

# Evaluación de la eficacia del tratamiento UV para la desinfección del agua potable frente a protozoos mediante técnicas de IMS-IFA y Metagenómica.

Soler P<sup>1\*</sup>, Quintanilla S.<sup>1</sup>, Moreno Y<sup>2</sup>, Moreno L<sup>2</sup>, Macián J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Calidad Agua Potable. ETAP La Presa. Emivasa. Ctra. Quart-Domeño km7, desvío derecha. 46540 Manises (Valencia).

<sup>2</sup> Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA). Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia

<sup>3</sup> Dirección operaciones Emivasa. Pedrapiquers, 4. 46014. Valencia.

\*[psoler@globalomnium.com](mailto:psoler@globalomnium.com)

El control del proceso de tratamiento del agua potable es necesario debido a la contaminación del agua y a la capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de algunos protozoos patógenos. La desinfección físico-química y con cloro no es a veces eficaz para eliminar protozoos patógenos. Sin embargo, la radiación UV ha demostrado ser más eficaz que el cloro. El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de protozoos patógenos mediante técnicas moleculares (inmunofluorescencia y metagenómica 18S rDNA) para establecer la eficacia del tratamiento de agua potable. El estudio se llevó a cabo en la Estación de Tratamiento de Agua Potable de La Presa (Manises, Valencia) que aplica una dosis de desinfección UV final de 420 mJ/cm<sup>2</sup>. Un total de 100 litros de agua bruta y 400 litros de agua antes y después de la desinfección fueron filtrados y evaluados para la identificación de protozoos patógenos. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento UV es efectivo frente a los protozoos patógenos, indicando que este tratamiento debería ser un paso necesario en el proceso de tratamiento del agua.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*; *Giardia*; desinfección UV; IMS-IFA; Metagenómica; Protozoos patógenos.

## 1. Introducción

La contaminación del agua bruta junto con la capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de algunos protozoos patógenos, tales como *Cryptosporidium* y *Giardia* entre otros, hace necesario controlar el proceso de tratamiento de agua potable para eliminar estos patógenos del sistema de abastecimiento de agua. *Cryptosporidium* y *Giardia* pueden ser transmitidos de hospedadores no humanos a hospedadores humanos (Zoonosis) y viceversa, aumentando notablemente el número de ooquistes y quistes en el agua (Smith, 2007). Otros protozoos patógenos, como las amebas de vida libre *Acanthamoeba castellanii* o *Naegleria fowleri*, son microorganismos mundialmente distribuidos y transmitidos por el agua (Visvesvara GS, 2007) que potencialmente puede causar infecciones en el hombre y en los animales (Schuster FL, 2004).

Actualmente, aunque la legislación ambiental de la unión europea, declara que el agua destinada al consumo humano no debería contener organismos patógenos (Consejo la Directiva 98/83/EC), en España, no hay ninguna regulación específica en cuanto a los límites máximos admisibles de protozoos patógenos en el agua potable. Los procesos físico-químicos y la desinfección con cloro aplicados al agua tratada en plantas de tratamiento de agua potable (DWTP) no son a veces, suficientemente eficaces para eliminar ooquistes/quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, y otras células de otros protozoos patógenos. Sin embargo, la radiación UV ha demostrado ser más eficaz que el cloro (Hijnen WAM, 2006). La aplicación de la desinfección con radiación UV como un proceso de desinfección primario llegó a América y Europa después del descubrimiento de la alta eficacia de irradiación UV contra *Cryptosporidium* (Clancy JL, 1998) y *Giardia* (Craik SA, 2000).

Por tanto, la infectividad de estos patógenos se reduce considerablemente por la irradiación con lámparas UV que fácilmente pueden ser instaladas en el tratamiento de agua potable. Actualmente, la radiación UV es altamente efectiva contra todos los patógenos, bacterias, protozoos y virus que pueden ser transmitidos por el agua potable (Hijnen WAM, 2006). Teniendo en cuenta la baja abundancia de protozoos patógenos, sobre todo en el agua potable, para el tratamiento de grandes volúmenes de agua, se deben usar técnicas sensibles para poder caracterizarla. Es sabido, que las técnicas moleculares benefician a la industria del agua y a la salud pública ya que son métodos más sensibles y específicos que los métodos convencionales que se basan en la observación microscópica y en la tinción. (Fletcher SM, 2012).

La introducción de técnicas moleculares, en particular, aquellas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, ha facilitado a los investigadores, herramientas sumamente sensibles y específicas para la detección y la cuantificación de protozoos.

El uso de los datos generados mediante secuenciación masiva " Next Generation sequencing (NGS) o metagenomics", es ahora una herramienta común en muchos campos de investigación biológica para el estudio de comunidades microbianas (Hino A, 2016). El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de protozoos patógenos mediante técnicas moleculares (metagenómica dirigida del 18S rDNA e inmunofluorescencia) para establecer la eficacia del tratamiento de agua en una planta de tratamiento de agua potable localizada en Valencia, España, que aplica una dosis de desinfección UV final de 420 mJ/cm<sup>2</sup>.

## 2. Materiales y Métodos

Un total de 100 litros de agua bruta y 400 litros de agua antes y después del tratamiento de desinfección con UV en la planta de tratamiento de agua potable fueron recogidos en garrafas de 25 l en condiciones estériles y se procesaron antes de pasar 24 horas desde la recepción. Las muestras fueron tomadas en cuatro muestreos diferentes, dando lugar a un total de 11 muestras (Tabla 1).

**Tabla 1** Número de muestras de agua analizadas en este estudio.

MUESTREO	MUESTRA	PUNTOS DE MUESTREO
1	1	Agua bruta
	2	Antes tratamiento UV
	3	Después tratamiento UV
2	4	Agua bruta
	5	Antes tratamiento UV
	6	Después tratamiento UV
3	7	Agua bruta
	8	Antes tratamiento UV
	9	Después tratamiento UV
4	10	Antes tratamiento UV
	11	Después tratamiento UV

Tras la toma de muestra, las muestras fueron filtradas a través de cápsulas Envirochek® HV cápsulas (De 1µ de tamaño de poro) (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA.) con flujo continuo de 2 litros/minuto, siguiendo el procedimiento descrito en el Método 1623.1 de la Agencia de Protección de medio ambiente estadounidense (EPA) (USEPA,2012). Los filtros fueron pretratados usando 150 ml de hexametaphosphato de sodio al 5%. Las cápsulas se llenaron con 250 ml de buffer de elución, y se colocaron en un agitador para eluir los protozoos retenidos en el cartucho. La muestra eluida fue concentrada por centrifugación a 1800 g durante 15 minutos.

El sedimento se dividió en dos alícuotas iguales: una para la identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* por inmunofluorescencia y otra para la identificación de protozoos patógenos por metagenómica de secuenciación dirigida 18S rDNA.

La identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* fue realizada por el método 1623.1 (USEPA,2012). A continuación, una alícuota se diluyó en 10 ml de agua destilada en un tubo Leighton y se realizó la separación inmunomagnética (IMS) usando el equipo comercial Dynabeads® GC-combo (IDEXX, Westbrook, ME) según las instrucciones del fabricante. El concentrado final de cada muestra fue fijado y secado en un porta y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras pasar 24h se aplica a la muestra fijada el kit de tinción EasyStain™ (BTF, Sydney, Australia) que usa anticuerpos monoclonales (MAb) con fluoresceína isothiocianato (FITC) para poder observar las estructuras de los quistes/ooquistes. Se examinaron a 600x con el microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop, Goettingen, Alemania) con filtro azul (excitación, 480 nm; emisión, 520 nm)

Para la identificación de protozoos patógenos el ADN fue extraído usando el sistema FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) con una homogeneización previa usando el equipo FastPrep-24® según las instrucciones del fabricante y finalmente se eluye el ADN en 50 µl del buffer de elución. La concentración de ADN fue cuantificada usando el equipo Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, CA, EE.UU.) y Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA. EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La pureza del ADN fue determinada usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Científico, Wilmington, DE, EE.UU.).La región V4 del gen 18S rDNA se amplificó en todas las muestras con los iniciadores EUKAF 5' -GCCGCGGTAATTCCAGCTC-3' y EUKA21R 5' -CYTTCGYCTTGATTRA-3' siguiendo los protocolos Illumina, pero usando la enzima KAPA Hifi HotStart con el buffer GC descrito por Moreno et al., (Moreno Y, 2017).

Las librerías de amplicones se prepararon y secuenciaron en una plataforma MiSeq siguiendo el protocolo paired-end (2 x 300 pb) en el servicio de secuenciación FISABIO (Valencia, España). Una vez obtenidas las secuencias brutas, estas se procesaron bioinformáticamente mediante la plataforma de acceso libre, QIIME 1.9.1 (Caporaso et al, 2010) aplicando comandos adicionales disponibles en la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau et al, 2017). (<http://qiime.org>). Las secuencias quiméricas se eliminaron y las restantes se procesaron y se agruparon "de novo" en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) al 97% de similaridad. La signación taxonómica se realizó usando la base de datos ribosomal de protistas PR2 v. 4.5. (Gillou L,2013).

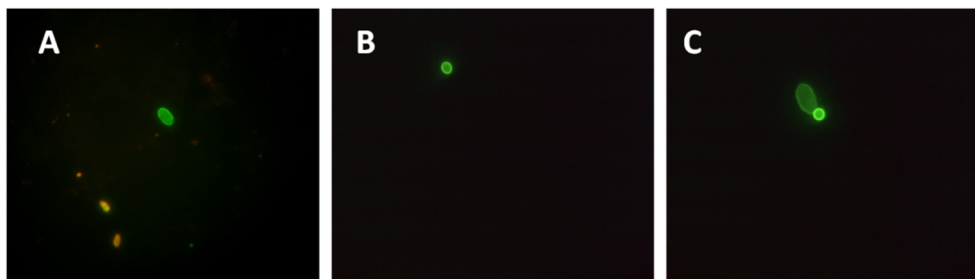
### 3. Resultados y Discusión

La identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* por IMS-IFA se realizó visualizando las muestras fijadas bajo el microscopio de epifluorescencia. Esta técnica es capaz de identificar los géneros, pero no la especie (USEPA,2012). Además, no se puede determinar la viabilidad o infectividad de los ooquistes/quistes (USEPA,2012). Los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* muestran una fluorescencia verde brillante bajo el microscopio de epifluorescencia. *Giardia* y tienen un tamaño típico de 8 a 18  $\mu$  m de largo y de 5 a 15  $\mu$  m de ancho con forma ovalada o redonda (USEPA, 2012). *Cryptosporidium* tiene un tamaño de 4 a 6  $\mu$  m de largo y tiene forma redonda u ovalada (USEPA, 2012).

Los ensayos realizados por IMS-IFA dieron resultados positivos para *Giardia* tanto en muestras de agua bruta (muestras 1,4 y 7) y resultados positivos para *Cryptosporidium* en dos muestras de agua bruta (4 y 10). Las muestras recogidas antes y después del tratamiento de UV (muestras 2, 3, 5 ,6,8,9, 10 y 11) dieron resultados negativos. Se filtraron 100 litros de agua bruta y los concentrados fueron divididos en dos partes iguales, por eso los resultados están expresados en 50 litros. La figura 1A muestra un quiste *Giardia* de la muestra 1, la figura 1B muestra un *Cryptosporidium* de la muestra 4 y la figura 1C muestra un quiste *Giardia* y un ooquiste de *Cryptosporidium* en la muestra 7.

**Tabla 2** Identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* por el método 1623.1 IMS-IFA.

MUESTREO	MUESTRA	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
1	1	14quistes/50L	-
	2	-	-
	3	-	-
2	4	5 quistes/50L	3 ooquistes/50L
	5	-	-
	6	-	-
3	7	6 quistes/50L	1 ooquiste/50L
	8	-	-
	9	-	-
4	10	1quiste/50L	-
	11	-	-



**Fig. 1** Identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* por IMS-IFA. A: Quiste *Giardia*; B: Ooquiste *Cryptosporidium*; C: Quiste de *Giardia* y ooquiste de *Cryptosporidium* t.

En los muestreos 1,2 y 3 fueron detectados los quistes de *Giardia* en el agua bruta en concentraciones más altas que los ooquistes de *Cryptosporidium*, esto podría deberse a la baja prevalencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* si se compara con estudios recientes de España y otros países (Navarro-i-Martínez, 2011; Carmena D,2010; Nasser AM, 2012) en aguas fecales contaminadas y en el agua de río (Carmena D, 2006).

Para la identificación de protozoos patógenos mediante metagenómica, se cuantificó la pureza y la concentración del ADN extraído. La concentración de ADN estaba comprendida entre valores de 0.52 a 1,060 ng /  $\mu$  l. Las concentraciones de ADN más bajas fueron encontradas en las muestras de antes y después del tratamiento UV, y así, las cantidades más altas de ADN en muestras de agua bruta. Esto es un hecho razonable, ya que el agua bruta tiene mayor cantidad de microorganismos que el agua en el proceso de tratamiento.

La pureza de ADN fue evaluada por la relación entre las absorbancias 260/280 y valores comprendidos entre 1.73 a 2.49, obteniendo un valor medio de 1.94, que mostró que el ADN era de buena calidad.

Después de la secuenciación masiva de los amplicones del 18S rDNA obtenidos, se identificaron un total de 73,756 secuencias brutas en las muestras. Después de la eliminación de quimeras, se comprobó la ausencia de las mismas, con lo cual todas las secuencias obtenidas resultaron óptimas. Todas estas secuencias, se agruparon en 22,358 OTUs o

secuencias distintas las cuales, fueron asignadas a diferentes niveles taxonómicos. Los patógenos identificados, se clasificaron en 4 grupos filogenéticos (Tabla 3). Estos grupos representan el 1.635% del total de la población de protozoos secuenciada, no siendo todos ellos patógenos. Los porcentajes en los que encontramos estos protozoos, evidencian la importancia de analizar volúmenes grandes de agua para poder realizar una detección eficaz.

**Tabla 3** Abundancia relativa de protozoos patógenos a nivel de Phylum identificados en muestras de agua.

REINO	PHYLUM	Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)	Muestra 3 (%)	Muestra 4 (%)	Muestra 5 (%)	Muestra 6 (%)
Eukaryota	Stramenopiles	0.893	0.108	0	4.129	0.628	0
Eukaryota	Alveolata	1.765	0.228	0.008	0.259	0.323	0.182
Eukaryota	Excavata	0.626	0.048	0.129	0.103	0.037	0.067
Eukaryota	Amoebozoa	0.062	0	0.065	0.083	0	0.067
Eukaryota	Other	96.654	99.615	99.798	95.426	99.012	99.684

REINO	PHYLUM	Muestra 7 (%)	Muestra 8 (%)	Muestra 9 (%)	Muestra 10 (%)	Muestra 11 (%)	Media (%)
Eukaryota	Stramenopiles	17.414	5.204	0.899	0.540	16.223	7.162
Eukaryota	Alveolata	1.251	1.854	3.822	1.039	0.354	1.946
Eukaryota	Excavata	0.342	0.001	0.001	0	0.010	0.000
Eukaryota	Amoebozoa	0.732	1.947	4.674	1.834	1.768	1.704
Eukaryota	Other	80.261	90.994	90.604	96.587	81.645	93.661

Se identificaron diferentes géneros y especies, tal y como se muestra en la tabla 4. Se detectaron en el agua bruta y antes del tratamiento UV, *Giardia* sp. y *Giardia intestinalis* en el muestreo 2 (Tabla 4) lo que indica que el tratamiento UV aplicado era eficaz en la eliminación de este patógeno a lo largo del proceso de tratamiento de agua potable. Diferentes amebas de vida libre (FLA), *Entamoeba coli*, miembros de la familia *Hartmannellidae* *Naegleria* spp. y *Naegleria clarki* también se identificaron en el agua bruta. *Entamoeba coli* ha sido identificado en la Muestra 1 y *Naegleria* en las muestras 1,4,7. Se identificó *Naegleria clarki* en las muestras 1 y 7 y los miembros de la familia *Hartmannellidae* en la muestra 4. Ninguno de ellos se detectó tras el tratamiento UV. *Cryptosporidium* no fue detectado.

**Tabla 4** Identificación de protozoos patógenos por secuenciación dirigida 18S rDNA.

MUESTREO	MUESTRA	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Naegleria clarki</i>	Hartmannellidae
1	1	0.010%	-	-	0.606%	0.021%	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
2	4	-	0.010%	-	0.041%	-	0.010%
	5	-	-	0.037%	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
3	7	-	-	-	0.254%	0.072%	-
	8	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
4	10	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-

*Cryptosporidium* spp fue identificado por IMS-IFA, pero no por metagenómica 18S rDNA, esto podría ser debido a que los ooquistes de *Cryptosporidium* estuvieran vacíos, ya que no se observaron las estructuras internas por DAPI. Los iniciadores usados en el estudio fueron diseñados y usados previamente en muestras de agua (Moreno Y, 2017), mostrando una cobertura teórica de *Cryptosporidium* y *Giardia* del 94.2% y 90.9%, respectivamente en ensayos con muestras positivas. Además, los mismos autores (Moreno Y,2017) también compararon la identificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* tanto por métodos IMS-IFA como por metagenómica 18S rDNA en muestras de agua. Ellos también encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* por el método IMS-IFA, pero no obtuvieron resultados positivos mediante metagenómica de secuenciación dirigida del gen18S rDNA en muestras de agua, como ha pasado también en este estudio.

Como conclusión indicar que el tratamiento de desinfección con lámparas UV es eficaz en la eliminación de protozoos patógenos y por tanto, este tratamiento es necesario en el proceso de tratamiento del agua potable.

## Referencias

- Carmena D. (2010) Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. In: Méndez-Vilas A editors. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Microbiology Series Vol. 2. Badajoz, Spain: Formatex Research Center., p. 3-14.
- Carmena D., Aguinagalde X., Zigorraga C., Fernández-Crespo JC. and Ocio JA. (2006) Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology.*, 102:619-629.
- Clancy JL, Hargy TM, Marshall MM. and Dyksen JE. (1998) UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of American Water Works Association.*, 90:92-102.
- Craik SA, Finch GR, Bolton JR. and Belosevic M. (2000) Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. *Water Research.*, 34:4325-4332.
- Fletcher SM., Stark D., Harkness J. and Ellis J. (2012) Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology.* 2012; 25:420-429.
- Gillou L., Bachar D., Audic S., Bass D., Berney C., Bittner L. and Boutte C. (2013) The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research.*, 91:4258-4272.
- Hino A., Maruyama H. and Kikuchi T. (2016) A novel method to assess the biodiversity of parasites using 18S rDNA Illumina sequencing: parasitome analysis method. *Parasitology International.*, 65:572-575.
- Hijnen WAM, Beerendonk EF. and Medema GJ. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research.*; 40:3-22.
- Moreno Y., Moreno-Mesonero L., Amorós I., Pérez R., Morillo JA. and Alonso JL. (2017) Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.008.
- Nasser AM., Vaizel-Ohayon D., Aharoni A. and Revhun M. (2012) Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology.*, 113:477-484.
- Nasser AM. (2016) Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. *Journal of Water and Health.*, 14:1-13.
- Navarro-i-Martínez L, Del Águila C. and Bornay-Llinares FJ. (2011) *Cryptosporidium*: a genus in revisión. The situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*, 29:135-143.
- Schuster FL. and Visvesvara GS. (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology.*, 34:1001-1027.
- Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology.*, 149:29-40.
- USEPA. (2012) Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA 816-R-12-001.
- Visvesvara GS, Moura H and Schuster FL. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.*, 50:1-26.