carbón.

Respecto a la conductividad, todas las entradas y salidas de agua mostraron valores similares cumpliendo ampliamente con el requisito establecido por la normativa. Los resultados mostraron iguales valores entre entradas de agua (tanto de tanque como de red) y salidas de agua filtrada, por lo que parece ser un parámetro que no se vio afectado por el tipo de muestra.

4.2.2 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos son parámetros biológicos que, al igual que los parámetros fisicoquímicos, contribuyen a la evaluación de la calidad del agua para consumo; y como alerta temprana frente a la detección de cambios en ciertos parámetros indicadores (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017).

4.2.2.1 Detección de coliformes totales y *E. coli* en 100 mL de muestra

Los coliformes totales son aquellos bastones gram negativos no formadores de esporas, que pueden o no ser móviles, son aerobios o anaerobios facultativos, y fermentan lactosa con la producción de ácido y gas a 35 ± 2 °C dentro de 24 o 48 horas (Li & Liu, 2019). Estos microorganismos están presentes en el ambiente, y su detección es indicadora de la eficacia de los distintos tratamientos realizados al agua para su consumo (Dufour et al., 2003). Dentro de los coliformes totales se incluyen aquellos que también forman parte del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, los coliformes termotolerantes. La presencia de dichos microorganismos es indicativa de contaminación con este tipo de desechos (Omer, 2019).

E. coli es un microorganismo termotolerante liberado en heces, cuya presencia en agua es indicativa de una contaminación fecal reciente o de gran magnitud. Esto se debe a que esta bacteria, al igual que los coliformes totales, son susceptibles al efecto de la desinfección por cloro, y su presencia puede ser indicativa de microorganismos patógenos con potenciales riesgos para la salud humana (Dufour et al., 2003).

La enzima β -galactosidasa está presente en todos los coliformes, su función es la hidrólisis de lactosa durante la fermentación. Por otro lado, *E. coli* también produce la enzima β -glucuronidasa, que es específica de esta bacteria, y cuya función también consiste en la hidrólisis de carbohidratos complejos. La detección de la enzima β -galactosidasa y β -glucuronidasa para la búsqueda de coliformes totales y *E. coli* respectivamente, ha sido utilizada como método alternativo a la filtración por membrana o Número Más Probable (Maheux *et al.*, 2015), ya que éstos son procedimientos más complejos y requieren un mayor tiempo de análisis (Geissler *et al.*, 2000).

El medio de cultivo comercial Colitag™ presenta el sustrato cromogénico orto-nitrofenil- β -galactósido (*ONPG* por sus siglas en inglés), capaz de ser hidrolizado por la β -galactosidasa de coliformes totales con la producción de un compuesto de color amarillo. Además, el medio presenta el sustrato fluorogénico dihidrato de 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (*MUG* por sus siglas en inglés), pasible de hidrólisis por la β -glucuronidasa de *E. coli* con la producción de un compuesto que fluoresce cuando el medio es expuesto a luz ultravioleta (365 nm) (Neogen, 2022).

De esta forma, si en una muestra de agua estuviesen presentes microorganismos coliformes, luego de la adición de Colitag™ y en las correspondientes condiciones de incubación, se observaría un color amarillo en el medio (más intenso que su respectivo control blanco); si la muestra presentara *E. coli*, también se observaría fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Naturalmente, el monitoreo de la presencia de este grupo de microorganismos en agua tratada para consumo es de gran importancia, y su detección es un evento disparador de acciones correctivas para evitar la diseminación de enfermedades transmisibles por el consumo de agua contaminada.

Los resultados de la búsqueda de coliformes totales y *E. coli* en el medio comercial Colitag™ resultó negativa para el 100% de las muestras, cumpliendo así con el requisito establecido por la norma UNIT 833:2008. Algunos investigadores (Wen *et al.*, 2020) discuten que un resultado aceptable para el análisis de agua desde el punto de vista microbiológico no garantiza la inocuidad de la misma. Ello se debe a que la presencia de otros patógenos peligrosos para la salud (como bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, por ejemplo), no siempre se correlaciona con la presencia de coliformes. Además, actualmente no existe un consenso global en el tipo de microorganismos indicadores para considerar el agua como apta para su consumo. Vale destacar que la norma 833:2008 tiene una antigüedad de 14 años, y la misma se encuentra actualmente bajo revisión.

4.2.2.2 Recuento de heterótrofos

El recuento de estos microorganismos proporciona un estimado de la densidad microbiana del agua una vez que se ha sometido a procesos de desinfección. Es un estimado debido a que sólo podrán ser contemplados los microorganismos capaces de crecer en este tipo de medio de cultivo, tiempo, temperatura y atmósfera, es decir, aquellos que sean cultivables (Dufour *et al.*,

2003). Además, los microorganismos heterótrofos constituyen el indicador primario de la eficacia de desinfección del agua para consumo (Baird, R., & Bridgewater, L., 2017).

Los resultados del recuento de heterótrofos pueden observarse en la tabla a continuación.

Tabla 20. Resultados del recuento de heterótrofos para las muestras analizadas

	Muestra / Vol (mL)	Recuento de heterótrofos (ufc/mL)
Salidas de agua	ESP1	$1,1 \times 10^3$
	ESIQ	$7,2 \times 10^2$
	ESPI	$8,8 \times 10^2$
	ESSS	97
Entradas de agua	ATEP1	$9,3 \times 10^2$
	ATEIQ	$1,1 \times 10^3$
	ATEPI	$2,1 \times 10^2$ (estimado)
	ARSS	46

ESP1: Equipo Salida Piso 1, ESIQ: Equipo Salida Instituto Química, ESPI: Equipo Salida salón Piedra, ESSS: Equipo Salida Subsuelo, ARSS: Agua Red Subsuelo, ATEP1: Agua Tanque Entrada Piso 1, ATEIQ: Agua Tanque Entrada Instituto Química, ATEPI: Agua Tanque Entrada salón Piedra

Como puede observarse en la Tabla 20, de las 8 muestras de agua analizadas, 5 de ellas no cumplieron con el valor máximo permitido de 500 ufc/mL establecido en la norma UNIT 833:2008. Las muestras no conformes fueron las entradas de agua de tanque correspondientes a las muestras ATEP1 y ATEIQ, y las salidas de agua filtrada de las muestras ESP1, ESIQ y ESPI.

Un recuento alto de heterótrofos para el agua proveniente de tanques de almacenamiento puede deberse, como fue mencionado previamente, a distintos factores relativos al tanque que promueven las condiciones propicias para el crecimiento o re-crecimiento de los microorganismos. Dichos factores también afectan la turbidez del agua almacenada, y se relacionan inversamente con la presencia de desinfectante en el tanque. Las muestras de agua de tanque ATEP1 y ATEIQ presentaron niveles bajos de cloro, lo que podría explicar el crecimiento microbiano en sus respectivos tanques.

El recuento de heterótrofos también mostró que en promedio, el agua filtrada presentó mayores recuentos que el agua de entrada. Otro resultado llamativo fue que el recuento máximo fue el de una muestra de agua filtrada (ESP1). Este resultado es de particular interés, ya que sugiere que los filtros no están contribuyendo a una mejora en la calidad del agua para consumo, presentando un recuento comparable con el agua de tanque, que se encuentra sometida a otras condiciones y que no ha sido purificada. Considerando que el método no es capaz de recuperar la totalidad de microorganismos presentes en el agua (entre otras limitaciones que

presenta), ya sea porque no son cultivables o porque exigen otras condiciones de tiempo y temperatura, es posible además que estos recuentos sean subestimados.

Para considerar los resultados del recuento de heterótrofos para las salidas de agua correspondientes a las muestras ESP1, ESIQ y ESPI, es necesario reparar en las características del filtro que utilizan los equipos purificadores. El carbón activado es un material con un alto grado de microporosidad y baja selectividad de retención (Reinoso et al., 2002), lo que se traduce en un alto poder de adsorción de sustancias orgánicas, así como de desinfectante residual. Debido a ello, este material es utilizado para la filtración de agua para consumo en la medida que mejora la calidad y el gusto del agua (Lin, W. et al, 2020). Es precisamente por estas características que se ha evidenciado que la superficie del filtro es un ambiente propicio para la adhesión y proliferación de microorganismos, y su consecuente y paulatina liberación en el agua proveniente del filtro de carbón activado (Lin W. et al., 2020, Su et al., 2009 y Lin T. et al., 2020). Por lo tanto, la presencia de heterótrofos en el agua filtrada podría verse explicada por eventos de desprendimiento. De manera adicional, si el agua de entrada también presentó un alto recuento, el mismo podría estar influyendo en el recuento del agua filtrada si el filtro se encontrara saturado, por no haberlo reemplazado a tiempo, por ejemplo; este podría ser el caso de las muestras ATEP1 y ATEIQ. Los equipos purificadores que se utilizan en Facultad de Química son reemplazados cada 8 meses y sanitizados con ácido peracético al 15%. Al momento del muestreo, los mismos habían sido reemplazados 1 mes antes, por lo que los equipos se encontraban dentro del rango normal de antigüedad de uso según el proveedor.

En casos como el de las muestras ATEPI y ESPI (entrada y salida de agua, respectivamente), el resultado de este análisis indicó que el agua de entrada cumplió con el valor máximo permitido, pero no así el agua filtrada.

De acuerdo con algunos autores, un bajo nivel de crecimiento en este tipo de análisis puede conducir a una subestimación de la densidad bacteriana presente, debido a la presencia de bacterias vivas pero no cultivables (*viable non-culturable bacteria*, VNCB por sus siglas en inglés). Estos microorganismos presentan un estado metabólico y fisiológico activo, aunque no similar al de sus contrapartes viables, y no tienen la capacidad de crecimiento en técnicas convencionales de recuento en placa (Li et al., 2014). Este estado es reversible, por lo que luego estas bacterias podrían encontrar condiciones aptas para salir del estado no cultivable y ser detectadas. La presencia de este tipo de bacterias ha sido objeto de preocupación en el ámbito de la seguridad alimentaria y del agua, debido a que existe evidencia de que tratamientos bactericidas (desinfectantes, por ejemplo) pueden promover el pasaje hacia el estado viable no cultivable (Nășcuțiu, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos para el recuento de microorganismos heterótrofos y los del parámetro turbidez, no fue posible establecer una clara relación entre ellos. Los niveles de turbidez para aquellas muestras con un recuento de heterótrofos no conforme fueron variados,

y la muestra con el máximo nivel de turbidez resultó dentro del valor máximo permitido para dicho recuento.

Por otra parte, las salidas de agua purificada que no cumplieron con el valor máximo permitido del recuento de heterótrofos presentaron valores de pH superiores a aquellas muestras de agua que sí lo cumplieron, independientemente si fueron entradas de agua o agua purificada. Además, la muestra con el recuento más alto de heterótrofos coincide con el valor más alto de pH. Estos resultados pueden estar reflejando que el rendimiento del filtro de carbón granular activado en la adsorción de sustancias orgánicas se vio disminuido. Cuando los valores de pH son altos, los compuestos orgánicos ven incrementada su solubilidad, dificultando su adsorción y permitiendo así el pasaje de los microorganismos que luego se presentan en el agua para consumo (Water Quality Association, 2013).

4.2.2.3 Búsqueda de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 mL de muestra

P. aeruginosa es un patógeno oportunista de los sistemas de distribución de agua potable, capaz de persistir en condiciones oligotróficas gracias a su capacidad de formar *biofilms* (Liu et al., 2018). Como fue mencionado previamente, el monitoreo de este patógeno en agua para consumo es de gran importancia debido a que es uno de los agentes etiológicos responsables de infecciones diversas, y con una mortalidad asociada, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Ramírez-Castillo et al., 2015).

Cuando los cultivos correspondientes al *test* presuntivo de *P. aeruginosa* fueron examinados bajo luz ultravioleta, se observó que todos ellos desarrollaron un pigmento verde fluorescente, a excepción de aquellos correspondientes a las muestras ARSS y ESSS, como puede observarse en la figura 16.

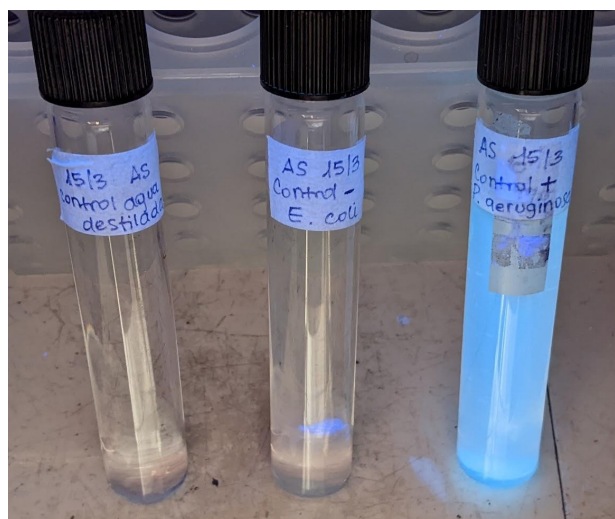


Figura 15. Controles de caldo asparagina de doble concentración. De izquierda a derecha: Blanco. Control negativo. Control positivo.

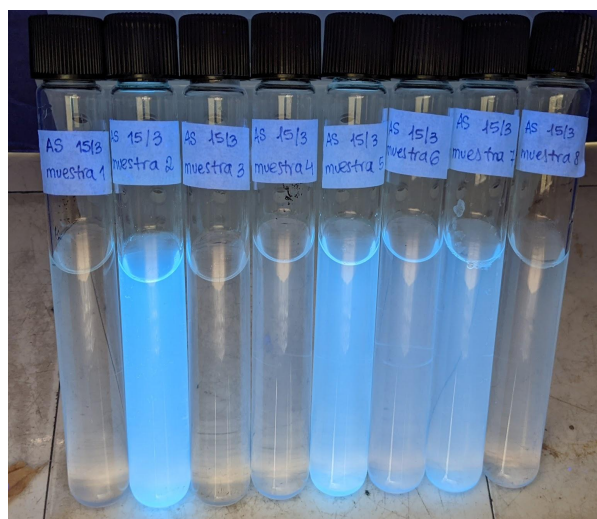


Figura 16. Resultados del cultivo en caldo asparagina. Muestras 1-8 corresponden a las muestras ARSS, ESPI, ESSS, ATEP1, ESP1, ATEIQ, ESIQ y ATEPI.

En base a estos resultados, las muestras ARSS y ESSS fueron descartadas del posterior análisis confirmatorio en caldo acetamida y crecimiento en agar cetrimide a 42 °C. El test confirmatorio resultó negativo para la totalidad de las muestras, y por lo tanto permitió establecer que las mismas cumplieron con el valor permitido establecido en la norma 833:2008. Sin embargo, es posible que estos resultados no fueran representativos de la realidad de cada muestra, debido a que *P. aeruginosa* es un ejemplo de bacteria que puede adoptar el estado de viable no cultivable mencionado previamente (Li et al., 2014).

Si bien ninguno de estos reaislamientos fue identificado como *P. aeruginosa* por los ensayos confirmatorios realizados previamente, se decidió estudiar los microorganismos que fueron capaces de crecer y producir fluorescencia en caldo asparagina, y continuar entonces con experimentos que permitieran la identificación preliminar de estos para dilucidar si correspondían al género *Pseudomonas*. Para ello, las muestras presuntivas para *P. aeruginosa* fueron aisladas en TSA, lo que dio origen a 17 reaislamientos.

Cada reaislamiento fue sembrado en caldo asparagina de doble concentración para evaluar cuál de ellos fue responsable de la emisión de fluorescencia. Cuando dicho medio de cultivo fue examinado bajo luz ultravioleta (365 nm), fue observado un pigmento verde fluorescente en 14 de los 17 reaislamientos. Este resultado dio paso a ensayos subsiguientes que permitieron esclarecer las características fenotípicas y bioquímicas de los microorganismos presentes en los 14 reaislamientos mencionados previamente. Estos resultados pueden observarse en la Tabla 21 presentada a continuación.

Tabla 21. Ensayos de caracterización fenotípica y bioquímica para reaislamientos.

	Reaislamiento	Caldo AS	Gram	Oxidasa	OF	King A	Crecimiento 42°C caldo nutriente	AC 35°C	Género
Salidas de agua	ESP1-A	+	BGN	-	O	-	-	+	No <i>Pseudomonas</i>
	ESP1-B	-							
	ESP1-C	+	BGN	+	O	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
	ESIQ-A	+	BGN	+	I	-	-	-	No <i>Pseudomonas</i>
	ESIQ-B	-							
	ESIQ-C	+	BGN	+	O	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>
	ESPI-A	+	BGN	+	O	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>
	ESPI-B	+	BGN	+	O	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
Entradas de agua	ESPI-C	+	BGN	+	O	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
	ATEP1-A	-							
	ATEP1-B	+	BGN	+	O	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEIQ-A	+	BGN	+	O	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEIQ-B	+	BGN	+	O	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEIQ-C	+	BGN	+	O	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEPI-A	+	BGN	+	O	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEPI-B	+	BGN	+	O	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	ATEPI-C	+	BGN	+	O	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>

AS: Caldo Asparagina, BGN: Bacilos gram negativos, OF: Prueba de óxido-fermentación de glucosa, AC: agar cetrimide, O: Microorganismo oxidador de glucosa, I: Microorganismo inactivo para glucosa

Mediante la tinción de Gram fue determinado que la totalidad de los reaislamientos correspondieron a bacilos gram negativos. En cuanto a la prueba de citocromo oxidasa, a excepción de uno de los reaislamientos, todos resultaron positivos. Para indagar sobre el

metabolismo de la glucosa de los reislamientos, teniendo en cuenta que el género *Pseudomonas* realiza la oxidación de este carbohidrato, los mismos fueron sembrados en medio de cultivo Hugh-Leifson con glucosa como única fuente de carbono. El resultado de este ensayo fue uniforme entre los distintos reislamientos: todos resultaron oxidadores, a excepción de uno de ellos que resultó inactivo frente a la glucosa.

Los resultados de los reislamientos en su siembra en agar King A para la evaluación de la producción de piocianina fueron positivos para 8 de los 14 aislamientos, pero ninguno de ellos fue capaz de crecer en caldo nutriente a 42 °C, como es característico de la especie *aeruginosa*). El último ensayo realizado fue la siembra de los reislamientos en agar cetrimide, esta vez a una temperatura de 35 °C, en el cual fue observado el crecimiento de 6 aislamientos. En conjunto, estos ensayos preliminares determinaron que 12 de los 17 aislamientos realizados pertenecen al género *Pseudomonas* spp.

4.2.2.4 Búsqueda de *Mycobacterium* spp. en 500 mL de muestra

Mycobacterium spp. es un género de bacterias extremadamente resistente a los tratamientos de desinfección de las aguas gracias a su pared rica en lípidos, lo que la hace hidrofóbica (Dufour et al., 2003). Por ello, es un género cuyas bacterias no asociadas a tuberculosis han tomado relevancia por su diseminación en agua para consumo, y por sus efectos en las poblaciones más expuestas, como individuos cursando diversas infecciones y enfermedades crónicas, inmunocomprometidos, y adultos mayores (Baird, R., & Bridgewater, L. (2017), aunque también existe evidencia de su afección en personas sin condiciones pre-existentes (Vaerewijck et al., 2005).

Debido a esta resistencia, este género puede ser seleccionado positivamente una vez que sobrevive a desinfectantes, y puede proliferar sin la competencia de otros microorganismos presentes (van der Wielen & van der Kooij, 2013). Es así que el efecto de los desinfectantes puede disminuir la diversidad de las bacterias de este género (Waak et al., 2019).

Adicionalmente, este tipo de microorganismos son capaces de formar *biofilms* en sistemas de distribución de agua, así como crecer intracelularmente dentro de amebas de vida libre para promover su supervivencia, por lo que su eliminación es un gran desafío (Percival et al., 2014). Por este motivo, varios investigadores han evidenciado la presencia de estos microorganismos en los sistemas de distribución de agua, en agua potable de instituciones nosocomiales y agua potable doméstica (Vaerewijck et al., 2005).

Su elevada resistencia a los tratamientos de desinfección y su propensión a la formación de *biofilms* sobre superficies hacen a estos microorganismos de especial interés, teniendo en cuenta además que dentro de este género se encuentran otras especies patógenas además de *M. avium* (Wang et al., 2013). El establecimiento de una comunidad microbiana como los *biofilms* por bacterias de este género las protege y las hace mucho más resistentes a agresiones del medio que a las células planctónicas, lo que sería beneficioso además para las cepas de este género que son de lento crecimiento (Percival et al., 2014).

Existe evidencia (Zamora et al., 2007) de que estos microorganismos son capaces de adherirse a polipropileno (material que a veces acompaña al filtro de carbón granular activado, como es el caso de los purificadores muestrados). La investigación realizada por Norton et al., 2020, evidenció que los filtros de carbón granular activado fueron ineficientes e inconsistentes en la remoción de micobacterias no tuberculosas, encontrándolas no sólo en el agua efluente sino también en secciones del filtro.

Dado que las bacterias contempladas en este género forman parte de la microflora del agua, su recuperación y detección mediante métodos dependientes de cultivo es altamente dependiente de una adecuada descontaminación y concentración de la muestra (Baird, R., & Bridgewater, L. (2017). Este es un aspecto no menor, ya que es sabido que estos microorganismos son frecuentes colonizadores de sistemas de distribución de agua, y la ausencia de su detección por métodos tradicionales puede responder a las limitaciones inherentes de los procedimientos, así como el estado de viable no cultivable que estas bacterias pueden adoptar.

Los resultados de la búsqueda de *Mycobacterium* spp. se encuentran en la tabla a continuación.

Tabla 22. Resultado de la búsqueda de *Mycobacterium* spp. en 500 mL de muestra para todas las muestras

	Muestra	Resultado	Identificación
Salidas de agua	ESP1	Ausencia	
	ESIQ	Ausencia	
	ESPI	Presencia	<i>Mycobacterium</i> spp.
	ESSS	Presencia	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
Entradas de agua	ATEP1	Ausencia	
	ATEIQ	Ausencia	
	ATEPI	Ausencia	
	ARSS	Ausencia	

La identificación de los microorganismos crecidos en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen fue realizada por la CHLA-EP y determinó que no se encontraron microorganismos pertenecientes a *Mycobacterium* spp. en ninguna de las entradas de agua.

De las salidas de agua, las únicas positivas para la presencia de *Mycobacterium* spp. fueron las muestras ESPI (agua filtrada del equipo purificador del salón de piedra, para la cual no fue posible identificar la especie), y ESSS (agua filtrada del equipo purificador ubicado en el subsuelo de la Facultad). En esta última fue identificado el microorganismo *Mycobacterium fortuitum*. Esta bacteria se encuentra entre aquellas más comúnmente aisladas de agua potable (Vaerewijck et al., 2005), y es causante de infecciones asociadas a la piel, hueso y tejidos blandos (Gutierrez & Somoskovi, 2014). Por otro lado, además de ser comúnmente encontrado en el ambiente de agua potable (Bartram et al., 2004), y asociado a la filtración por carbón granular activado (Le Dantec et al., 2002), es un microorganismo capaz de formar rápidamente

biofilms de alta densidad en diversos materiales, incluidos aquellos utilizados en el contexto clínico (Esteban & García-Coca, 2018). *M. fortuitum* es además considerado un colonizador primario debido a su independencia de otras bacterias para formar y desarrollar un *biofilm* (Hall-Stoodley et al., 1998), aún en contextos oligotróficos, como lo es el agua potable. Esto implica que de estar presentes otros microorganismos, sus células planctónicas podrían tener la oportunidad de adherirse a un *biofilm* ya existente, lo que podría ser beneficioso para su permanencia en el filtro.

Estos resultados contrastan con investigaciones en las que se ha demostrado la presencia frecuente de *Mycobacterium* spp. colonizando filtros de carbón granular activado y actuando como fuente de estas bacterias por elución (Norton et al., 2020; Bartram et al., 2004), y el pasaje de este tipo de microorganismos por el filtro de carbón granular activado. Ello se debe a que el tamaño de los poros es superior a 0,45 μm (los filtros de los purificadores de este trabajo tienen un tamaño de 5 μm , tanto el filtro de polipropileno como el de carbón granular activado). Teniendo en cuenta que este análisis fue realizado a solo 1 mes del reemplazo de cada equipo purificador y su filtro, es posible que aún no hubiera pasado el tiempo suficiente como para que el filtro se enriqueciera de microorganismos y por ello *Mycobacterium* spp. no fuera detectado con mayor frecuencia.

Podría discutirse también que la presencia de estos microorganismos haya sido subestimada debido a que los mismos pueden encontrarse en un estado de viable no cultivable, o que entre ellos hayan estado presentes bacterias de lento crecimiento (la única bacteria detectada de este género, *M. fortuitum*, pertenece a aquellas que son de rápido crecimiento) (De Groote & Huitt, 2006). Debido a las características de este género bacteriano y su comportamiento en aguas, una aproximación más favorable para su detección podría radicar en el empleo de métodos moleculares como la secuenciación o qPCR.

4.2.3 Extracción de ADN total a partir de membranas de filtración

A continuación se presentan los resultados de la cuantificación del ADN extraído a partir de las membranas de filtración de cada muestra. La misma fue realizada en fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabla 23. Resultados de cuantificación del ADN extraído de cada muestra

	Muestra	ADN ($\mu\text{g/mL}$)
Entradas de agua	ATEP1	4,55
	ATEIQ	5,82
	ATEPI	4,5
	ARSS	0,13
Salidas de agua	ESP1	7,94
	ESIQ	4,75
	ESPI	1,60
	ESSS	0,38

La cuantificación del ADN extraído de cada muestra mostró una diferencia en las muestras de entrada de agua de tanque respecto al agua de red (muestras ATEP1, ATEIQ y ATEPI tuvieron una cuantificación de ADN mayor que la muestra ARSS). Este resultado es congruente para la muestra ARSS en la medida que la misma presentó los valores máximos de cloro y mínimos de turbidez, así como el menor valor de recuento de heterótrofos de todas las muestras, lo que sugiere una buena calidad del agua para consumo y una baja presencia de microorganismos en ella. Por el contrario, la cuantificación de ADN presente en las muestras de agua de tanque (que presentaron los valores más altos de turbidez) fue muy superior al agua de red, y podría estar reflejando que en los tanques se dan las condiciones propicias para el desarrollo microbiano, entre ellas la formación de *biofilms*.

Los resultados de la cuantificación del ADN extraído de cada muestra pudieron ser evaluados a la luz del recuento de heterótrofos registrado para cada muestra. Mediante esta comparación fue posible determinar que existió una relación entre estos dos parámetros en la medida que aquellas muestras con una mayor cuantificación de ADN tuvieron un recuento alto de heterótrofos por encima del valor máximo permitido, lo que constituye un resultado esperado.

En el caso de la muestra ATEPI no fue observada esta relación, ya que tuvo una cuantificación de ADN similar a las otras aguas provenientes de tanque, pero un recuento de heterótrofos dentro del valor máximo permitido. Considerando los resultados de las otras muestras de agua de tanque, podría discutirse que las mismas muestran una tendencia (altos valores de turbidez, bajos valores de cloro, recuento de heterótrofos no conforme) que podría indicar que un bajo recuento para la muestra ATEPI radicaría en la variabilidad inherente al método de recuento o a errores en la preparación de la muestra, en el paso de homogeneización en particular, o del proceso de extracción de ADN.

Sin embargo es importante destacar que la cantidad de ADN presente en las muestras puede ser considerada como una aproximación, pero no es representativa *per se* de la cantidad de microorganismos presentes. Es por esta razón que es necesario contar con un método que permita una estimación de la carga bacteriana.

4.2.4 Estimación de carga bacteriana por qPCR *ARNr 16S*

La estimación molecular de la carga bacteriana de cada muestra de agua fue realizada mediante una qPCR cuya secuencia *target* fue la del gen de ARN ribosomal 16S, parte integrante de la subunidad pequeña del ribosoma procariota en un complejo junto a diversas proteínas ribosomales. Este gen es utilizado ampliamente para identificación, caracterización y clasificación filogenética de comunidades microbianas de acuerdo a las distintas secuencias conservadas e hipervariables que presenta (Woese, 1987; Chakravorty, S. et al., 2007). Además, este gen también ha sido propuesto como potencial biomarcador cuantitativo de infecciones bacterianas en el ámbito clínico (Davis, 2010).

El cálculo del número de copias de *ARNr 16S* representa un indicio del número de microorganismos presentes en cada muestra más que una cuantificación precisa. Esto es debido a que las bacterias presentan un número variable de copias de este gen (Louca, et al., 2018). Además, esta aproximación (molecular) para estimar la carga microbiana de las muestras, hace posible realizar comparaciones respecto del método tradicional (recuento de heterótrofos).

La curva de calibración obtenida en este ensayo indicó una eficiencia de reacción de 107% con un R^2 asociado de 0,99. La ecuación asociada a esta curva de calibración fue la siguiente:

$$Cq = -3,169 * \text{Log (concentración)} + 29,695$$

Para realizar la cuantificación del número de copias de *ARNr 16S*, fueron interpolados los valores de Cq de los estándares y de las muestras en la ecuación mostrada anteriormente. Los resultados de esta cuantificación para las muestras pueden encontrarse en la tabla 24.

El LOD obtenido fue igual al LOQ , correspondiente a 19,23 Cq (dilución 10^3 del estándar). Las muestras cuyo valor promedio de Cq superó este límite, fueron consideradas no detectables.

Tabla 24. Cálculo del número de copias del gen *ARNr 16S* para todas las muestras

	Muestra	Cq promedio	N° copias/mL
Salidas	ESP1	13,67	1.451,17
	ESIQ	13,77	1.337,88
	ESPI	16,33	269,50
	ESSS	17,89	67,04
Entradas	ATEP1	14,29	909,29
	ATEIQ	13,49	1.620,95
	ATEPI	14,27	921,21
	ARSS	20,47	No detectable

A excepción de la muestra ARSS, cuyos valores de *Cq* fueron no detectables, todas las muestras fueron cuantificables.

Las muestras de entrada de agua provenientes de tanque (ATEPI, ATEP1 y ATEIQ) presentaron números de copias de *ARNr 16S* cuantificables y ampliamente superiores a la carga bacteriana sugerida por qPCR para la muestra de agua de red ARSS, cuyo número de copias se encontró por debajo del límite de detección. Estos resultados pueden estar reflejando una carga bacteriana superior en el agua almacenada en los tanques como fue sugerido por el recuento de heterótrofos para este tipo de muestras, teniendo en cuenta además que los niveles de turbidez para estas muestras fueron los más altos registrados.

La cuantificación del ADN extraído de cada muestra mostró una diferencia en las muestras de entrada de agua de tanque respecto al agua de red. Estos resultados son esperables para las muestras que mostraron una mayor carga bacteriana tanto por qPCR *ARN16S* como por el recuento de heterótrofos; mientras que un número de copias no detectable para la muestra ARSS fue consistente con la baja carga bacteriana sugerida por los dos métodos previamente mencionados.

De manera análoga, las muestras con una cuantificación mayor por qPCR, también mostraron recuento de heterótrofos no conformes y los números de copias/mL de *ARN16S* más altos de las salidas: ESP1 y ESIQ.

La cuantificación del número de copias de *ARNr 16S* y el recuento de heterótrofos mostraron coincidencias respecto a aquellas muestras en las que fueron determinadas las cargas microbianas más bajas (ARSS, y ESSS, agua de red del subsuelo y agua de salida de equipo del subsuelo, respectivamente). Dichas muestras mostraron similitudes en los resultados para el recuento de heterótrofos, la ausencia de coliformes, y la ausencia de *P. aeruginosa*. Además, estas muestras fueron aquellas con los valores más altos de cloro libre y los valores mínimos de turbidez. No puede establecerse una correlación en sentido estricto para estos resultados, pero los mismos sugieren cierta asociación entre altos niveles de cloro libre y una menor magnitud de bacterias presentes en las muestras.

Los métodos también coincidieron en la cuantificación de las muestras con cargas microbianas más altas (ATEIQ y ESP1, agua proveniente de tanque y agua filtrada de purificador respectivamente). El recuento de heterótrofos para ambas fue el mismo, y si bien por qPCR la muestra ATEIQ presentó un mayor número de copias de *ARNr 16S*, debe tenerse en cuenta la variabilidad de este número por bacteria, lo que contribuye a la coherencia en los resultados entre ambos métodos de cuantificación.

El promedio de número de copias calculado del gen *ARNr 16S* fue superior para las entradas de agua respecto a las salidas, aunque el análisis de varianza para estos valores con comparación LSD determinó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p>0,05$). A este respecto, vale destacar que es posible que haya tenido lugar una sobreestimación en la cuantificación de este gen. Esta sobreestimación de la abundancia del mismo podría ocurrir principalmente por la variabilidad en el número de copias de este gen que se encuentra presente en cada bacteria. Algunos autores (Větrovský, T., & Baldrian, P., 2013 ; Milanese, A., et al. 2019) han discutido la vigencia del *ARNr 16S* como herramienta de cuantificación, y proponen además como fuentes de sobreestimación del mismo las regiones particulares de la secuencia del gen a las que es dirigida la amplificación, la variabilidad en las eficiencias de los cebadores que fueran empleados en los experimentos, entre otros factores. Como alternativa a esta herramienta, podrían emplearse genes alternativos, con la principal consigna de que los mismos sean de copia única por genoma.

4.2.5 Detección del género *Mycobacterium* spp. por qPCR

La detección y cuantificación de los microorganismos del género *Mycobacterium* fue realizada por qPCR mediante la amplificación del gen *ARNr 16S*. Como fue mencionado previamente, distintos autores han evidenciado la presencia de estos microorganismos en los *biofilms* que forman en carbón granulado activado, así como en el agua filtrada por este elemento (Rodgers et al., 1999; Wang et al., 2013; Loret & Dumoutier, 2019; Norton et al., 2020).

La curva de calibración obtenida para este ensayo indicó una eficiencia del 97%. La ecuación asociada a esta curva fue la siguiente:

$$Cq = -3,387 * \text{Log (concentración)} + 39,197$$

Para realizar la detección y cuantificación de *Mycobacterium* spp., fueron interpolados los valores de *Cq* de todas las muestras en la ecuación descripta anteriormente.

De acuerdo al resultado de la cuantificación de las diluciones del estándar, el *LOD* en este experimento resultó en un valor de *Cq* de 32,67. El *LOQ* fue de 28,90 *Cq*, correspondiente a la dilución del estándar $9,8 \times 10^2$. Muestras con valores promedio de *Cq* menores que el *LOD* y superiores al *LOQ* fueron catalogadas como detectables pero no cuantificables.

Los resultados de la cuantificación para las muestras pueden encontrarse en la tabla a continuación.

Tabla 25. Resultados de la cuantificación de *Mycobacterium* spp. para todas las muestras

	Muestra	Cq promedio	N° copias/mL
Salidas	ESP1	27,1	46,71
	ESIQ	30,54	Detectable no cuantificable
	ESPI	27,31	40,54
	ESSS	30,02	Detectable no cuantificable
Entradas	ATEP1	30,24	Detectable no cuantificable
	ATEIQ	30,68	Detectable no cuantificable
	ATEPI	28,54	17,61
	ARSS	31,16	Detectable no cuantificable

De acuerdo a estos resultados, aquellas muestras que resultaron detectables corresponden a la muestra ESSS, ESIQ, ARSS, ATEP1 y ATEIQ. Las muestras cuantificables fueron ESPI, ESP1 y ATEPI.

Como primer resultado destacable, mediante este método molecular fue detectado el ADN de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* spp. en el 100% de las muestras. Este resultado es relevante, ya que contrasta con los resultados de la búsqueda de este grupo de bacterias por métodos de cultivo, en la que todas las muestras de entrada de agua resultaron negativas para *Mycobacterium* spp.

Estos resultados reflejan la capacidad superior de detección de los métodos moleculares sobre los métodos tradicionales de cultivo, sin dejar de lado la principal limitación de la qPCR: la detección de ADN no necesariamente se traduce en la presencia de microorganismos viables. Dado entonces que no es posible discernir si dicha detección corresponde a bacterias viables o a ácido nucleico proveniente de células dañadas o muertas, no es un resultado que permita concluir con seguridad la presencia de bacterias viables de este género en todas las muestras.

Para subsanar esta limitación, puede emplearse otra variante de la técnica como la PMA-qPCR (*Propidium monoazide quantitative polymerase chain reaction*) para asegurar la detección de ADN proveniente de células viables exclusivamente, mediante la intercalación del propidio monoazida en el ADN de células muertas (y la posterior inhibición de la actividad de la polimerasa en qPCR) (Li et al., 2015).

Respecto a las salidas de agua, la qPCR detectó la presencia de ADN de *Mycobacterium* spp. en todas ellas, y dos de ellas se ubicaron en el rango de muestras cuantificables (muestras ESPI y ESP1). Si se comparan estos resultados con aquellos obtenidos por el método dependiente de cultivo, se tiene que la muestra correspondiente al equipo purificador del salón de Piedra (ESPI) presentaba *Mycobacterium* spp. y el mismo fue detectado por ambos métodos. En este caso sería razonable asumir que la detección de la qPCR corresponde a microorganismos viables pertenecientes a este género. Respecto a la muestra ESP1, no es posible obtener una correlación respecto a la detección por qPCR con el método de cultivo. Esto podría deberse a que el ADN presente se trate de una especie del género de lento crecimiento, o que las células se encuentren en un estado no cultivable.

Por otro lado, la búsqueda por método de cultivo resultó positiva para *M. fortuitum* en la muestra ESSS, que en este experimento de qPCR presentó concentraciones detectables del ADN de bacterias de este género, como era esperable.

El análisis de la varianza con comparación *LSD* para el número de copias de *ARNr 16S* de *Mycobacterium* spp. detectado en las entradas y las salidas de agua resultó no tener una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Sin embargo, las muestras con los números más altos fueron las salidas ESP1 y ESPI. Estos resultados sugieren que bacterias pertenecientes a este género se encuentran presentes en el sistema de distribución del agua que llega a Facultad de Química, y son capaces de sortear la barrera que el filtro de carbón activado impone en los equipos purificadores, llegando así al agua que es consumida desde los mismos. Ello podría explicarse además por la capacidad de estas bacterias de establecer

biofilms (Percival et al., 2014). La adopción de esa forma de vida afecta negativamente la capacidad adsorptiva del filtro, dependiendo del tiempo de uso del mismo y de otros factores como la temperatura del agua, la calidad y cantidad del carbono orgánico disponible, y la composición de la comunidad microbiana que coloniza el filtro (Velten et al., 2011).

Teniendo en cuenta los factores de virulencia asociados a algunas bacterias de este género, especialmente aquellas pertenecientes a *Mycobacterium avium complex*, y el amplio uso de estos equipos, sería de gran utilidad contar con datos provenientes de un mayor número de muestras. Con ello se podrían sacar conclusiones que permitan esclarecer si la detección realizada por qPCR en esta instancia fue un caso aislado, o es un fenómeno presente en todos los equipos purificadores de este tipo.

4.2.6 Análisis molecular de las muestras de agua por *multiplex* qPCR

Los resultados de este experimento de qPCR para el canal verde (detección realizada por la sonda FAM para *M. avium*) pueden observarse en la figura 17.

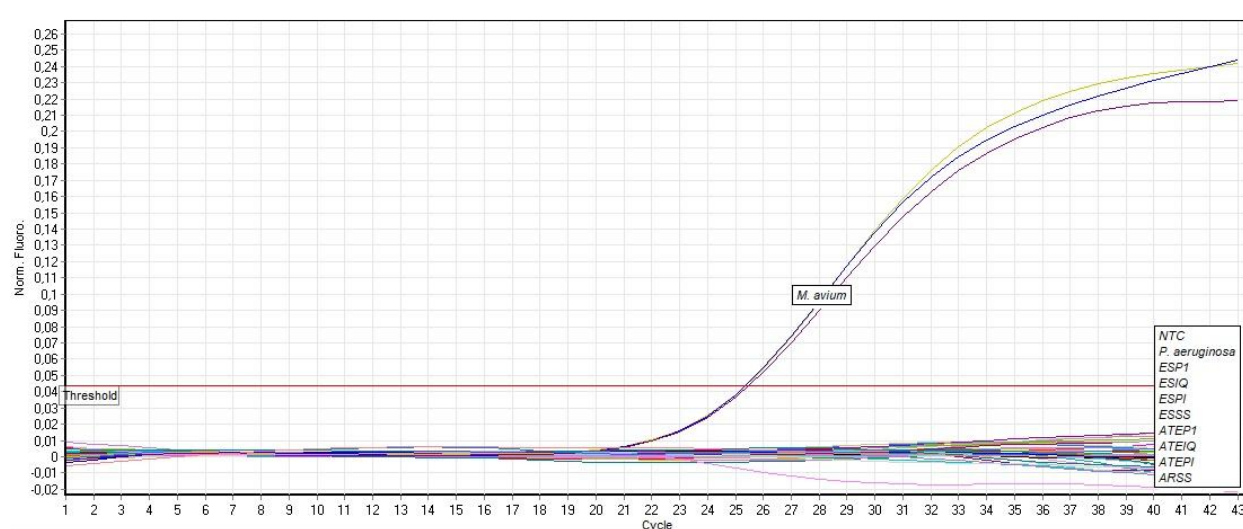


Figura 17. Curvas de amplificación de *multiplex* qPCR muestras de agua.

Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación. Canal de detección verde (FAM-*M. avium*).

Como se observa en la figura anterior, fue detectado únicamente el control positivo (*M. avium*). No hubo detección de este microorganismo en ninguna de las muestras analizadas, por lo que se determinó una ausencia del mismo.

Los resultados de este experimento de qPCR para el canal amarillo (detección realizada por la sonda HEX para *P. aeruginosa*) pueden observarse en la figura 18.

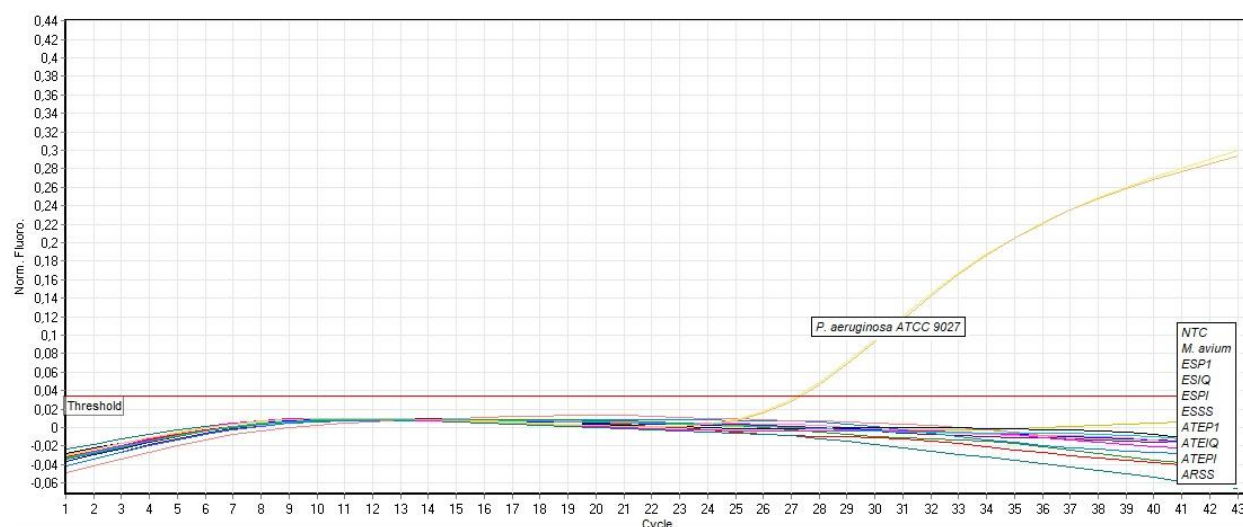


Figura 18. Curvas de amplificación de *multiplex* qPCR muestras de agua.

Eje y: fluorescencia. Eje x: ciclo de cuantificación. Canal de detección amarillo (HEX-*P.aeruginosa*).

Las curvas de amplificación de la detección por HEX mostraron la amplificación exclusiva del control positivo. Este resultado coincide con la búsqueda realizada por métodos de cultivo, en la que se determinó la ausencia de *P. aeruginosa* en las muestras analizadas.

5. Conclusiones y perspectivas

Se logró realizar la evaluación de la calidad del agua para consumo de las muestras recolectadas en Facultad de Química, con especial enfoque en aquellas provenientes de equipos purificadores.

Respecto a la calidad microbiológica del agua, se pudo determinar que existieron parámetros establecidos en la normativa de referencia que las muestras no cumplieron, y se detectó la presencia de otros microorganismos no contemplados en la misma. Sería interesante realizar una identificación precisa de los microorganismos presentes en el agua purificada, y contar con este tipo de información de otros equipos purificadores, lo que permitiría llegar a conclusiones para mejorar la gestión de los equipos y garantizar la inocuidad del agua para su consumo. Adicionalmente, sería útil contar con información que permita actualizar la legislación vigente en nuestro país. Este contexto pone de manifiesto la necesidad de re evaluar los indicadores de calidad del agua vigentes en la actualidad, y dirigir los mismos a este tipo de sistema.

Para la búsqueda molecular de los patógenos oportunistas de interés en las muestras, fue posible lograr los primeros pasos para la puesta a punto de la *multiplex* qPCR capaz de realizar la detección de *P. aeruginosa* y *M. avium*. Como perspectiva, sería útil evaluar la linealidad de la detección de estos microorganismos en *singleplex* qPCR para que sea posible realizar una cuantificación, mientras que la *multiplex* qPCR podría tener el valor de *screening* de la presencia de dichos microorganismos.

Esta tesina es el primer estudio de la calidad microbiológica de equipos de purificación de agua en Uruguay, y se demostró que los requisitos de norma pueden no ser suficientes para hacer la evaluación en este tipo de sistemas. Este estudio podría ser un puntapié para investigaciones posteriores para establecer regulación inexistente en nuestro país sobre este tipo de purificadores de agua potable. En este sentido, teniendo en cuenta que un 75% de los montevideanos elige invertir en purificadores de agua o agua embotellada como alternativa al agua de la canilla suministrada por O.S.E. (Carriquiry et al., 2020), es importante avanzar en el estudio de estos sistemas para construir conocimiento preciso sobre las implicancias que trae aparejadas su uso.

ANEXO

Figuras

Figura correspondiente a la curva de melting de *qPCR ARNr 16S*.

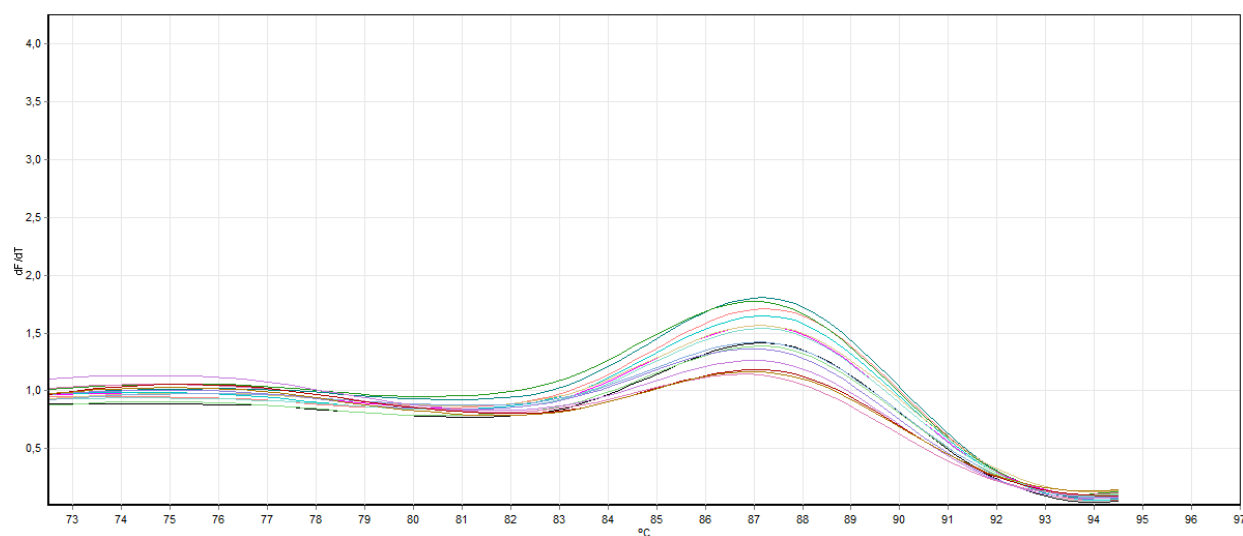


Figura 19. Curva de *melting* qPCR ARNr 16S.

Eje y: fluorescencia. Eje x: temperatura.

Tablas

Tabla 26. Cálculo del número de copias del gen ARNr 16S para los estándares

Estándar	Cq promedio	N° copias/μL promedio	Coeficiente de variación
1,75x10 ⁷	6,81	17.107.460,61	2,55
1,75x10 ⁶	9,39	2.558.322,18	10,49
1,75x10 ⁵	12,92	197.025,47	0,42
1,75x10 ⁴	16,17	18.540,25	3,82
1,75x10 ³	19,23	2.002,79	5,12

Tabla 27. Cálculo del número de copias de ARNr 16S para los estándares de *Mycobacterium* spp.

Estándar	Cq promedio	N° copias/μL promedio	Coeficiente de variación
9,8x10 ⁸	15,39	10.692.073,95	2,99
9,8x10 ⁵	18,99	929.790,51	12,94
9,8x10 ⁴	22,06	115.108,74	5,79
9,8x10 ³	25,95	8.203,98	16,27
9,8x10 ²	28,90	1.112,67	22,66
9,8x10 ¹	32,30	114,47	40,98

Preparación de soluciones

Buffer SDS 10%	20 mL	2,0 g SDS
		20 mL agua destilada
NaCl 5M	100 mL	29,22 g NaCl
		100 mL agua destilada
NaCl 0,7M	20 mL	0,82 g NaCl
		20 mL agua destilada
Buffer TE pH 8 1X	100 mL	1 mL Tris 1M
		0,2 mL EDTA 0,5M
		10,0mL agua destilada
Proteinasa K	20 mL	0,05 g Tris 20mM
		0,0029 g CaCl ₂ 1mM
		12,6 g Glicerol 50% v/v
Tris 1M	100 mL	0,12 g Tris
		100 mL agua destilada
Suero fisiológico 0,9% m/v	200 mL	1,8 g NaCl
		200 mL agua destilada
CTAB/NaCl	20 mL	0,82 g NaCl 0,7M a 55°C
		2,0 g de CTAB 10%
Gel de electroforesis al 0,8%	50 mL	0,40 g agarosa
		50 mL buffer TBE 0,5X
Gel de electroforesis al 2%	50 mL	1,0 g agarosa
		50 mL buffer TBE 0,5X

Medios de cultivo³

Agar Triptona de Soya Merck Millipore	300 mL	12 g TSA
		300 mL agua destilada
King A Merck Millipore	1000 mL	41,4 g King A
		990 mL agua destilada
		10,0 mL glicerol
Caldo acetamida Sigma-Aldrich	100 mL	1,0 g acetamida
		0,139 g K ₂ HPO ₄
		0,073 g KH ₂ PO ₄
		0,05 g MgSO ₄ ·7H ₂ O
		0,5 g NaCl
		150 µL solución de rojo fenol en NaOH 0,01N
		100 mL agua destilada
Caldo asparagina Difco™	100 mL	0,6 g asparagina
		0,2 g K ₂ HPO ₄
		0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O
		100 mL agua destilada
Middlebrook Sigma-Aldrich	500 mL	7H9 Middlebrook 2,35 g
		Glucosa 1,0 g
		Piruvato 2,0 g
		BSA 2,0 g
		500 mL agua destilada

³ En todos los casos, se controló el pH de los medios de cultivo preparados previo a su esterilización por autoclave 15 minutos a 121°C.

Caldo nutriente Oxoid	200 mL	5,6 g
		200 mL agua destilada
Caldo Mueller-Hinton Oxoid	500 mL	2,5 g
		500 mL agua destilada
Cetrimide HiMedia ®	1 L	46,7 g
		10 mL glicerol
		1000 mL agua destilada
Agar R2A Difco™	300 mL	5,49 g
		300 mL agua destilada
Agar Hugh-Leifson Difco™	1 L	Peptona 2 g
		Glucosa 10 g
		Azul de bromotimol 0,03 g
		NaCl 5 g
		K ₂ HPO ₄ 0,30 g
		Agar 3 g
		1 L agua destilada

BIBLIOGRAFÍA

Abe, Y., Fukushima, K., Matsumoto, Y., Niitsu, T., Nabeshima, H., Nagahama, Y., Akiba, E., Haduki, K., Saito, H., Nitta, T., Kawano, A., Tanaka, M., Matsuki, T., Motooka, D., Tsujino, K., Miki, K., Nakamura, S., Iida, T., Kida, H. (2022). *Mycobacterium senriense* sp. nov., a slowly growing, non-scotochromogenic species, isolated from sputum of an elderly man. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(5), 005378.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, pp. 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Applied Biosystems (2010). Factors Influencing Multiplex Real-Time PCR. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/search/results?query=factors%20influencing%20multiplex%20qpcr&persona=DocSupport&refinementAction=true>

Applied Technologies (2014). TaqMan® Multiplex PCR Optimization. Disponible en: <https://documents.net/document/taqman-multiplex-pcr-optimization-thermo-fisher-tools-guide-for-research-use.html>

Baird, R., & Bridgewater, L. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Bartram, J., Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Pedley, S. (2004). Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42854>

Behets, J., Declerck P., Delaet Y., Creemers B., & Ollevier, F. (2007). Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 68, pp. 137-144.

Bio-Rad (2022). qPCR Assay Design and Optimization. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/es-uy/applications-technologies/qpcr-assay-design-optimization?ID=LU507RIVK>

Boe-Hansen, B., Martiny, A.C., Arvin, E., & Albrechtsen, H.J. (2003). Monitoring Biofilm Formation and Activity in Drinking Water Distribution Networks under Oligotrophic Conditions. *Water Science and Technology* Vol 47(5), pp. 91-97.

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C. (2009) 'The MIQE guidelines: Minimum

information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR Primer Design Revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, pp. 19–28. doi:10.1016/j.bdq.2017.11.001

Carriquiry, M., Machado, M., Piaggio, M. (2020). Disposición a pagar por calidad de agua: estimaciones a través de gastos defensivos. Serie Documentos de Trabajo; 20/20.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), pp. 330–339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005

Clark, R., Abdesaken, F., Boulos, P., Mau, R. (1996). Mixing in Distribution System Storage Tanks: Its Effect on Water Quality. *Journal of Environmental Engineering*. 122(9), pp. 814–821. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1996)122:9(814)

“Crece venta de purificadores de agua ante contaminación del Santa Lucía”. (30 de marzo de 2015). Diario *El País*. Disponible en: <https://www.elpais.com.uy/negocios/empresas/crece-venta-purificadores-agua-contaminacion-santa-lucia.html>

CSIC I+D (2018). 379. "Los tanques: ¿influyen en la calidad del agua suministrada?" Resp. M. Pía Cerdeiras.

Davis, J., Fairley, D., McCarthy, A., Coyle, P., Christie, S., Shields, M., & Tubman, R. (2010). Quantification of “bacterial load” in late-onset neonatal sepsis using molecular techniques. *Archives of Disease in Childhood*, 95(Suppl. 1), A32.1–A32. doi:10.1136/adc.2010.186338.72

De Groote, M. A., Huitt, G. (2006). Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 42(12), pp. 1756–1763. doi:10.1086/504381

Design Expert®, State-Ease Inc., Minneapolis, 2005.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Doutereelo, I., Fish, K. E., Boxall, J. B. (2018). Succession of bacterial and fungal communities within biofilms of a chlorinated drinking water distribution system. *Water Research*. 141, pp. 74–85. doi:10.1016/j.watres.2018.04.058

Dufour, A., Snozzi, M., Koster, W., Bartram, J., Ronchi, E., Fewtrell, L. (Eds.). (2003). Assessing microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods. IWA Publishing.

El Mourabit, Y., Assabbane, A., Hamdani, M. (2020). Study of correlations between microbiological and physicochemical parameters of drinking water quality in El kolea city (Agadir, Morocco): Using multivariate statistical methods. *Journal of Materials and Environmental Sciences*. 11(2), pp. 310-317

Esteban, J., & García-Coca, M. (2018). Mycobacterium Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02651

Fan, H., Wu, Q., & Kou, X. (2008). Co-detection of Five Species of Water-borne Bacteria by Multiplex PCR. *Life Science Journal*, 5(4), pp. 47-54.

Fanner R.W., Dussert, B.W., Kovacic, S.L. (1996). Improved granular activated carbon for the stabilization of wastewater pH. *ACS Division of Fuel Chemistry*, Preprints. 41.

Fard, M. A., Asce, S. M., Barkdoll, B. D. & Asce, F. (2018). Stagnation Reduction in Drinking Water Storage Tanks through Internal Piping with Implications for Water Quality Improvement. *Journal of Hydraulic Engineering*, 144(5).

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., (2007), *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, Missouri, U.S.A., Mosby.

Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I., & Alonso, J. L. (2000). Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), pp. 280–285. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00970.x

Ghielmetti, G., Rosato, G., Trovato, A., Friedel, U., Kirchgaessner, C., Perroulaz, C., Pendl, W., Schulthess, B., Bloemberg, G.V., Keller, P.M., Stephan, R., Tortoli, E. (2021). *Mycobacterium helveticum* sp. nov., a novel slowly growing mycobacterial species associated with granulomatous lesions in adult swine. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(1).

Gibert, O., Lefèvre, B., Fernández, M., Bernat, X., Paraira, M., Calderer, M. & Martínez-Lladó, X. (2013). Characterising Biofilm Development on Granular Activated Carbon Used for Drinking Water Production. *Water Research*, 47, pp. 1101-1110.

Gutierrez, C., Somoskovi, A. (2014). Human Pathogenic Mycobacteria. Reference Module in *Biomedical Sciences*, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00137-9>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383001379>

Hall-Stoodley, L., Lappin-Scott, H. (1998). Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiology Letters*, 168(1), pp. 77–84, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13258.x>

Hidrored (2022). *Purificadores*. Disponible en: <https://www.hidrored.com.uy/producto/>

Huang, J., Chen, S., Ma, X., Yu, P., Zuo, P., Shi, B., Wang, H., Alvarez, P.J. (2021). Opportunistic pathogens and their health risk in four full-scale drinking water treatment and distribution systems. *Ecological Engineering*, 160. doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.106134

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2010. UNIT 833: *Agua potable-Requisitos*. Montevideo: UNIT.

Ji Won, P., Keun-Yeong P. Y. N., Sangjung, P., Sungpyo, K., Ji Hyang, K., & Sung Kyu M. (2019). Evaluation of Organic Migration and Biomass Formation on Polymeric Components in a Point-of-use Water Dispenser. *Water Research*, 165, 115025. doi.org/10.1016/j.watres.2019.115025.

Jiju, A. (2014). A Systematic Methodology for Design of Experiments. *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, pp. 33–50. doi:10.1016/b978-0-08-099417-8.00004-3

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00108

Kumar, N., Sinha, D.K. (2010). Drinking water quality management through correlation studies among various physicochemical parameters: A case study. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(2), pp. 253-259.

Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., & Vincent, V. (2002). Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp. 5318–5325. doi:10.1128/aem.68.11.5318-5325.2002

Lee, K., Yoon, S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(6), pp. 1053-1064. doi.org/10.4014/jmb.1611.11056

Li, D., & Liu, S. (2019). Water Quality Monitoring in Aquaculture. *Water Quality Monitoring and Management*, 12, pp. 303–328. doi:10.1016/b978-0-12-811330-1.00012-0

Li, H., Li, S., Tang, W., Yang, Y., Zhao, J., Xia, S., Zhang, W., Wang, H. (2018). Influence of Secondary Water Supply Systems on Microbial Community Structure and Opportunistic

Pathogen Gene Markers. *Water Research*, 136, pp. 160–168.
doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.031.

Li, H., Xin, H., & Li, S. F. Y. (2015). Multiplex PMA–qPCR Assay with Internal Amplification Control for Simultaneous Detection of Viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in Environmental Waters. *Environmental science & technology*, 49, pp. 14249–14256.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J., Faucher, S. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5, pp. 1-20.
doi: 10.3389/fmicb.2014.00258

Lin, T., Chen, W., & Wang, L. (2010). Particle properties in granular activated carbon filter during drinking water treatment. *Journal of Environmental Sciences*, 22(5), pp. 681–688.
doi:10.1016/s1001-0742(09)60163-7

Lin, W., Ye, C., Guo, L., Hu, D., Yu, X. (2020). Analysis of microbial contamination of household water purifiers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104, pp. 4533–4545
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10510-5>

Liu, L., Xing, X., Hu, C. & Wang, H. (2018). One-year Survey of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens and Free-living Amoebae in the Tap-water of one Northern City Of China. *Journal of Environmental Sciences*, 77, pp. 20-31. doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.020

Loret, J.F., Dumoutier, N. (2019). Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems: A review of prevalence data and control means. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. doi:10.1016/j.ijheh.2019.01.002

Louca, S., Doebeli, M., Parfrey, L.W. (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*. 6(41).
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>

Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J. & Li, M. (2019). Developing Natural Products as Potential Anti-biofilm Agents. *Chin. Med.*, 14(11).
doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2.

Luo, Y., Zhou, B., Van Haute, S., Nou, X., Zhang, B., Teng, Z., Turner, E.R., Wang, Q., Millner, P. D. (2018). Association between bacterial survival and free chlorine concentration during commercial fresh-cut produce wash operation. *Food Microbiology*, 70, pp. 120–128.
doi:10.1016/j.fm.2017.09.013

Maheux, F., Dion-Dupont, V., Bouchard, S., Bisson, M-A., Bergeron, M., Rodriguez M. Comparison of four β -glucuronidase and β -galactosidase based commercial culture methods

used to detect *Escherichia coli* and total coliforms in water. (2015). *Journal of Water and Health*, 13(2), pp. 340-352.

Milanese, A., Mende, D. R., Paoli, L., Salazar, G., Ruscheweyh, H. J., Cuenca, M., Hingamp, P., Alves, R., Costea, P. I., Coelho, L. P., Schmidt, T., Almeida, A., Mitchell, A. L., Finn, R. D., Huerta-Cepas, J., Bork, P., Zeller, G., & Sunagawa, S. (2019). Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nature communications*, 10(1), 1014. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08844-4>

Nășcuțiu, A.M. (2010). Viable non-culturable bacteria. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* 55(1), pp. 11-18.

Neogen Corporation. (2022). Colitag™ Water Solutions.

Norton, G. J., Williams, M., Falkinham, J. O., Honda, J. R. (2020). Physical Measures to Reduce Exposure to Tap Water–Associated Nontuberculous Mycobacteria. *Frontiers in Public Health*, 8. doi:10.3389/fpubh.2020.00190

Nriagu, J., Xi, C., Siddique, A., Vincent, A., & Shomar, B. (2018). Influence of Household Water Filters on Bacteria Growth and Trace Metals in Tap Water of Doha, Qatar. *Scientific Reports*, 8(1). doi.org/10.1038/s41598-018-26529-8.

Obras Sanitarias del Estado. (2020). *Tratamientos*. Recuperado de: <http://www.ose.com.uy/saneamiento/tratamientos>

Omer, N. (2019) Water Quality Parameters. Water Quality - Science, Assessments and Policy. *IntechOpen*. doi.org/10.5772/intechopen.89657

Organización de las Naciones Unidas. (2010). *El Derecho Humano al Agua y al Saneamiento*. Recuperado de: https://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/human_right_to_water.shtml

Park, J. W., Park, K.-Y., Na, Y., Park, S., Kim, S., Kweon, J. H., & Maeng, S. K. (2019). Evaluation of Organic Migration and Biomass Formation on Polymeric Components in a point-of-use Water Dispenser. *Water Research*, 115025. doi:10.1016/j.watres.2019.115025

Percival, S. L., Williams, D. W., Gray, N. F., Yates, M. V. & Chalmers, R. M. (2014), *Microbiology of Waterborne Diseases*. Great Britain, Elsevier.

Public Health England. (2015). Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. *UK Standards for Microbiology Investigations*. ID 17 Issue 3. Disponible en: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-andconsistency-in-clinical-laboratories>

Ramírez-Castillo, F., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, L. (2015). Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, 4, pp. 308-335.

Reinoso, R.F., Sabio M.M. (2002). El carbón activado en procesos de descontaminación. Departamento de Química Inorgánica. Universidad de Alicante. España. Disponible en: <http://elaguapotable.com/EI%20carbon%20activo%20en%20procesos%20de%20descontaminacion.pdf>

Rivera-Utrilla J., Bautista-Toledo, I., Ferro-García, M. & Moreno-Castilla, C. (2001). Activated Carbon Surface Modifications by Adsorption of Bacteria and Their Effect on Aqueous Lead Adsorption. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, pp. 1209-1215. 10.1002/jctb.506

Rodgers, M. R., Blackstone, B. J., Reyes, A. L., Covert, T. C. (1999). Colonisation of point of use water filters by silver resistant non- tuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Pathology*, 52(8), pp. 629a–629a. doi:10.1136/jcp.52.8.629a

Rodney M. Donlan (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9) pp. 881-890.

Ryan, K., George, C., Ahmad, N., Lawrence, W. & Plorde, J. (2011), *Sherris: Microbiología Médica*, México D.F., McGraw Hill.

Salvà-Serra, F., Gomila, M., Svensson-Stadler, L., Busquets A., Jaén-Luchoro, D., Karlsson R., Moore, E.R.B. (2018). A protocol for extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Marmur procedure. *Protocol Exchange Nature protocols*. <https://doi.org/10.1038/protex.2018.084>

Selvamuthu D. & Das D., (2018), Introduction to Statistical Methods, Design of Experiments and Statistical Quality Control. Springer.

Singh, A. K., Das, S., Singh, S., Pradhan, N., Gajamer, V. R., Kumar, S., Lepcha, Y.D., Tiwari, H. K. (2019). Physicochemical Parameters and Alarming Coliform Count of the Potable Water of Eastern Himalayan State Sikkim: An Indication of Severe Fecal Contamination and Immediate Health Risk. *Frontiers in Public Health*, 7. doi:10.3389/fpubh.2019.00174

Slavik, I., Oliveira, K., Cheung, P., & Uhl, W. (2020). Water quality aspects related to domestic drinking water storage tanks and consideration in current standards and guidelines throughout the world– a review. *Journal of Water and Health*, 18(4), pp. 439-463.

So, K. Y. K., Fong, J. J., Lam, I. P. Y., & Dudgeon, D. (2020). Pitfalls during in silico prediction of primer specificity for eDNA surveillance. *Ecosphere*, 11(7), pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3193>

Su, F., Luo M., Zhang F., Li P., Lou K., & Xing, X. (2009). Performance of Microbiological Control by a Point-of-use Filter System for Drinking Water Purification. *Journal of Environmental Sciences*, 21 pp. 1237–1246.

Thermo Fisher Scientific. What is multiplex qPCR? Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-multiplex-qpcr.html>

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), pp. 145–154. doi:10.1002/bmb.20461

Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm, M., Rozen S.G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15):e115. [10.1093/nar/gks596](https://doi.org/10.1093/nar/gks596)

Uruguay. (2011, marzo). Decreto n° 110/2011. Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional. Recuperado de: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/110-2011>

Uruguay. (2011, noviembre). Decreto n° 375/2011. Sustitúyese el Capítulo 25 del Reglamento Bromatológico Nacional, Sección 1 - Aguas, aprobado por Decreto 315/994. Recuperado de: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/375-2011>

Velten, S., Boller, M., Köster, O., Helbing, J., Weilenmann, H.-U., Hammes, F. (2011). Development of biomass in a drinking water granular active carbon (GAC) filter. *Water Research*, 45(19), pp. 6347–6354. doi:10.1016/j.watres.2011.09.017

Vaerewijck, M., Huys, G., Palomino, J., Swings, J., Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp. 911–934. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.02.001>

van der Wielen, P. W. J. J. & van der Kooij, D. (2013). Nontuberculous Mycobacteria, Fungi, and Opportunistic Pathogens in Unchlorinated Drinking Water in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3).

van der Wielen, P. W. J. J. & Lut, M. C. (2016). Distribution of Microbial Activity and Specific Microorganisms Across Sediment Size Fractions and Pipe Wall Biofilm in a Drinking Water Distribution System. *Water Science & Technology: Water Supply*, 16(4). doi.org/10.2166/ws.2016.023

Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, 8(2), e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923

Waak, M., LaPara, T. M., Halle, C., Hozalski, R. M. (2019). Non-tuberculous mycobacteria in two drinking water distribution systems and the role of residual disinfection. *Environmental Science & Technology*. doi:10.1021/acs.est.9b01945

Wang, H., Pryor, M. A., Edwards, M. A., Falkinham, J. O., & Pruden, A. (2013). Effect of GAC pre-treatment and disinfectant on microbial community structure and opportunistic pathogen occurrence. *Water Research*, 47(15), pp. 5760–5772. doi:10.1016/j.watres.2013.06.052

Water Quality Association. GRANULAR ACTIVATED CARBON (GAC). [Fact sheet] (2013). Disponible en:
https://www.wqa.org/Portals/0/Technical/Technical%20Fact%20Sheets/2016_GAC.pdf

Wen, X., Chen, F., Lin, Y., Zhu, H., Yuan, F., Kuang, D., Jia, Z., Yuan, Z. (2020). Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality—A Review. *Sustainability*, 12(6), 2249. doi:10.3390/su12062249

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), pp. 221-271.

World Health Organization. (2011) *Guidelines for drinking-water quality*. Recuperado de:
https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_ch07.pdf?ua=1

Ziadat, A.H. (2013). Impact of Storage Tanks on Drinking Water Quality in Al-Karak Province-Jordan. *Journal of Applied Sciences*. 5(4), pp. 634-638.

Zimniak, L., Dayn, A., & Iglewski, B. H. (1989). Identification of RegA protein from *Pseudomonas aeruginosa* using anti-RegA antibody. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(3), 1312–1318. doi: 10.1016/0006-291x(89)91121-2