

Trabajo Fin de Grado

Desinfección de aguas para la eliminación de amebas de vida libre y bacterias endosimbióticas.

Water disinfection for the elimination of free-living amoebas and endosymbiotic bacteria.

Autor/es

María Soler Vallés

Director/es

Carmen Menacho Miralles
María Peña Ormad Melero

Grado en Ingeniería Química
Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2023

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

AGRADECIMIENTOS

*A Carmen Menacho y María Peña Ormad, mis tutoras,
por ser unas grandes profesionales y transmitirme
todo su conocimiento y esfuerzo en el desarrollo de mi trabajo.
A mis padres, mi hermana y Miguel
por la implicación, el apoyo y el cariño.
A toda mi familia, en especial
a mis abuelos, tíos y primos
por estar siempre ahí.
A mis amigos, por acompañarme y
haber hecho que estos años hayan sido increíbles.
Agradecer también al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del
Medioambiente.*

Abreviaturas.

- AVL: Ameba vida libre.
- ANN: Agar no nutritivo.
- PPYG: Proteosa Peptona Levadura y Glucosa (Protease Peptone, Yeast extract and Glucose)
- PAS: Solución salina de Neff's modificada
- UV: ultravioleta.
- UVA: ultravioleta A
- UVB: ultravioleta B
- POA: procesos de oxidación avanzada
- ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
- MPN: número más probable
- TK: Inactivación total (Total Kill)

Resumen: Las amebas son organismos microscópicos unicelulares que se alimentan de bacterias. Estas bacterias pueden ser portadoras de enfermedades perjudiciales para la salud humana. Estos microorganismos son capaces de resistir a los tratamientos convencionales de desinfección de aguas. Frecuentemente, estos microorganismos se encuentran en piscinas, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de refrigeración, fuentes... Se van a realizar diferentes tratamientos de desinfección de agua con el objetivo de estudiar la efectividad de diferentes desinfectantes en la supervivencia de las amebas y las bacterias que contienen. Se han utilizado para este estudio como desinfectantes el cloro, la radiación solar a diferentes longitudes de onda y la combinación de ambos mediante un proceso de oxidación avanzada. Así mismo, también se han utilizado diferentes cepas de amebas a estudiar y las bacterias que estas contienen en su interior. Tras el estudio de los diferentes experimentos llevados a cabo, se ha determinado que una aplicación de los tratamientos de oxidación avanzada es mucho más efectiva que aplicar un tratamiento convencional, como es el cloro o la radiación ultravioleta. Estos tratamientos de oxidación avanzada, suponen una reducción en la cantidad de cloro que se necesita aplicar tanto para las amebas como para las bacterias si se compara con los tratamientos en los que solo se aplica desinfectante químico.

Abstract: *Amoebas are microscopic unicellular organisms that feed on bacteria. These bacteria can carry harmful diseases to human health. These microorganisms are capable of resisting conventional water disinfection treatments. Often, these microorganisms are found in swimming pools, drinking water distribution systems, refrigeration systems, fountains... Different water disinfection treatments are going to be carried out in order to study the effectiveness of different disinfectants on the survival of amoebas and the bacteria they contain. Chlorine, solar radiation at different wavelengths, and a combination of both through an advanced oxidation process have been used as disinfectants for this study. Different strains of amoebas and the bacteria they contain have also been used for study. After analyzing the different experiments carried out, it has been determined that the application of advanced oxidation treatments is much more effective than conventional treatments such as chlorine or ultraviolet radiation. These advanced oxidation treatments result in a reduction in the amount of chlorine needed to be applied for both amoebas and bacteria compared to treatments in which only chemical disinfectant is applied.*

Índice

1.	Introducción	1
2.	Fundamentos teóricos	3
2.1.	Características de las amebas de vida libre (AVL).....	3
2.2.	Interacción entre AVL y bacterias.....	3
2.3.	Tratamientos de desinfección	4
2.3.1.	Tratamientos convencionales	4
2.3.1.	Tratamiento de oxidación avanzada aplicado en el estudio.....	5
3.	Metodología.....	7
3.1.	Cepas de estudio	7
3.2.	Preparación de medios de cultivo	7
3.3.	Determinación de la concentración de amebas	8
3.3.1.	Determinación de la concentración de amebas mediante Hemocitómetro	8
3.3.2.	Determinación de la concentración de amebas mediante el método del Número más probable	8
3.3.3.	Validación del método	9
3.4.	Determinación cualitativa de bacterias	10
3.5.	Agentes aplicados	10
3.6.	Preparación del inóculo inicial.....	11
3.7.	Descripción de los experimentos llevados a cabo	11
3.7.1.	Hipoclorito de sodio.....	11
3.7.2.	Radiación solar, UVA.....	11
3.7.3.	Radiación solar, UVA + UVB	12
3.7.4.	Hipoclorito de sodio + radiación solar UVA	12
3.7.5.	Hipoclorito de sodio + radiación solar UVA + UVB	12
3.8.	Efectividad de los desinfectantes	12
4.	Resultados y discusión	14
4.1.	Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio	14
4.2.	Aplicación del tratamiento de radiación solar UVA (320-800 nm)	16
4.3.	Aplicación del tratamiento de radiación solar UVA + UVB (290-800 nm)	16
4.4.	Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio + radiación solar UVA	18
4.5.	Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio + UVA + UVB.....	20
5.	Conclusiones	23
6.	Bibliografía	24

1. Introducción

Las amebas de vida libre son microorganismos muy resistentes a los tratamientos convencionales de desinfección de agua, siendo capaces de sobrevivir a ellos. Así mismo, son capaces de transportar y proteger bacterias en su interior que pueden suponer un riesgo para la salud. La importancia de este trabajo radica en la necesidad de realizar estudios sobre la supervivencia de las amebas y de las bacterias que contienen aplicando diferentes tratamientos. Frecuentemente, estos microorganismos se encuentran en piscinas, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de refrigeración, fuentes... (Fernandez, 2014).

Uno de los tratamientos más comunes aplicados a la eliminación de amebas es el cloro. El principal problema de la aplicación de este tratamiento es que las amebas sobreviven a estos tratamientos y, por tanto, las bacterias que contienen también. Otro problema asociado a la aplicación de este tratamiento viene dado por la formación de compuesto organoclorados que son perjudiciales para la salud. La ventaja de este tratamiento es el cloro residual que queda tras realizar el tratamiento, que puede continuar con la acción desinfectante. Otro de los tratamientos comúnmente aplicado a las amebas es la aplicación de radiación ultravioleta (UV), el problema de este tratamiento viene dado por la falta de efecto residual.

Se está estudiando la eficacia de los desinfectantes de oxidación avanzada, que combinan un agente químico con radiación ultravioleta. Se ha observado que estos tratamientos son mucho más eficaces que los tratamientos convencionales para microrganismos resistentes como *Clostridium perfringens* (Lanao, 2012).

La importancia de este estudio, radica en el desconocimiento que hay acerca de la aplicación de los tratamientos de oxidación avanzada sobre la eliminación de amebas en las aguas. Así mismo, nunca se ha evaluado la eficacia de estos tratamientos en la supervivencia de las bacterias que contienen de forma natural en su interior.

Objetivo general: evaluar la eficacia de desinfectantes basados en cloro, UV y la combinación de ambas en la eliminación de amebas y de las bacterias que contienen en su interior.

Objetivos concretos:

- Puesta a punto de la técnica.
- Comparar dos cepas de *Acanthamoeba spp.* una de ellas aislada en una piscina y la otra aislada en un río, y de las bacterias que contienen en su interior.
- Comprobar la supervivencia de amebas y bacterias para diferentes concentraciones de cloro aplicadas.
- Comprobar la supervivencia de amebas y bacterias para diferentes longitudes de onda de radiación solar aplicada.
- Comprobar la supervivencia de amebas y bacterias para diferentes concentraciones de cloro aplicadas combinado con diferentes longitudes de onda de radiación solar.

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto Project TED2021-129267B-I00 / AEI/10.13039/501100011033/ Unión Europea NextGenerationEU/PRTR, financiado por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación de Referencia Agua y Salud Ambiental B43_20R) y cofinanciado con Feder 2014-2020 "Construyendo Europa desde Aragón".

Este estudio supone un avance a la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (Agenda 2030) en los siguientes ODS:

ODS 3: Garantizar una vida sana y promover el bienestar en todas las edades.

- 3.3 Para 2030, poner fin a las epidemias del SIDA, la tuberculosis, la malaria y las enfermedades tropicales desatendidas y combatir la hepatitis, las enfermedades transmitidas por el agua y otras enfermedades transmisibles.

ODS 6: Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos

- 6.3 De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial

ODS 9: Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización sostenible y fomentar la innovación.

- 9.5 Aumentar la investigación científica y mejorar la capacidad tecnológica de los sectores industriales de todos los países, en particular los países en desarrollo, entre otras cosas fomentando la innovación y aumentando considerablemente, de aquí a 2030, el número de personas que trabajan en investigación y desarrollo por millón de habitantes y los gastos de los sectores público y privado en investigación y desarrollo. (Organización de las Naciones Unidas, 2015)

Tras la introducción, en los fundamentos teóricos se a explicar las características de las amebas de vida libre y su interacción con las bacterias. Se explican los fundamentos de los diferentes tratamientos de utilizados en la realización del proyecto, tanto los tratamientos convencionales como los de oxidación avanzada. En la metodología, se presentas las cepas de amebas a estudiar y los medios donde se va a llevar a cabo el cultivo de las mismas. Así mismo, también se explican los diferentes métodos de determinación de las amebas, haciendo una validación del método, y la determinación cualitativa de las bacterias. Seguidamente se explican los agentes que se van a aplicar en los diferentes tratamientos. Por último, se lleva a cabo la descripción de la preparación del inóculo inicial, así como, la descripción de los experimentos llevados a cabo y la evaluación de su efectividad. En el apartado de resultados y discusión se analizan los experimentos realizados. Se concluye con un apartado de conclusiones al que le sigue una bibliografía.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Características de las amebas de vida libre (AVL)

El nombre de ameba viene de la antigua palabra griega amoibé, que significa “el cambio”, lo que hace referencia al aspecto cambiante de este microorganismo cuando se mueve (Lanao, 2012).

Las amebas son protistas y unicelulares, se caracterizan por tener una forma irregular que varía constantemente. Estos organismos comprenden un extenso grupo, con más de 15.000 especies descritas. Son capaces de vivir como parásitos o como microorganismos de vida libre, denominados así porque no necesitan de otro ser para vivir. Han sido descritos como parásitos oportunistas por su capacidad para producir enfermedades en el ser humano, especialmente en persona inmunodeprimidas. Los géneros que se asocian con la enfermedad humana son principalmente *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Sappinia diploidea* y *Vermamoeba vermiformis* (Visvesvara y col., 2020). Estos microorganismos pueden ser aislados en suelos, aire, mar, piscinas, lentes de contacto, equipos de diálisis, torres de refrigeración, entre otras procedencias. (Beattie y col., 2003)

Las amebas tienen dos estados de desarrollo, trofozoíto y quiste (*Figura 2.1*). El trofozoíto es el estado activo, el cual se alimenta de bacterias y se multiplica por fisión binaria. El trofozoito mide entre 15 y 35 µm (Belloc, 2016). El quiste es la forma inactiva de la ameba, suele tener dos capas: una externa o ectoquiste y otra interna o endoquiste, que mide entre 15 a 28 µm (Castrillón y col., 2013).

La forma quística de las AVL les confiere resistencia frente a condiciones adversas, como pueden ser los desinfectantes comunes (Fernandez, 2015). Las amebas pueden suponer un riesgo para la salud pública, ya que pueden superar los tratamientos convencionales de agua, permitiéndoles superar los procesos de depuración y potabilización de las aguas, pudiendo ya no solo habitar aguas naturales sino también colonizar los sistemas de agua artificiales.

2.2. Interacción entre AVL y bacterias

Las amebas se alimentan de bacterias (*Figura 2.2*), pero algunas son capaces de sobrevivir en su interior. Estas bacterias son las “Bacterias Resistentes a la Depredación de las Amebas” (Greub y col., 2004). Las bacterias pueden beneficiarse de esta asociación, ya que las amebas actúan como protector frente a condiciones desfavorables en el medio. Hay bacterias que pueden llegar a parasitar las amebas, multiplicándose en su interior y pudiendo lisar la ameba para salir de ella.

Esta protección que les ofrecen las amebas de vida libre a las bacterias les permite viajar a través de ríos, pantanos, plantas potabilizadoras y plantas de depuración, sin verse afectadas por condiciones climáticas extremas o tratamientos. Por lo tanto, cuando están presentes en el agua, pueden colonizar sistemas de refrigeración, de aire acondicionado, aguas potables o aguas de piscina. (Benito y col., 2018).



Figura 2. 1 Estados de desarrollo de las amebas.



Figura 2. 2 Amebas alimentándose de bacterias.

Si se observan los límites legales de indicadores microbiológicos que vienen regidos según el Real Decreto 3/2023, de 10 de enero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano se puede observar que las amebas no están contempladas en estos análisis, por lo que no son analizadas antes de su distribución. Lo mismo ocurre con los límites legales de indicadores microbiológicos que vienen regidos por el Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas, en el que tampoco aparece contemplada la necesidad de análisis de las amebas. Como las amebas son mucho más resistentes a los tratamientos de potabilización y desinfección que las bacterias que se utilizan como indicadores microbiológicos, esta falta de control puede suponer un problema para la salud pública ya que muchas de ellas portan agentes patógenos.

2.3. Tratamientos de desinfección

2.3.1. Tratamientos convencionales

El tratamiento de las aguas naturales para su desinfección se puede realizar por diversos métodos de tipo físico, mecánico o con agentes químicos. En España, la mayor parte de las estaciones de tratamiento de agua potable utilizan agentes químicos como desinfectante (Ocampo-Rodríguez y col., 2022). Estos deben de ser tóxicos para los microorganismos, pero no para el ser humano ni los animales. Además, deben de ser solubles en agua o en el tejido celular, tener buena estabilidad, no ser corrosivos ni colorantes, fácilmente manipulables, así como tener un precio asequible y ser fácilmente medibles y cuantificables en el agua (Lanao, 2012).

Cloro y derivados

El cloro se aplica como desinfectante en forma de cloro gas, hipoclorito sódico (comúnmente conocido como lejía) o hipoclorito cálcico. El hipoclorito sódico se disocia formando ácido hipocloroso, y a su vez este se disocia formando el ion hipoclorito según las reacciones químicas [1] y [2].



En función del pH, la presencia de sales y la temperatura, las sustancias se encuentran en una proporción variable. Se sabe que, si el pH es menor que 1, una parte importante se encontrará como cloro molecular, hasta pH de 8-9, predominará el ácido hipocloroso, habiendo desaparecido todo el cloro molecular. Por encima de esos valores, la especie más abundante será el ion hipoclorito. Así mismo, si el pH del agua está próximo a ser neutro, el cloro desarrollará su poder desinfectante y oxidante bajo la forma de ácido hipocloroso; esta es su forma con acción bactericida, ya que tiene un mayor potencial de oxidación del cloro y, por tanto, mayor poder desinfectante.

Si en el agua hay presencia de amoníaco, se formarán cloroaminas que también tienen acción desinfectante, aunque inferior a la del cloro.

Hoy en día, el hipoclorito sódico es el desinfectante más utilizado, por su amplio poder germicida, su poder residual en los sistemas de distribución de agua potable y su capacidad para ser fácilmente medible y controlable, además de su bajo coste. Como principal inconveniente se encuentra la generación de subproductos derivados de la desinfección que son potencialmente cancerígenos, entre estos subproductos destacan los trihalometanos, sustancias halogenadas volátiles entre las que se encuentran el bromodichlorometano, bromoformo, cloroformo y dibromoclorometano (Lanao, 2012).

Radiación solar.

La radiación solar es el conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol (*Figura 2.3*). El rango ultravioleta (UV) es el que presenta las mejores propiedades de desinfección. La radiación solar se utiliza hoy en día en la regeneración de aguas residuales ya que no genera organoclorados y es eficaz para eliminar patógenos (Blanco y col. 2009).

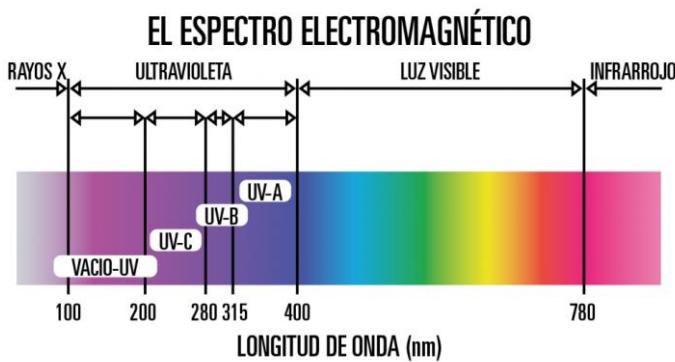


Figura 2. 3 Espectro de radiación solar (Henley-On-Thames, 2021)

El sistema de desinfección con luz ultravioleta (UV) transfiere energía electromagnética desde la lámpara al material genético del organismo (ADN o ARN). Cuando la radiación UV penetra en las paredes de la célula de un organismo, esta destruye la habilidad de reproducción de la célula.

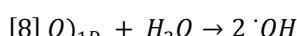
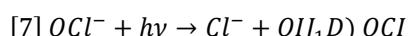
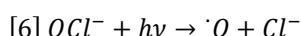
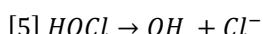
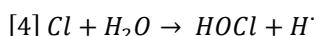
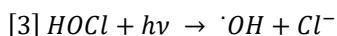
Una de las desventajas que planta esta tecnología es que, si la radiación ultravioleta no es suficiente, las células se dañarán, pero no se destruirán. Otra desventaja es que si hay otros compuestos químicos en suspensión en el agua pueden proteger a las bacterias de la radiación produciendo una dispersión de la luz. Esto permite que las células vuelvan a crecer una vez que el tratamiento ha cesado (Lanao 2012).

2.3.1. Tratamiento de oxidación avanzada aplicado en el estudio

Los procesos de oxidación avanzada (POAs) agrupan al conjunto de procesos que son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), aprovechando la alta reactividad del radical hidroxilo (OH^\cdot). Estas ROS son capaces de degradar los compuestos orgánicos más persistentes hasta que se mineralizan o por el contrario se forman compuestos que son mucho más biodegradables que los anteriores (Lanao, 2012).

Hay una gran variedad de POAs, pero a continuación se desarrolla el aplicado en el presente estudio.

El proceso de generación de especies reactivas de oxígeno, ocurre de la siguiente manera; la irradiación de UV sobre HOCl a λ inferiores a 400nm produce $\cdot\text{OH}$ y Cl^\cdot [3], Cl^\cdot puede reaccionar con agua para producir HOCl^- [4] que puede descomponerse para formar OH adicional [5]. A λ superiores a 320nm la irradiación de OCl^- produce $\cdot\text{O}$ [6] o átomos de oxígeno excitados [7]. El oxígeno excitado puede producir $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción con el agua [8]. Con estas longitudes de onda, OCl^- produce átomos de oxígeno en estado fundamental que reaccionan con O_2 para formar O_3 que tiene un alto poder desinfectante. [9]. (Remucal y col. 2016).



Algunas investigaciones han demostrado que aplicando estos tratamientos de oxidación avanzada, se puede mejorar la inactivación de los microorganismos, haciendo que aumente la velocidad de inactivación y disminuyendo la cantidad de desinfectante necesario para lograr una desinfección eficaz (Forsyh y col., 2022). Así mismo, estudios recientes confirmarían que, combinando la luz solar con los desinfectantes químicos convencionales, se puede impulsar la inactivación de material biológico altamente resistente (Burns., 2008).

3. Metodología

3.1. Cepas de estudio

Se utilizan dos cepas de amebas para realizar el estudio, P31 y C1-211, ambas pertenecientes al género de *Acanthamoeba* spp. En concreto:

- *Acanthamoeba* P-31 (*Figura 3.1*), ameba aislada de aguas recreativas, concretamente en una piscina de Zaragoza, "GenBank accession No. KY038362". (Ortillés y col., 2016; Ortillés y col., 2017).



Figura 3. 1 *Acanthamoeba* P-31



- *Acanthamoeba* C1-211 (*Figura 3.2*), aislada del río Noguera Ribagorzana en el municipio de Corbins (Lérida), "GenBank accession No. OQ927217".

Figura 3. 2 *Acanthamoeba* C1-211

Las bacterias que se utilizan en el estudio son las contenidas de forma natural por las amebas en su interior.

3.2. Preparación de medios de cultivo

Medios de cultivo para amebas

El medio utilizado para el crecimiento y conservación de las amebas es el Proteosa Peptona Levadura y Glucosa (PPYG). Su composición consiste en 20 g proteasa peptona, 5 g extracto levadura, 5 g glucosa, 50 ml Solución salina de Neff's modificada (PAS) y 950 ml de agua destilada. Para evitar la contaminación del medio, cada 5 mL de PPyG se suplementan con 25 µl ampicilina 50 mg/ml, 15 µl fungizona 10 mg/ml y 50 µl ceftriaxona 10 mg/ml (Belloc, 2016; Fernandez, 2015).

Para el análisis de la supervivencia de las AVL en los diferentes tratamientos aplicados, se utiliza un medio de cultivo sólido preparado en el laboratorio, ya que no existe uno comercial con las características que se necesitan.

Para prepararlo, se llevan a cabo cada una de las siguientes disoluciones:

- NaCl (PanreacApplichem, España. Pureza, 95%): 1,2 g/100ml
- MgSO₄·7H₂O (Panreac, España. Pureza, 98-102%): 0,04 g/100ml
- CaCl₂·6H₂O (Panreac, España. Pureza, 98-102%): 0,08 g/100ml
- Na₂HPO₄ (Panreac, España. Pureza, 98-102%): 1,42 g/100ml
- KH₂PO₄(Panreac, España. Pureza, 99%): 1,36 g/100ml

Con estas disoluciones, se toman 10 ml de cada una para preparar 1L de medio de cultivo, añadiendo a esto 15 g de agar bacteriológico (ANN) y agua ultrapura estéril hasta enrasar a 1L. El medio se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos para su posterior dispensación en placas de Petri. Una vez que las placas están solidificadas y en un entorno estéril, se procede a inocular 100µL de solución de *Escherichia coli*, previamente inactivada térmicamente, que sirve como alimento para las amebas. Cuando se finaliza el proceso y antes de guardar las placas para su posterior uso, se someten a radiación UV durante 20 minutos para asegurar su esterilidad. Conservándose posteriormente a 4°C en el frigorífico para su posterior uso.

Para preparar la solución de *Escherichia coli* inactivada, se siembra la bacteria en medio Mueller-Hinton y se deja crecer a 37°C de 24 a 48 horas. Una vez pasado el tiempo, se recogen las bacterias en suero fisiológico estéril (solución NaCl al 0,9%) y se calientan en un baño de agua durante 10 minutos a 100°C. Posteriormente, se conservan a -18°C para su uso posterior.

Medios de cultivo para bacterias

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de las bacterias, es Mueller-Hinton comercial (Mueller-Hinton agar Scharlau, España), y se prepara según las instrucciones del comercial, en este caso, disolviendo 38g del preparado en 1L de agua ultrapura y estéril. Una vez disuelto, se procede a una esterilización en autoclave a 120°C durante 15 minutos para su posterior dispensación en placas de Petri. Tras dispensar el medio en las placas se someten a radiación UV para asegurar su esterilidad. Conservándose posteriormente a 4°C en el frigorífico para su posterior uso.

3.3. Determinación de la concentración de amebas

3.3.1. Determinación de la concentración de amebas mediante Hemocitómetro

La cámara de recuento Neubauer o hemocitómetro (*Figura 3.3*) es un portaobjetos de precisión que se utiliza para contar células mediante el microscopio. Cada uno de los portaobjetos tiene dos cámaras de recuento. La muestra (10 µL) se aplica en el borde del cuore que entra por capilaridad llenando las cámaras. Cada cámara de recuento se divide en 9 zonas cuadradas de 1mm de lado cada una.



Figura 3. 3 Hemocitómetro

Se cuentan las amebas con un microscopio óptico (Microscopio ZEISS-Axiostar plus) (*Figura 3.4*) en los 4 cuadrantes de 1mm², si una vez analizada la muestra se ve una elevada concentración, se lleva a cabo el conteo en el cuadrante central. Se cuentan todos los quistes y trofozoítos que se encuentran dentro de los cuadrantes, sin saber las amebas que se encuentran están vivas o muertas. Los que se encuentran justo en las líneas de separación, no se recomienda tenerlos en cuenta.

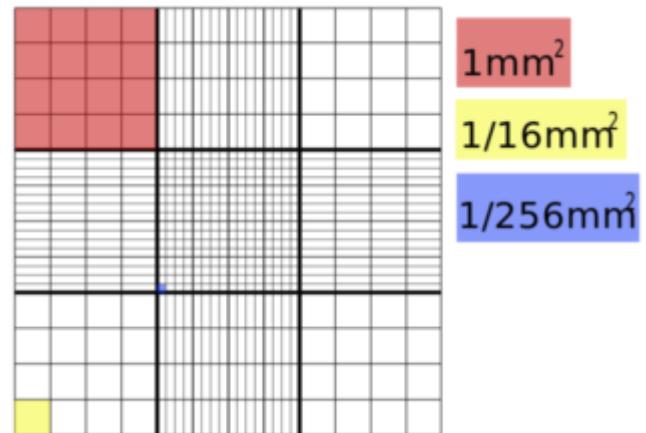


Figura 3. 4 Hemocitómetro. (Cultivo de células, 2021)

Se calcula la concentración de la siguiente manera:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Nº de células}}{\text{Nº de cuadrantes}} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4$$

Para calcular cual es la concentración de amebas vivas, se puede utilizar el azul de Trypan (Trypan blue solution, Sigma, Alemania). Este compuesto, es un colorante que solamente puede penetrar a través de las paredes que están dañadas y que, por tanto, se difunde sólo en el interior de células muertas. Así cuando se realiza el conteo, las que estén teñidas de azul se sabrá que están muertas y las que se vean sin teñir, se sabrá que están vivas (Herraez, 2023).

3.3.2. Determinación de la concentración de amebas mediante el método del Número más probable

El método del número más probable (*MPN, most probable number*), se utiliza para calcular la concentración de amebas únicamente vivas. Consiste en ir haciendo disoluciones consecutivas en las cuales cada una de ellas está diluida 1:10 con respecto a la anterior, obteniendo así tres disoluciones consecutivas de la muestra e inoculándolas cada una en una placa Petri diferente. La inoculación se realiza con cinco réplicas en placa con un volumen de muestra de 10µL. Se dejan las placas inoculadas un máximo

de 15 días en una estufa a 21°C. En estos 15 días se irá revisando diariamente con un microscopio óptico los puntos en los que se inocula la muestra para ver si hay amebas o no. Se señala como positiva en la que aparezca al menos un trofozoíto. También se contabiliza como positiva si se observa el “camino” de las amebas al ir alimentándose de bacterias. Así mismo, se cuenta como negativa en la que no se observe ningún trofozoíto o bien, encuentre algún quiste, que indica que la ameba no está en su forma activa. Con estos resultados se obtiene un número del 1 al 5 según el número de inoculaciones positivas que tenga la

Tabla 3. 1 Estimación de MPN de Acanthamoeba por mililitro de solución (Beatielle y col. 2003)

No. of positive aliquots from DE disinfectant neutralization broth ^c			MPN	Most probable range (95% CI) ^b	No. of positive aliquots from DE disinfectant neutralization broth ^c			MPN	Most probable range (95% CI)
1 ml	0.1 ml	0.01 ml			1 ml	0.1 ml	0.01 ml		
0	0	0	<1	<1	4	4	0	320	290–340
0	0	1	20	20	4	4	1	380	340–410
0	1	0	20	20	5	0	0	220	200–230
1	0	0	20	20	5	0	1	290	250–340
1	0	1	40	40	5	0	2	410	360–500
1	1	0	40	40	5	1	0	310	270–360
1	2	0	50	50	5	1	1	430	360–500
2	0	0	40	40	5	1	2	600	500–700
2	0	1	50	50	5	1	3	850	700–950
2	1	0	50	50	5	2	0	500	400–550
2	1	1	70	70	5	2	1	700	600–800
2	2	0	70	70–90	5	2	2	950	800–1,100
2	3	0	110	110	5	2	3	1,200	1,050–1,350
3	0	0	70	70	5	3	0	750	650–900
3	0	1	90	90	5	3	1	1,100	900–1,250
3	1	0	90	90	5	3	2	1,400	1,200–1,600
3	1	1	130	130	5	3	3	1,750	1,550–2,000
3	2	0	130	130	5	3	4	2,100	1,850–2,400
3	2	1	160	140–160	5	4	0	1,300	1,100–1,500
3	3	0	160	140–160	5	4	1	1,700	1,500–2,000
4	0	0	110	110–130	5	4	2	2,200	1,900–2,500
4	0	1	140	140–160	5	4	3	2,800	2,400–3,200
4	1	0	160	140–160	5	4	4	3,450	3,000–3,900
4	1	1	200	180–200	5	5	0	2,400	2,000–2,800
4	2	0	200	180–220	5	5	1	3,500	2,900–4,200
4	2	1	250	230–270	5	5	2	5,400	4,500–6,600
4	3	0	250	230–270	5	5	3	9,100	7,500–11,000
4	3	1	310	290–340	5	5	4	16,000	13,500–19,000
					5	5	5	>16,000	>18,000

placa. Con estos números del 1 al 5 y con las tres disoluciones obtenidas por muestra, se crea un código de tres dígitos que se analiza mediante la *Tabla 3.1*. Esta tabla permite estimar el rango más probable de amebas que hay en la muestra (Tillett, 1987; Beatielle y col., 2003).

3.3.3. Validación del método

Para calcular cual es la concentración de amebas en una muestra, no existe un método normalizado, por lo que se va estudiar cual es la relación entre los métodos descritos en el apartado 3.3.1 y 3.3.2.

Para ver la correlación entre los métodos del Número más probable y el recuento en el hemocitómetro, se preparan diferentes soluciones de amebas y se la concentración de amebas de muestras mediante ambos métodos, para después comparar los valores obtenidos. Esto nos permite realizar una regresión lineal (*Figura 3.5*) en la que se puede ver cuál es la correlación que existe entre los dos métodos utilizados. La técnica del hemocitómetro tiene un límite de detección de $2,5 \times 10^3$ células/mL. Se quiere estudiar la inactivación de las amebas y se considera que una desinfección eficaz es la que logra al

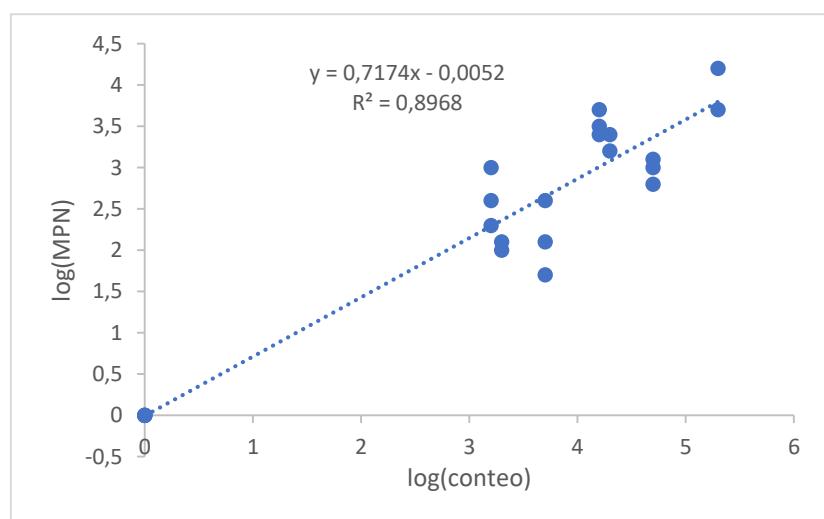


Figura 3. 5 Representación Log(MPN) vs Log(conteo)

menos 3 reducciones logarítmicas, se necesitaría al menos una concentración inicial de 2×10^6 células/mL de concentración inicial en los experimentos. Para obtener esas concentraciones se necesita realizar los cultivos en un medio líquido, por lo que necesitaría mucho más tiempo ya que la velocidad de crecimiento de las AVL es mucho menor en medio líquido que en sólido. Esto lleva a que la concentración inicial que se quiere usar es menor a 10^4 y por tanto no se puede usar la técnica del hemocitómetro. Por lo que se ha decidido usar la técnica del MPN.

Para conocer el error del método que se va a utilizar en este estudio, el método del MPN. Se realizan 5 réplicas diferentes según el método descrito en el apartado 3.3.2, para diferentes concentraciones. Una vez que se tienen los resultados, se calcula la desviación que hay entre los datos de una misma concentración, determinando que los resultados de los diferentes experimentos tienen un error de $\pm 0,89$.

3.4. Determinación cualitativa de bacterias

Para analizar la efectividad de los tratamientos llevados a cabo sobre las bacterias del interior de las amebas, se inoculan en una placa con Mueller-Hinton cinco réplicas de 100 μL de las muestras tomadas para cada uno de los experimentos, incubándolas durante 24-48 horas a 37°C. Una vez ha pasado el tiempo, se comparan con el control. Viendo cómo afecta el tratamiento a la reducción del número de colonias y observando si ha habido inactivación total TK (Total Kill). Se expresan los resultados mediante un código de colores que representa tres categorías de supervivencia cualitativas: no afectadas representadas en verde, al compararlas con el control se obtiene el mismo crecimiento, afectadas representadas en naranja, si se obtiene crecimiento pero al compararlas con el control es mucho menor e inactivadas completamente (TK) representadas en rojo, si no hay crecimiento (*Tabla 3.2*).

Tabla 3. 2 Código de colores para bacterias.

	No afectada
	Afectada
	Inactivada

3.5. Agentes aplicados

Hipoclorito de sodio

Para llevar a cabo los experimentos, se utiliza hipoclorito de sodio, un reactivo comercial (Hipoclorito de sodio, Panreac, España). Se calcula su concentración real mediante el método estándar de valoración de cloro (Eaton y col., 2005).

La concentración real de cloro obtenida de 5.143,2 mg/L.

Radiación solar

La radiación solar se aplica mediante la Cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ (*Figura 3.6*) compuesta por una lámpara de xenón, cuyo intervalo de intensidad se sitúa entre 250-765 W m^{-2} . Mediante dos filtros que cubren la lámpara de xenón, un filtro de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320), emite en dos rangos de radiación utilizados en los procesos de desinfección.

1. Rango 290-800 nm: comprende las radiaciones UVB, UVA y visible. El filtro de cuarzo con una capa selectiva de reflexión intercepta la radiación de infrarrojo. Representando la radiación solar que incide en el exterior.
2. Rango 320-800 nm: comprende las radiaciones UVA y visible. Además del filtro de cuarzo, se coloca un filtro adicional de cristal de ventana de 6 mm (Filtro "ID 65") que intercepta las longitudes de onda por debajo de los 320 nm,



*Figura 3. 6 Cámara solar
Atlas Suntest CPS+/XLS+*

eliminando el rango UVB. Esta irradiación representa la radiación solar que incide a través de una ventana (*Lanao, 2012*).

3.6. Preparación del inóculo inicial

En primer lugar, se coge un tubo de cultivo con medio líquido, en el que se conservan las amebas a estudiar. Se realiza un primer conteo con la cámara Neubauer con el fin de tener una aproximación de la concentración de amebas que puede contener, y observando al microscopio que no tenga una gran cantidad de bacterias, ya que puede afectar en la realización del experimento. Se busca una concentración en torno a 10^6 de amebas/mL en el tubo.

Seguidamente, se coge el tubo que tenga en torno a 10^6 amebas/mL y se procede a centrifugarlo en la centrifugadora (Centrifugadora, Daihan Scientific CF-10, Barcelona, España) para obtener una muestra concentrada. Se centrifuga durante 10 minutos a 6000 rpm, cogiendo el precipitado y lavándolo con suero fisiológico estéril (0,9% NaCl). Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, y se repite este proceso tres veces. Una vez realizadas las tres repeticiones, ya se tiene la muestra de AVL preparada para realizar la experimentación.

Se procede al conteo de las amebas mediante el método descrito en el *apartado 3.3.1.* para conocer la concentración de los cultivos de amebas que hay en la disolución. Posteriormente se determina la concentración de las amebas de la muestra con azul de tripán (Trypan blue solution, Sigma, Alemania), para conocer cuál es la concentración de amebas que están vivas. Tras el conteo y la posterior verificación de la concentración de amebas vivas, se calcula el volumen necesario que hay que usar como inóculo inicial para obtener una concentración aproximada de 10^4 amebas/mL, se elige esta concentración por las limitaciones de la técnica.

Una vez la muestra está preparada, se procede a la realización de los tratamientos.

- NaClO
- Radiación solar, UVA
- Radiación solar, UVA + UVB
- NaClO + UVA
- NaClO + UVA + UVB

3.7. Descripción de los experimentos llevados a cabo

3.7.1. Hipoclorito de sodio

El inóculo inicial, se lleva a un vaso de precipitados donde previamente se añade agua ultrapura y estéril, así como la cantidad de cloro requerida para cada experimento hasta obtener un volumen de 20mL. Las concentraciones de cloro estudiadas varían desde 1 mg/L hasta 500 mg/L.

Se introducen los vasos de precipitados en la cámara solar apagada, con agitación magnética para que en todo momento la disolución este homogeneizada. Para estudiar la efectividad desinfectante del cloro, se realizan los experimentos en oscuridad durante 30 minutos, tapando completamente los vasos con papel de aluminio por todas partes sin que, entre luz por ningún lado.

Se toma muestra al inicio y al final de los experimentos y, se neutraliza el desinfectante presente en las muestras con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosulfato de sodio, Panreac, España) para que no siga afectando a la muestra.

3.7.2. Radiación solar, UVA

El inóculo inicial, se lleva a un vaso de precipitados donde previamente se añade agua ultrapura y estéril hasta obtener un volumen de 20mL.

Para estudiar la efectividad desinfectante de la radiación solar, se introducen los vasos de precipitados en la cámara solar encendida con un filtro de ventana (320-800nm), con una intensidad de

500W/m² con agitación magnética para que en todo momento la disolución este homogeneizada. Este tratamiento tiene una duración de 30 minutos, tomándose muestra al principio y al final del tratamiento.

3.7.3. Radiación solar, UVA + UVB

El inóculo inicial, se lleva a un vaso de precipitados donde previamente se añade agua ultrapura y estéril hasta obtener un volumen de 20mL.

Para estudiar la efectividad desinfectante de la radiación solar, se introducen los vasos de precipitados en la cámara solar encendida (290-800nm), con una intensidad de 500W/m² con agitación magnética para que en todo momento la disolución este homogeneizada. Este tratamiento tiene una duración de 30 minutos, en los cuales se toman muestras a diferentes tiempos, así como al principio y al final.

3.7.4. Hipoclorito de sodio + radiación solar UVA

El inóculo inicial, se lleva a un vaso de precipitados donde previamente se añade agua ultrapura y estéril, así como la cantidad de cloro requerida para cada experimento hasta obtener un volumen de 20mL. Las concentraciones de cloro estudiadas varían desde 1 mg/L hasta 500 mg/L.

Para estudiar la efectividad desinfectante de la radiación solar y de su combinación con cloro, se introducen los vasos de precipitados en la cámara solar encendida con un filtro de ventana (320-800nm), simulando la luz que entra por la ventana con agitación magnética para que en todo momento la disolución este homogeneizada, con una intensidad de 500W/m². Se realizan los experimentos durante 30 minutos, en los cuales se toman muestras a diferentes tiempos, así como al principio y al final. Se neutraliza el desinfectante presente en las muestras con Na₂S₂O₃ (tiosulfato de sodio, Panreac, España) para que no siga afectando a la muestra.

3.7.5. Hipoclorito de sodio + radiación solar UVA + UVB

El inóculo inicial, se lleva a un vaso de precipitados donde previamente se añade agua ultrapura y estéril, así como la cantidad de cloro requerida para cada experimento hasta obtener un volumen de 20mL. Las concentraciones de cloro estudiadas varían desde 1 mg/L hasta 500 mg/L.

Para estudiar la efectividad desinfectante de la radiación solar y de su combinación con cloro, se introducen los vasos de precipitados en la cámara solar encendida (290-800nm), simulando la luz solar exterior con agitación magnética para que en todo momento la disolución este homogeneizada, con una intensidad de 500W/m². Se realizan los experimentos durante 30 minutos, en los cuales se toman muestras a diferentes tiempos, así como al principio y al final. Se neutraliza el desinfectante presente en las muestras con Na₂S₂O₃ (tiosulfato de sodio, Panreac, España) para que no siga afectando a la muestra.

3.8. Efectividad de los desinfectantes

Para evaluar la efectividad de los desinfectantes, se estudia su efecto sobre la supervivencia de las amebas y de las bacterias que se encuentran en su interior.

Para evaluar la efectividad de los desinfectantes sobre las AVL, tras determinar la concentración de AVL mediante el método del MPN descrito en el apartado 3.3.2, se calcula la reducción logarítmica de los diferentes experimentos llevados a cabo. Se aplica la fórmula $\log(C_f/C_0)$ para los diferentes experimentos, siendo C_f la concentración de amebas tras la realización del experimento y C₀ la concentración de amebas inicial en el control.

Con estos datos, se representa gráficamente (mediante Microsoft Excel 2016) la reducción logarítmica frente a la concentración de cloro utilizada en los experimentos con cloro, y los que se usa cloro y radiación solar UVA. Se representa gráficamente la reducción logarítmica frente al tiempo en los experimentos con radiación solar, UVA + UVB, radiación solar UVA y los experimentos en los que se combina. A partir de la regresión lineal que se obtiene de la parte lineal de las gráficas, se estima la concentración de desinfectante o el tiempo necesario para obtener reducciones de 1, 2 y 3 unidades logarítmicas. Se estudian también, cualitativamente la supervivencia de las bacterias del interior de las

amebas, que se compara con el control y se estima la concentración de desinfectante químico o tiempo de exposición necesario para obtener la inactivación total (TK).

4. Resultados y discusión

4.1. Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio

Con el fin de evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio como desinfectante se llevan a cabo los experimentos según se describe en el *apartado 3.7.1.* analizando la supervivencia de las amebas según el *apartado 3.3.2.* y la supervivencia de las bacterias según el *apartado 3.4.*

Los resultados se muestran en la *Figura 4.1* para la ameba C1-211 y en la *Figura 4.2* para la ameba P31. En ellas se representa la concentración de desinfectante utilizado frente a la reducción logarítmica. Se obtiene una recta de regresión a partir de los resultados, la cual permite calcular la concentración necesaria de cloro a 30 minutos para las diferentes reducciones logarítmicas, como se muestra en la *Tabla 4.1*. Así mismo se representan los resultados obtenidos para las bacterias se representan en la *Tabla 4.2* y *Tabla 4.3*.

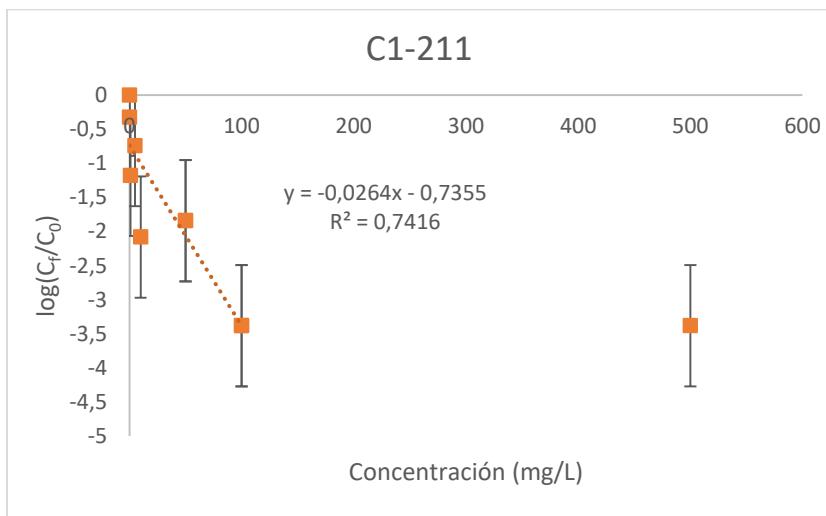


Figura 4. 1 Resultados Amebas. Tratamiento NaClO Acanthamoeba C1-211.

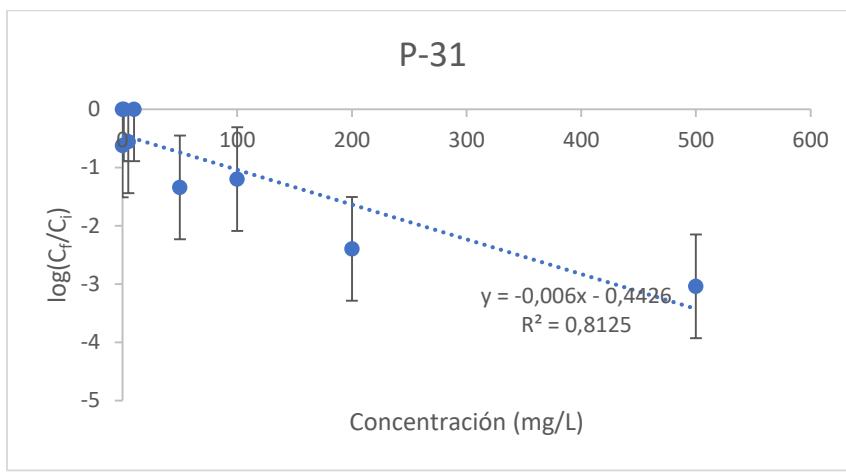


Figura 4. 2 Resultados Amebas. Tratamiento NaClO Acanthamoeba P-31.

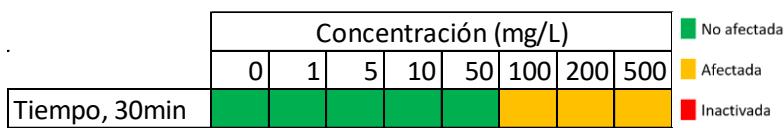
Tabla 4. 1 Reducción logarítmica, tratamiento NaClO.

C1-211		P-31	
Reducción log	Concentración (mg/L)	Reducción log	Concentración (mg/L)
1 log	10	1 log	93
2 log	48	2 log	261
3 log	86	3 log	428

Tabla 4. 2 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO. Acanthamoeba C1-211.



Tabla 4. 3 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO. Acanthamoeba P-31.



En la *Figura 4.1* se puede observar los resultados de la *Acanthamoeba C1-211* que, a mayor concentración de cloro, presenta una mayor disminución de AVL. A partir de los 100 mg/L comienza a verse una tendencia horizontal dado que ya se ha alcanzado el máximo de desinfección. Con los datos calculados en la tabla, se puede observar que a partir de 86 mg/L se puede conseguir una desinfección eficaz de 3 unidades logarítmicas. Comúnmente *Acanthamoeba*, es capaz de resistir hasta 100mg/L de NaClO (Thomas, 2013). Atendiendo a los resultados de las bacterias (*Tabla 4.2*), no se ven afectadas a concentraciones bajas utilizadas en potabilización. La dosis recomendada para la desinfección es de 1 a 5 mg/L, utilizándose concentraciones superiores a 4 mg/L en aguas con una mayor turbidez y contaminación (Aquaquimi, 2023).

Las bacterias comienzan a ver afectada su supervivencia a partir de los 50mg/L. Se podría entender con estos resultados que, conforme la supervivencia de las amebas se ve afectada, las bacterias se ven desprotegidas y así mismo, su supervivencia se ve afectada. Llegando al punto en el que ya no tienen la protección de las amebas porque todas están inactivas, y obteniendo un TK para las bacterias a los 500mg/L.

Si se observan los resultados de la *Acanthamoeba P-31*, *Figura 4.2* se puede observar que su supervivencia comienza a verse afectada a concentraciones próximas a 100mg/L. Observándose una disminución lineal hasta concentraciones próximas a 500mg/L. Se consigue una desinfección eficaz con una concentración de 435mg/L. Si se analizan los datos de las bacterias (*Tabla 4.3*), se puede ver que a partir de los 100mg/L empiezan a verse afectadas, esto puede deberse a que la supervivencia de las amebas está disminuyendo. Al morir estas amebas es probable que las bacterias tengan que salir al exterior y se vean inactivadas por el cloro. También, puede darse el caso de que el cloro consiga penetrar en el interior de las amebas inactivando las bacterias de su interior. En este tratamiento no se llega a obtener una inactivación total de las bacterias.

Comparando los resultados de ambas amebas en conjunto, se puede ver una mayor resistencia al cloro de la *Acanthamoeba P31*, frente a la C1-211. Esto puede deberse a su origen, ya que en su hábitat hay presencia de cloro, al ser una ameba aislada de una piscina. La presencia de cloro en una piscina va de 0,5 – 2 mg/L (Real Decreto 742/2013). Así mismo, se puede observar que las bacterias que contiene la ameba C1-211 comienzan a verse afectadas más tarde frente a las contenidas en la P-31, puede ser debido a que estas bacterias están contenidas en las amebas y al verse obligadas a salir, de inactivan por la concentración de cloro. En ambas cepas se obtiene un TK en las bacterias a los 500mg/L. Esto puede indicar que, aunque la ameba esté inactivada sería capaz de proteger a las bacterias que hay en su interior (He, Z. y col., 2021).

4.2. Aplicación del tratamiento de radiación solar UVA (320-800 nm)

Con el fin de analizar la inactivación de amebas y de las bacterias que contienen, se procede a la aplicación del tratamiento de radiación solar (320-800nm) según se explica en el *apartado 3.7.2.* analizando la supervivencia de las amebas según el *apartado 3.3.2.* y la supervivencia de las bacterias según el *apartado 3.4.*

Se obtienen los resultados representados en la *Figura 4.3* para ambas amebas. Así mismo se representan los resultados obtenidos con los experimentos para las bacterias (*Tabla 4.4*).

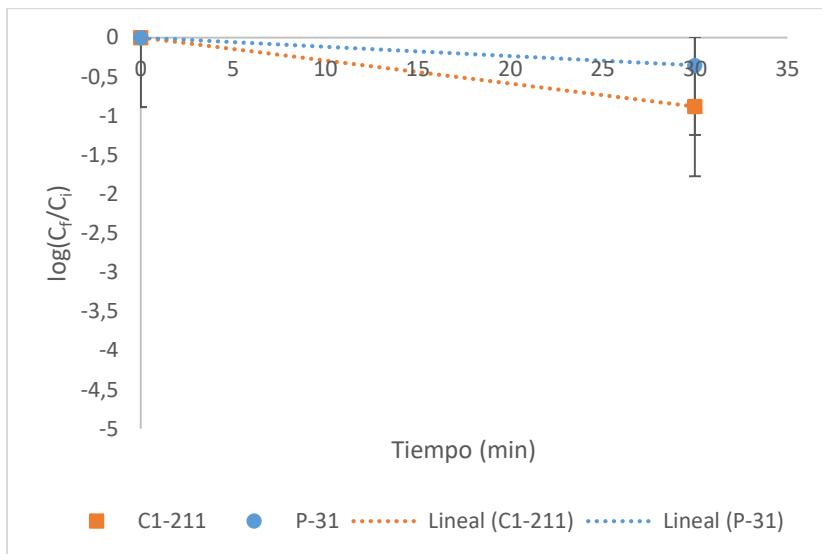


Figura 4.3 tratamiento de radiación solar UVA.

Tabla 4.4 Resultados bacterias. tratamiento de radiación solar UVA.

	P-31	C1-211	
Luz solar filtro	Luz solar filtro		
Tiempo, 30min			

█ No afectada
█ Afectada
█ Inactivada

Si se observan los resultados de ambas amebas (*Figura 4.3*), se puede apreciar que apenas se obtiene una reducción logarítmica de una unidad, por lo que el tratamiento no es efectivo. Por otro, si se observan los resultados de las bacterias (*Tabla 4.4*), se puede ver que no se ven afectadas por lo que el tratamiento tampoco es efectivo para bacterias. Esto indicaría que la supervivencia de las bacterias no se ve afectada si no se afecta la supervivencia de las amebas.

4.3. Aplicación del tratamiento de radiación solar UVA + UVB (290-800 nm)

Con el fin de analizar la inactivación de amebas y de las bacterias que contienen, se procede a la aplicación del tratamiento de radiación solar (290-800nm) según se explica en el *apartado 3.7.3.* analizando la supervivencia de las amebas según el *apartado 3.3.2.* y la supervivencia de las bacterias según el *apartado 3.4*.

Tras la realización de los experimentos, se obtienen los siguientes resultados, para ambas amebas representados en la *Figura 4.4*. Así mismo, se representan en la *Tabla 4.5* las reducciones logarítmicas obtenidas a partir de la regresión lineal, donde se puede calcular el tiempo de exposición necesario para obtener una desinfección eficaz. Los resultados obtenidos con los experimentos para las bacterias se representan en la *Tabla 4.6*.

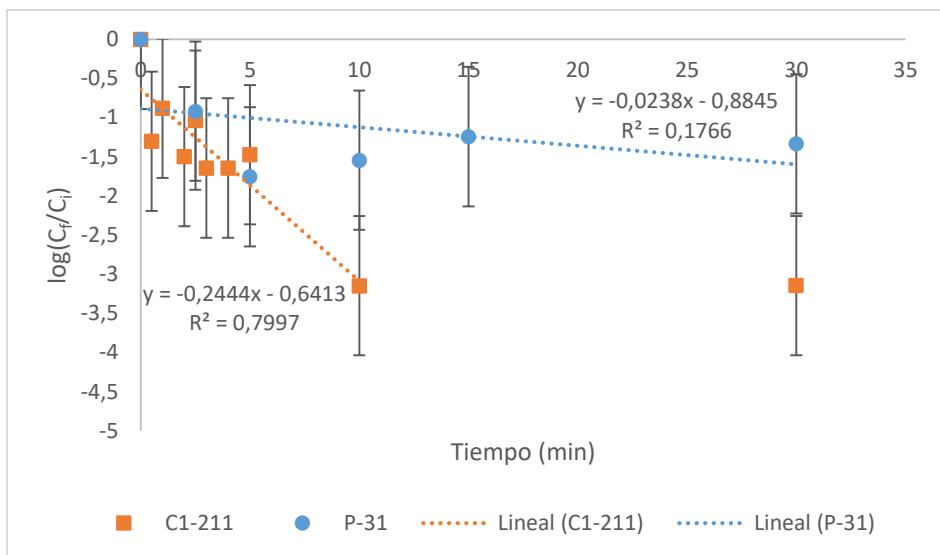


Figura 4.4 Resultados amebas. tratamiento radiación solar UVA + UVB .

Tabla 4.5 Reducción logarítmica, tratamiento radiación solar UVA + UVB.

C1-211		P-31	
Reducción log	Tiempo (min)	Reducción log	Tiempo (min)
1 log	1,5	1 log	4,9
2 log	5,6	2 log	46,9
3 log	9,6	3 log	89,0

Tabla 4.6 Resultados bacterias, tratamiento radiación solar UVA + UVB.

P31		C211	
Tiempo (min)	Radiación UVA + UVB	Tiempo (min)	Radiación UVA + UVB
0	No afectada	0	No afectada
2,5	Afectada	2,5	Afectada
5	Afectada	5	Afectada
10	Afectada	10	Afectada
15	Afectada	15	Afectada
30	Inactivada	30	Inactivada

En la Figura 4.4 se puede observar que la *Acanthamoeba* C1-211 comienza a verse afectada desde que se da comienzo al tratamiento; para un mayor tiempo de exposición, se obtiene una mayor disminución de AVL. Con los datos calculados en la tabla se puede observar que, con un tiempo próximo a 10 min, ya se consigue una desinfección eficaz. Si por el contrario se observan los resultados de la ameba P-31 se puede ver que, tras una reducción de las amebas durante los primeros 5 minutos, la inactivación de la P-31 se mantiene en torno a 1,5 log el resto del tratamiento. Esto justifica el bajo coeficiente de regresión que se obtiene. Si se calcula el tiempo necesario para conseguir una desinfección eficaz, se puede ver que se necesita un tiempo de exposición al tratamiento de casi 1 hora y media.

Si se observa la Tabla 4.6 , en la que se representan los resultados de las bacterias, se puede ver que las bacterias de ambas amebas se ven afectadas, sin conseguir TK en ninguna de las dos.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede observar que la ameba P-31 es más resistente a la radiación UVA+UVB. Aunque ambas amebas estén expuestas a la luz solar en sus hábitats correspondientes, la mayor resistencia de la ameba P-31 puede deberse a que le llega una mayor radiación solar, ya que la C1-211 está aislada en un río donde la turbidez y los sólidos en suspensión pueden no dejar pasar la radiación.

4.4. Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio + radiación solar UVA

Con el fin de analizar la inactivación de amebas y de las bacterias que contienen, se procede a la aplicación del tratamiento de radiación solar (320-800nm) con hipoclorito de sodio según se explica en el apartado 3.7.4. analizando los resultados de las amebas según el apartado 3.3.2. y los resultados de las bacterias según el apartado 3.4

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.5 para la ameba C1-211 y en la Figura 4.6 para la ameba P31. En ellas se representa la concentración de desinfectante utilizada en el tratamiento frente a la reducción logarítmica. Se obtiene una recta de regresión a partir de los resultados, la cual permite calcular la concentración necesaria de cloro para las diferentes reducciones logarítmicas (Tabla 4.7). Así mismo se representan los resultados obtenidos para las bacterias (Tabla 4.8)(Tabla 4.9).

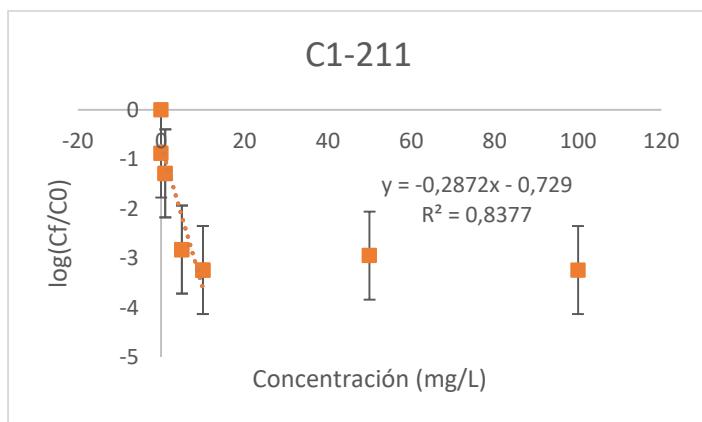


Figura 4.5 Resultados Amebas. Tratamiento UVA + NaClO Acanthamoeba C1-211.

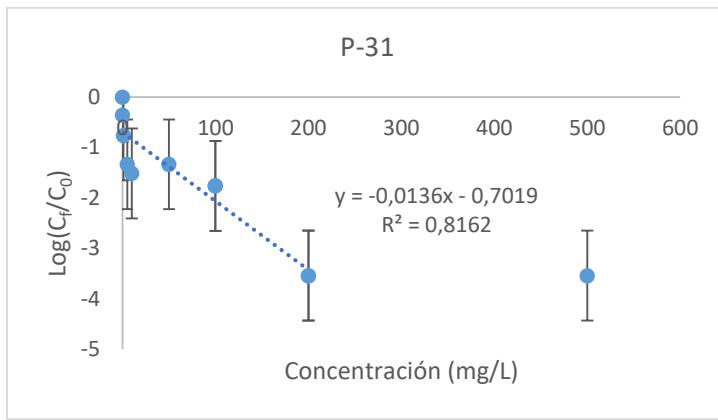


Figura 4.6 Resultados Amebas. Tratamiento UVA + NaClO Acanthamoeba P-31.

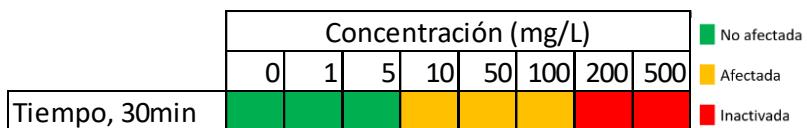
Tabla 4.7 Reducción logarítmica, tratamiento NaClO + UVA.

C1-211		P-31	
Reducción log	Concentración (mg/L)	Reducción log	Concentración (mg/L)
1 log	0,9	1 log	21,9
2 log	4,4	2 log	95,4
3 log	7,9	3 log	168,9

Tabla 4.8 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO + UVA. Acanthamoeba C1-211.



Tabla 4.9 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO + UVA. Acanthamoeba P-31.



En la (*Figura 4.5*) se pueden observar los resultados de la *Acanthamoeba* C1-211. Conforme aumenta la concentración de cloro, hay una mayor disminución de AVL, que alcanza un 1 log, a partir de 1 mg/L. A partir de los 10 mg/L comienza a verse una tendencia lineal dado que ya se ha alcanzado el máximo de desinfección. Con los datos calculados en la *Tabla 5.7*, se puede observar que a los 8 mg/L es donde se consigue una desinfección eficaz de 3 unidades logarítmicas. Atendiendo a los resultados de las bacterias (*Tabla 5.8*), comienza a verse afectada su supervivencia a partir de los 10mg/L. Se podría entender con estos resultados que conforme se inactivan las amebas, las bacterias se ven desprotegidas y por tanto su supervivencia se ve afectada. Llegando al punto en el que ya no tienen la protección de las amebas porque todas están inactivas. Se alcanza TK de las bacterias de *Acanthamoeba* C1-211 al combinar 50mg/L con radiación solar de 320 a 800 nm.

Si se observan los resultados de la *Acanthamoeba* P31, (*Figura 4.6*) se puede observar que comienza a verse afectada a concentraciones próximas a 100mg/L. Observándose una disminución lineal hasta concentraciones próximos a 200mg/L. Se consigue una desinfección eficaz con una concentración combinando 169 mg/L con radiación solar de 320 a 800 nm. Si se analizan los datos de las bacterias (*Tabla 5.9*), se puede ver que a partir de los 200mg/L empiezan a verse afectadas, esto puede deberse a que la supervivencia de las amebas está disminuyendo. Se alcanza TK de las bacterias de *Acanthamoeba* P31 a los 500mg/L.

Este tratamiento es un POA. Eso significa que las amebas se ven afectadas por el cloro, por la radiación y por la combinación de ambas como se explica en el apartado.

Según los resultados, se puede observar que este POA afecta a la ameba C1-211 y reduce la dosis de cloro necesaria para obtener una desinfección eficaz de 86 mg/L que se obtiene en el *apartado 4.1* a 7,9 mg/L. Con estos resultados se puede ver que se disminuye 10 veces la concentración de cloro necesaria para una desinfección eficaz.

Sin embargo, en el caso de la ameba P31, aunque este tratamiento es más eficaz ya que se necesita una dosis de cloro menor para lograr una desinfección eficaz de 169 mg/L en vez de 428 mg/L que se obtiene en el *apartado 4.1*. Se consigue una reducción de 3 veces la dosis de cloro, aun así, sigue necesitando una elevada dosis de cloro. Esta mayor resistencia de la P31 puede deberse a que la ameba está acostumbrada a la combinación de cloro y UVA que debe de darse en la piscina de la que se aisló.

4.5. Aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio + UVA + UVB

Tras los experimentos de cloración con luz solar (290-800 nm), los resultados se muestran en la *Figura 4.7* para la ameba C1-211 y en la *Figura 4.8* para la ameba P31. En ellas se representa la reducción logarítmica frente al tiempo para cada concentración de desinfectante utilizada. Las rectas de regresión (*Tabla 4.10*) obtenidas a partir de los resultados, permiten calcular la concentración necesaria de cloro para las diferentes reducciones logarítmicas (*Tabla 4.11*), (*Tabla 4.12*). Así mismo se representan los resultados obtenidos para las bacterias (*Tabla 4.13*), (*Tabla 4.14*).

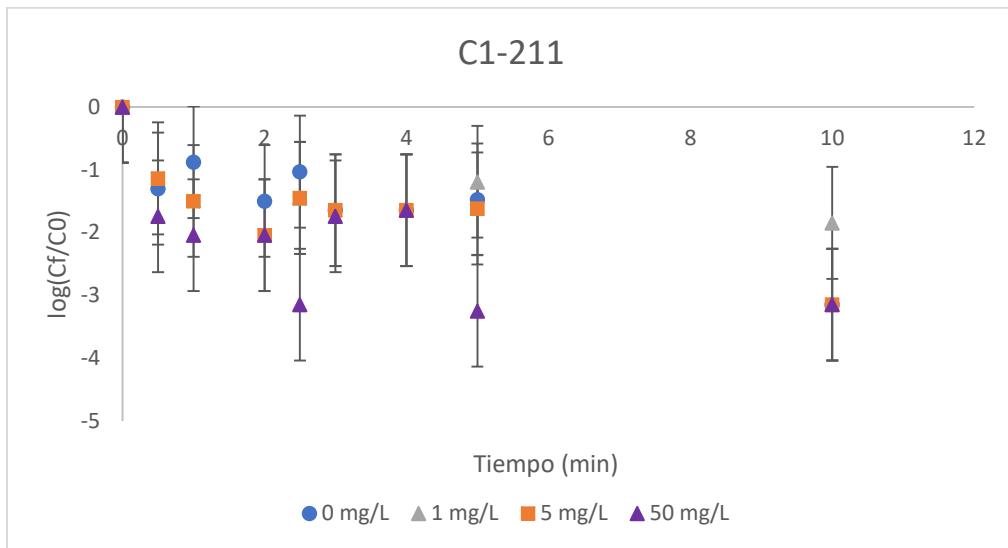


Figura 4. 7 Resultados Amebas. Tratamiento UVA + UVB + NaClO Acanthamoeba C1-211

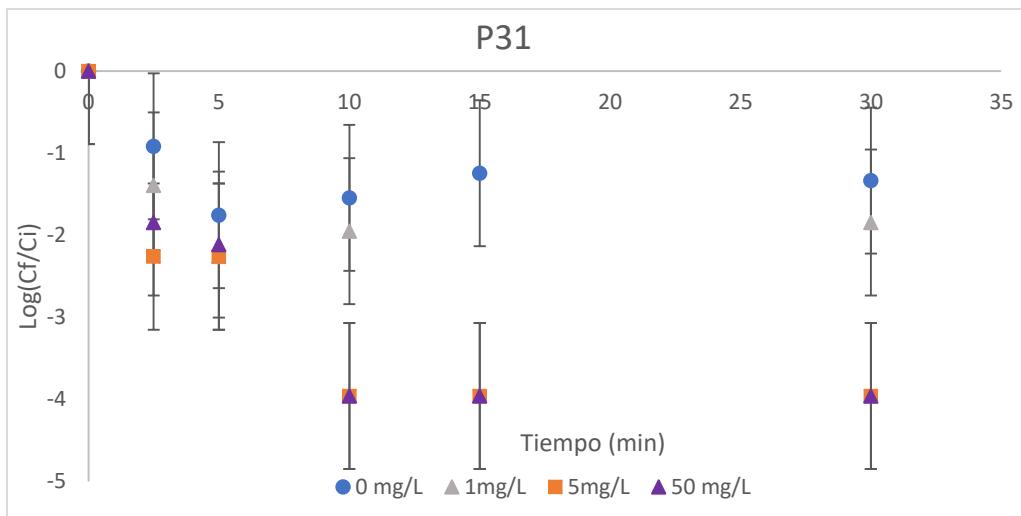


Figura 4. 8 Resultados Amebas. Tratamiento UVA + UVB + NaClO Acanthamoeba P-31.

Tabla 4. 10 Reducción logarítmica, tratamiento NaClO + UVA + UVB. Acanthameba C1-211.

P-31		C1-211	
0mg/L	$y=-0,024x-0,88$	0mg/L	$y=-0,24x-0,64$
1mg/L	$y=-0,032x-1,18$	1mg/L	$y=-0,086x-0,71$
5mg/L	$y=-0,35x-0,56$	5mg/L	$y=-0,22x-0,87$
50mg /L	$y=-0,37x-0,37$	50mg /L	$y=-0,37x-1,12$

Tabla 4. 11 Reducción logarítmica, tratamiento NaClO + UVA + UVB. Acanthameba C1-211.

C1-211	Concentración (mg/L)			
	0	1	5	50
Reducción	Tiempo (min)			
1 log	1,47	3,39	0,55	-
2 log	5,56	15,01	5,00	2,39
3 log	9,65	26,62	9,45	5,08

Tabla 4. 12 Reducción logarítmica, tratamiento NaClO + UVA + UVB. Acanthameba P-31.

P-31	Concentración (mg/L)			
	0	1	5	50
Reducción	Tiempo (min)			
1 log	4,86	-	1,23	1,71
2 log	46,91	25,18	4,04	4,43
3 log	88,97	55,91	6,85	7,15

Tabla 4.13 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO + UVA + UVB. Acanthamoeba C1-211.

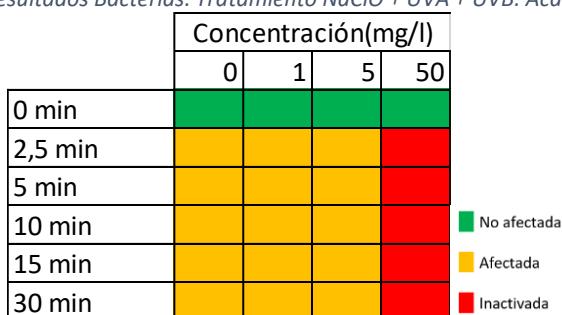
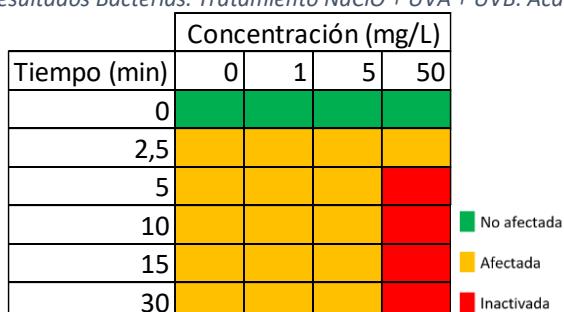


Tabla 4.14 Resultados Bacterias. Tratamiento NaClO + UVA + UVB. Acanthamoeba P-31.



En la Figura 4.7 se pueden observar los resultados de *Acanthamoeba* C1-211, conforme aumenta la concentración de cloro, la inactivación de las AVL es mayor. Se puede observar también que a mayor tiempo de exposición hay una mayor disminución de AVL. A concentraciones menores, se necesita un mayor tiempo de exposición para obtener una desinfección eficaz, llegando por ejemplo en el caso de 1mg/L hasta un tiempo de 30 minutos. Por lo tanto, si 30 minutos de radiación solar causan la inactivación total de C1-211 como se menciona en el apartado 4.4 y para 1mg/L se consigue la inactivación también a 30 minutos, significa que esa concentración de cloro no modifica el efecto de la radiación solar. Así mismo, se puede ver que, a los 10 minutos de exposición al tratamiento, se obtendría una desinfección eficaz a partir de una concentración de 5mg/L aplicada. Si se examinan los datos de la Tabla 4.12 se puede ver los tiempos necesarios para cada concentración de desinfectante que serían necesarios para obtener una desinfección eficaz, una reducción de 3 unidades logarítmicas. Para una concentración de 1mg/L se necesita media hora de tiempo de exposición al tratamiento. Si se observan concentraciones mayores de 50mg/L se puede observar que se necesita un tiempo de exposición mucho menor, de 2 minutos. Esto indica que cuanto mayor sea la concentración de cloro, mayor será la eficacia del tratamiento.

Atendiendo a los resultados de las bacterias (*Tabla 4.13*), comienza a verse afectada su supervivencia en cuanto se exponen las muestras al tratamiento. Se puede observar que a partir de concentraciones muy bajas comienza a verse afectada su supervivencia. Se alcanza TK al combinar 50 mg/L de NaClO y 2 minutos de radiación solar.

Si se observan los resultados de la *Acanthamoeba P31*, *Figura 4.8* para una mayor concentración de cloro, hay una mayor disminución de AVL. Se puede observar también que a mayor tiempo de exposición hay una mayor disminución de AVL. Así mismo, se puede ver que se necesitaría un tiempo de exposición alto de tratamiento para obtener una reducción para concentraciones bajas, calculando en la *Tabla 4.12* una desinfección eficaz a los 55 minutos con 1mg/L de cloro. Si se observan concentraciones mayores, de 5mg/L, se puede observar que se obtiene una reducción logarítmica de 3 unidades a los 7 minutos de tratamiento. Para una concentración de 50mg/L se observan unos datos similares, lo que nos indica que una mayor concentración de cloro, no hace que la desinfección sea más eficaz. Examinando los resultados de las bacterias (*Tabla 4.14*), comienza a verse afectada su supervivencia en cuanto se le aplica el tratamiento, esto se puede deber a que las amebas ya empiezan a inactivarse y las bacterias comienzan a estar desprotegidas. Aunque no se alcanza TK hasta los 30 minutos con 10 mg/L. Con concentraciones superiores, se necesita un menor tiempo de exposición al tratamiento, con 25 mg/L se necesitarían 10 minutos de exposición y con la mayor concentración utilizada en los experimentos que son los 50 mg/L, se necesitarían únicamente 5 minutos de exposición.

Atendiendo a los resultados obtenidos, la ameba P-31 es más resistente, lo cual concuerda con lo observado en el resto de tratamientos.

Si se observan únicamente los resultados del tratamiento para 30 minutos de exposición *Figura 4. 9* se puede observar una mayor resistencia de la ameba P31, ya que la C1-211 se ve inactivada tras 30 minutos de radiación solar, sin necesidad de añadir desinfectante. Mientras que la ameba P-31 necesitaría combinar 10 mg/L de cloro y radiación para verse afectada.

La mayor resistencia de la P31 al tratamiento aplicado frente a la C1-211 puede deberse a que la ameba P-31 habita en un medio en el que continuamente se ve expuesta a la combinación de cloro y radiación solar.

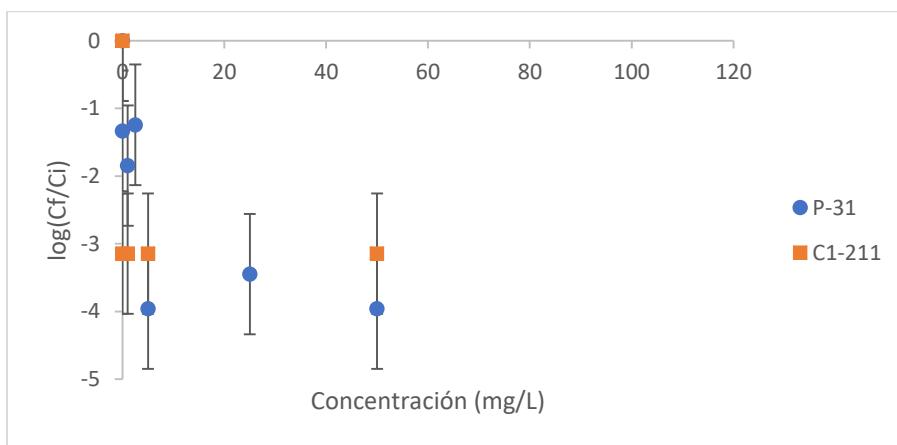


Figura 4. 9 Tratamiento UVA + UVB + NaClO (30minutos).

En los resultados se ve que los tratamientos de oxidación avanzada (POA) son más efectivos que los tratamientos convencionales, siendo la combinación de radiación solar UVA + UVB con cloro más efectiva que solamente combinando radiación solar UVA con cloro. Esto puede deberse a que, dependiendo de la longitud de onda, el NaClO produce diferentes especies reactivas (ROS) mencionado en el *apartado 2.3.1* y parece que unas pueden tener mayor efectividad que otras frente a las amebas y sus bacterias.

Se puede observar que este tratamiento es más eficaz ya que combinando 5mg/L de cloro y radiación solar UVA + UVB se podría inactivar por completo a las amebas. Así mismo, combinando la radiación solar UVA + UVB con 10 mg/L de cloro se podría inactivar por completo a las bacterias, reduciendo la dosis de cloro necesaria 50 veces. La dosis necesaria para inactivar completamente a las bacterias, sigue siendo superior a la necesaria para inactivar a las amebas, lo cual demuestra la gran protección que confieren las bacterias a las amebas.

Tras el análisis de los resultados se puede comprobar que los tratamientos de oxidación avanzada son mucho más efectivos que los tratamientos convencionales en la desinfección de las aguas.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha evaluado la eficacia de desinfectantes basados en cloro, UV y la combinación de ambas en la eliminación de amebas y de las bacterias que contienen en su interior, concluyéndose que los POA son mucho más eficaces a la hora de realizar una desinfección para ambas amebas y para las bacterias que portan de forma natural en su interior.

Se han realizado diferentes réplicas para ver cuál es la correlación que existe entre los dos métodos utilizados para el cálculo de la concentración de amebas, la determinación mediante hemocitómetro, y la determinación mediante el método del número más probable. Se ha concluido que ambos métodos tienen unos resultados parecidos. Así mismo, se ha estudiado cual es el error del método de MPN utilizado en el presente estudio, concluyendo con el valor de su error.

Se han comparado dos cepas de *Acanthamoeba spp.* una de ellas aislada en una piscina y la otra aislada en un río, y de las bacterias que contienen en su interior. En el presente estudio se ha determinado que la ameba P-31 aislada en una piscina es mucho más resistente a los tratamientos que la C1-211 aislada en el río. Debido a esto, se necesitan mayores dosis de desinfectante químico para inactivar las bacterias de la ameba P-31 que para inactivar las bacterias de la ameba C1-211.

Al estudiar la supervivencia de las amebas y bacterias aplicándoles el tratamiento de cloro, se ha podido observar que, para dosis de cloro bajas, entorno a 5mg/L, no se obtiene ninguna efectividad. Para que este método sea efectivo para la eliminación de ambas amebas, se tienen que aplicar concentraciones superiores a 400mg/L. En el caso de las bacterias, se tienen que aplicar concentraciones superiores a 500mg/L.

También, se ha comprobado la supervivencia de amebas y bacterias para diferentes longitudes de onda de radiación solar aplicada, concluyéndose que para el rango 290-800nm se obtiene una desinfección más eficaz que con tratamientos en el rango 320-800.

Por último, se ha comprobado la supervivencia de amebas y bacterias para diferentes concentraciones de cloro aplicadas combinado con diferentes longitudes de onda de radiación solar (POA). En los diferentes ensayos llevados a cabo, se ha concluido que la aplicación de tratamientos de oxidación avanzada, es mucho más efectiva que aplicando solamente los tratamientos convencionales. Se consigue reducir hasta 5mg/L la cantidad de desinfectante químico aplicado para un mismo tiempo.

6. Bibliografía

- Aquaquimi(s/f). (2023) Cloro agua potable desinfeccion. Aquaquimi.com. https://www.aquaquimi.com/Paginas/Trat_agua_pot/Desinfeccion%20agua/agua%20potable%20cloro.html
- Beattie, T. K., Seal, D. V., Tomlinson, A., McFadyen, A. K., y Grimason, A. M. (2003). Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2992–3000. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2992-3000.2003>
- Belloc, J. (2016) Evaluación de la sensibilidad de *Acanthamoeba spp.* a diferentes compuestos y propuesta de alternativas para el tratamiento de la queratitis amebiana. Trabajo fin de grado. Universidad de Zaragoza.
- Burns, N., Neemann, J., Hulsey, R., Fonseca, A. C., Singh, I., y Pante, R. (2008). Synergistic evaluation of ozone and UV at the Coquitlam source for enhanced DBP control and Cryptosporidium inactivation. *Ozone: Science & Engineering*, 30(1), 3–12. <https://doi.org/10.1080/01919510701728285>
- Castrillon, JC y LP Orozco. (2013) *Acanthamoeba spp. as opportunistic pathogens parasites*. vol. 30, Rev Chilena Infectol. 2 vols.
- Cervero-Aragó, S., Sommer, R., y Araujo, R. M. (2014). Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free Legionella and Legionella associated with its amoebae hosts. *Water Research*, 67, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.023>
- Cope, J. R., Ali, I. K., y Visvesvara, G. S. (2020). Pathogenic and opportunistic free-living ameba infections. En *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 814–820). Elsevier.
- Cultivo de células. (2021). *Recuento de células: hemocitómetro*. Cultivo de células; cellculture. https://cellculture.altervista.org/cell-counting-hemocytometer/?lang=es&doing_wp_cron=1685590998.0547609329223632812500
- Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E., Franson M.A.H., (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed.: Washington, DC, USA. ISBN 08-7553-047-8
- Fernandez Rodrigo, M.T. (2014) . Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Forsyth, J. E., Zhou, P., Mao, Q., Asato, S. S., Meschke, J. S., y Dodd, M. C. (2013). Enhanced inactivation of *Bacillus subtilis* spores during solar photolysis of free available chlorine. *Environmental Science & Technology*, 47(22), 12976–12984. <https://doi.org/10.1021/es401906x>
- Organización de las Naciones Unidas (2015). *Objetivos y metas de desarrollo sostenible*. Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Greub, G., y Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- He, Z., Wang, L., Ge, Y., Zhang, S., Tian, Y., Yang, X., y Shu, L. (2021). Both viable and inactivated amoeba spores protect their intracellular bacteria from drinking water disinfection. *Journal of Hazardous Materials*, 417(126006), 126006. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126006>
- Herraez, A. (2023) (s/f). *Recuento celular*. Biomodel.UAH.es <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/hemocitometro.htm>

Lanao Maldonado, M. (2012) Investigación de la inactivación de Clostridium perfringens y Enterococcus sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

Ocampo-Rodríguez, D. B., Vázquez-Rodríguez, G. A., Martínez-Hernández, S., Iturbe-Acosta, U., & Coronel-Olivares, C. (2022). Desinfección del agua: una revisión a los tratamientos convencionales y avanzados con cloro y ácido peracético. *Ingeniería del agua*, 26(3), 185–204. <https://doi.org/10.4995/ia.2022.17651>

Ortillés, Á., Belloc, J., Rubio, E., Fernández, M. T., Benito, M., Cristóbal, J. Á., Calvo, B., & Goñi, P. (2017). In-vitro development of an effective treatment for Acanthamoeba keratitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(3), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.033>

Ortillés, Ángel, Goñi, P., Rubio, E., Sierra, M., Gámez, E., Fernández, M. T., Benito, M., Cristóbal, J. Á., & Calvo, B. (2017). A rabbit model of Acanthamoeba keratitis: Use of infected soft contact lenses after corneal epithelium debridement with a Diamond burr. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(2), 1218–1227. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21100>

Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. BOE-A-2023-628 (s/f). Boe.es. Recuperado el 5 de junio de 2023, de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2023-628>

Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas. BOE-A-2013-10580 (s/f). Boe.es. Recuperado el 4 de junio de 2023, de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2013-10580>

Remucal, C. K., & Manley, D. (2016). Emerging investigators series: the efficacy of chlorine photolysis as an advanced oxidation process for drinking water treatment. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2(4), 565–579. <https://doi.org/10.1039/c6ew00029k>

Thomas, V. (2012). Sensitivity and resistance of protozoa to microbicides. En *Russell, Hugo & Ayliffe's* (pp. 155–177). Wiley-Blackwell.

Tillett, H. E. (1987). Most probable numbers of organisms: revised tables for the multiple tube method. *Epidemiology and Infection*, 99(2), 471–476. <https://doi.org/10.1017/s0950268800067972>

Henley-On-Thames. (2021). Ultravioleta explicado - La luz UV es un componente natural. Berson, Hanovia & Aquionics UV; Berson, Hanovia, Aquionics. <https://www.weuvcare.com/es/uv-education/>