



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Ciencias mención Microbiología

## **Caracterización del Biofouling formado en Membranas de Ósmosis Inversa presentes en Sistemas de Tratamiento de Agua para uso en Hemodiálisis**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología

JUAN PABLO CUEVAS GIMÉNEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Dr. Víctor Campos Araneda  
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

---

Dr. Víctor Campos Araneda  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Miguel Martínez Poblete  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Víctor Hernández Santander  
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

---

Dr. José Becerra Allende  
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Director de Programa:

---

Dr. Gerardo González Rocha.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

Me es pertinente agradecer en primer lugar a mis padres Loreto y Juan Pablo, quienes financiaron y apoyaron incondicionalmente todos estos arduos años de estudio y mi iniciativa de perfeccionamiento.

A mi esposa Viluska e hija Amanda por ser mi soporte emocional y gran motivación para culminar mis estudios de pre y postgrado. Gracias por su amor y por acompañarme todos estos años.

A mi profesor tutor Dr. Víctor Campos por enseñarme a ser más científico que Gerente, por su apoyo incondicional en la elaboración de esta tesis y por ser más amigo que profesor.

A la Dra. Liliana Cuevas por haberme capacitado para trabajar como encargado de procedimientos sanitarios en plantas de tratamiento de agua para uso clínico, y por su gestión y apoyo logístico para la obtención de las membranas de ósmosis inversa.

A la Dra. María Angélica Mondaca por brindarme su sabiduría sobre aislamiento bacteriano y por preocuparse siempre por mi bienestar emocional.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental agradecerles todos estos años de camaradería, gratos momentos e intercambio de conocimientos.

A todos mis profesores del Departamento de Microbiología por entregarme los conocimientos necesarios para ser un buen microbiólogo.

## INDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problemática y antecedentes.....	1
1.2 Plantas de tratamiento de agua para hemodiálisis.....	5
1.3 Biofouling en membranas de ósmosis inversa.....	8
1.4 Bacterias asociadas a sistemas de tratamiento de agua para hemodiálisis .....	11
1.5 Consecuencias de la presencia de biopelículas en la salud humana ....	13
<b>1.6 HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.7 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 Toma de muestra .....	19
2.2 Aislamiento de bacterias en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa.....	20
2.3 Recuento bacteriano en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa.....	20
2.4 Identificación molecular de bacterias aisladas .....	21
2.5 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.....	22
2.6 Caracterización metabólica de la comunidad bacteriana presente en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis .....	22
2.7 Caracterización molecular de la comunidad bacteriana presente en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis.....	24
2.7.1 <i>Extracción de ADN de comunidades bacterianas provenientes del agua</i>	

<i>y de membranas de ósmosis inversa</i> .....	24
2.7.2 <i>Secuenciación masiva Illumina NGS</i> .....	25
2.7.3 <i>Amplificación del gen ADNr 16s y de la región V3 del gen ADNr 16s</i> .....	25
2.7.4 <i>Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante (DGGE)</i> .....	27
2.8. <i>Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)</i> .....	28
2.9 <i>Prueba de lisados de amebocitos de Limulus (LAL)</i> .....	29
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 <i>Recuento de bacterias provenientes del agua y de membranas de ósmosis inversa</i> .....	30
3.2 <i>Antibiogramas</i> .....	33
3.3 <i>Identificación molecular de cepas aisladas provenientes del agua y de membranas de ósmosis inversa</i> .....	35
3.4 <i>Caracterización metabólica de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis</i> .....	36
3.5 <i>Caracterización molecular de comunidades bacterianas desde sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis</i> .....	45
3.5.1 <i>Caracterización molecular por DGGE de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis</i> .....	45
3.5.2 <i>Secuenciación masiva de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis</i> .....	48
3.6 <i>Detección de biopelícula bacteriana en membranas de ósmosis inversa de sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis</i> .....	49
3.7 <i>Determinación de endotoxinas bacterianas en agua osmosada para uso en hemodiálisis</i> .....	52
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>6. PROYECCIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>66</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de muestreo en columna de osmosis inversa. La flecha indica la dirección del flujo del agua en la columna.....19
- Figura 2.** Recuento de bacterias viables en segmento inicial (HN A), medio (HNB) y final (HN C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HN AP) y agua de salida (HN AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso, Chile.....31
- Figura 3.** Recuento de bacterias viables en segmento inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HC AP) y agua de salida (HC AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, Chile..... 33
- Figura 4.** Índice AWCD/AWCD0 por grupos de fuentes de carbono de bacterias provenientes de segmento inicial (HN A), medio (HNB) y final (HN C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HN AP) y agua de salida (HN AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso, Chile..... 38
- Figura 5.** Índice AWCD/AWCD0 por grupos de fuentes de carbono de bacterias provenientes de segmento inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HC AP) y agua de salida (HC AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, Chile..... 40
- Figura 6.** Índice R para las distintas muestras de agua y membrana de osmosis inversas analizadas a las 96 h de incubación..... 43

**Figura 7.** Índice H' para las distintas muestras de agua y membrana de osmosis inversas analizadas a las 96 h de incubación..... 44

**Figura 8.** Diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) del patrón de bandeo mediante DGGE de las muestras de segmentos de membrana OI inicial (HN A), medio (HN B) y final (HN C) de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso... 46

**Figura 9.** Diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) del patrón de bandeo mediante DGGE de las muestras de segmentos de membrana OI inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío..... 47

**Figura 10.** Abundancias relativas de los principales *phyla* encontrados en el análisis de metagenómica..... 48

**Figura 11.** Microscopía electrónica de barrido de biopelículas formadas en membrana OI y bacterias desprendidas de la membrana. A) Biopelícula formada en membrana OI porción inicial (HC A) B) Biopelícula formada en membrana OI porción media (HC B). C) Biopelícula formada en membrana OI porción final (HC C) D) Bacterias desprendidas de la membrana OI por sonicación porción inicial (HC A). Muestras obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío..... 50

**Figura 12.** Microscopía electrónica de barrido de biopelículas formadas en membrana OI y bacterias desprendidas de la membrana. A) Biopelícula formada en membrana OI porción inicial (HN A) B) Biopelícula formada en membrana OI porción media (HN B). C) Biopelícula formada en membrana OI porción final (HN C) D) Bacterias desprendidas de la membrana OI por sonicación porción final (HN C). Muestras obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso..... 51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Índices de los perfiles metabólicos.....	23
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de partidores y tamaño de los fragmentos amplificados del gen ADNr 16s y región V3 del mismo gen.....	26
<b>Tabla 3.</b> Composición de soluciones stock de DGGE.....	27
<b>Tabla 4.</b> Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de cepas aisladas.....	34
<b>Tabla 5.</b> Secuencias relativas de cepas aisladas.....	35
<b>Tabla 6.</b> Resultados determinación de endotoxina en agua osmosada.....	52



## RESUMEN

La enfermedad renal crónica es una enfermedad de impacto mundial que ha ido en aumento en las últimas décadas. El tratamiento principal para esta enfermedad es la hemodiálisis (HD). Los pacientes que cursan con hemodiálisis están expuestos a una alta cantidad de agua de forma intravenosa (120 L aproximadamente) en una sola sesión de HD, lo cual puede implicar una fuente de contaminación bacteriana importante si el agua no tiene las condiciones microbiológicas adecuadas. Es por esta razón que toda Unidad de HD cuenta con un sistema de tratamiento de agua el cual consta de membranas de ósmosis inversa (OI) para poder remover en un 99% las bacterias presentes en el agua que se desea filtrar para obtener un agua ultra pura y de calidad. Dichas membranas de ósmosis inversa sufren ensuciamiento biológico (biofouling) que es el proceso de interface sólido-líquido mediante el cual las bacterias se depositan, adhieren y proliferan en la membrana, formando una biopelícula lo cual puede generar obstrucción y daño en la membrana, permitiendo el traspaso de bacterias y/o componentes celulares (Ej: endotoxinas), potencialmente dañinos para la salud de pacientes sometidos a este tratamiento.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar bacterias presentes en el agua y membranas de ósmosis inversa presentes en sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis de Centros de Atención de Salud en Chile.

Para esto se realizó una caracterización molecular de las comunidades bacterianas encontradas en muestras de membranas de OI, agua de alimentación y agua tratada, mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante (DGGE) y metagenómica. Se visualizó la formación de biopelículas adheridas a membranas de OI mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y se realizó caracterización metabólica de comunidades bacterianas en muestras de membrana de OI y agua mediante kit BIOLOG EcoPlate™. Se aislaron bacterias provenientes de muestras de agua obtenidas antes y después del proceso de OI y en membranas de OI, se realizó recuento total de bacterias heterótrofas en dichas muestras, se realizaron

ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados para detectar la posible existencia de bacteria multirresistente a antibióticos y se realizó identificación molecular de las cepas aisladas mediante secuenciación por método de Sanger. Finalmente se evaluó la presencia de endotoxinas mediante Prueba de Lisados de Amebocitos de Limulus (LAL) en agua osmosada o tratada.

En ambos Centros de Diálisis estudiados, se aislaron 29 cepas bacterianas diferentes, correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Pigmentiphaga*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Bacteroides* y *Staphylococcus*. Los análisis de los perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas presentes en muestras de membranas de OI indicaron que las comunidades bacterianas presentes en las membranas OI del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso tienen mayores competencias metabólicas para oxidar las fuentes de carbono que comprende el kit Biolog Ecoplate, en comparación con las comunidades bacterianas presentes en el Centro de Diálisis de la Región del Bio-Bío. En ambos Centros de Diálisis se encontró una biodiversidad específica de especies normal para este tipo de muestras. Los análisis moleculares de metagenómica demostraron que los principales *phyla* encontrados en ambos Centros de Diálisis fueron: *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, teniendo mayor abundancia relativa, en ambos Centros de Diálisis, el grupo *Proteobacteria*. Mediante Microscopía electrónica se detectó la presencia de biopelículas bacterianas en membranas de ósmosis inversa en ambos Centros de Diálisis estudiados. Se determinó la presencia endotoxinas bacterianas en agua osmosada para uso en hemodiálisis en ambos Centros de Diálisis estudiados. La concentración de estas endotoxinas fue inferior a 0,25 UE/mL lo cual indica que ambos Centros de Diálisis estudiados cumplen con la normativa del Ministerio de Salud de Chile (MINSAL) para el agua tratada.

La contribución de este estudio fue proporcionar evidencia científica sobre los posibles patógenos presentes en los Centros de Diálisis en Chile y, por lo tanto, contribuir con información para la prevención de posibles brotes bacterianos y resguardar de esta manera la salud del paciente que cursa HD.

## ABSTRACT

Chronic renal failure is a global impact disease that has been increasing in recent decades. The main treatment for this disease is hemodialysis (HD). Patients who are undergoing hemodialysis are exposed to a high amount of water intravenously (approximately 120 L) in a single HD session, which may imply a significant source of bacterial contamination if the water does not have adequate microbiological conditions. It is for this reason that every HD Unit has a water treatment system which consists of reverse osmosis (RO) membranes to be able to remove 99% of the bacteria present in the water, to obtain high quality pure water. However, RO membranes undergo biological fouling (biofouling) which is the solid-liquid interface process through which bacteria deposit, adhere and proliferate in the membrane, forming a biofilm which can cause obstruction and damage to the membrane, allowing the transfer of bacteria and / or cellular components (i.e. endotoxins), potentially harmful to the health of patients undergoing this treatment.

The general objective of this work is to characterize bacteria present in water and RO membranes present in water treatment systems for use in hemodialysis of Health Care Centers in Chile.

A molecular characterization of the bacterial communities found in RO membranes and water was performed by Gel Electrophoresis with Denaturant Gradient (DGGE) and metagenomics. The formation of biofilms adhered to RO membranes was visualized by Scanning Electron Microscopy (MEB) and metabolic characterization of bacterial communities was performed in samples of RO membrane and water using BIOLOG EcoPlate™ kit. Additionally, bacteria from water samples were isolated before and after the RO process and in RO membranes, a total count of heterotrophic bacteria was performed, antimicrobial susceptibility tests of the isolates were carried out to investigate the presence of any antibiotic-resistant bacteria and molecular identification by Sanger's sequencing of the isolated strains by was performed. Finally, the presence of endotoxins in treated water was evaluated by the Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL).

It was possible to isolate and characterize 29 different bacterial strains in total from feed water samples, RO membranes samples and treated water samples, in both studied Dialysis Centers. These strains were molecularly identified as *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Pigmentiphaga*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Bacteroides* and *Staphylococcus*. Metabolic profiles analysis of the bacterial communities present in samples of OI membranes indicated that the bacterial communities present in the OI membranes of the Valparaíso Region Dialysis Center had greater metabolic competencies to oxidize the carbon sources that the kit Biolog Ecoplate comprises, compared to the bacterial communities present in the Dialysis Center of the Bio-Bio Region. In both Dialysis Centers a specific biodiversity of normal species was found for this type of samples. The molecular analyzes of metagenomics showed that the main *phyla* found in both Dialysis Centers were: *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*, having a greater relative abundance, in both Dialysis Centers, the *Proteobacteria* group. It was possible to identify biofilm formation in RO membranes of water treatment systems for use in hemodialysis of both studied Dialysis Centers. The presence of bacterial endotoxins in treated water was determined in both Dialysis Centers, however the concentration of these endotoxins was less than 0,25 EU / mL which indicates that both Dialysis Centers studied comply with the regulations of the MINSAL for treated water.

This study aims to give scientific information about potential pathogens present in Dialysis Centers in Chile and therefore preventing possible bacterial outbreaks, and caring in this way patient's health.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Problemática y antecedentes

En las últimas décadas se ha reportado un incremento en la tasas de incidencia de enfermedad renal crónica terminal (ERCT) (Lysaght, 2002) a nivel mundial. En Chile hasta el año 2018 se registró un total de 253 Unidades de Hemodiálisis Crónica (HDC), entre Centros privados y hospitales, los cuales albergan alrededor de 22.310 pacientes que requieren realizar este tipo de tratamiento. La región Metropolitana de Santiago cuenta con 93 Unidades HDC donde se tratan 8.681 pacientes, la región de Valparaíso cuenta con 26 Unidades HDC donde se tratan 2.337 pacientes, en contraste con la región del Bío-Bío, donde existen 24 Unidades HDC donde se tratan 2.086 pacientes, siendo esta última la tercera región con mayor incidencia de pacientes con ERCT. Sin embargo, la región de Valparaíso tiene el mayor índice de mortalidad producto de ERCT (Poblete, 2018). El principal tratamiento para este tipo de enfermedad es la hemodiálisis (HD) que consiste en una técnica que sustituye las funciones principales del riñón, haciendo pasar la sangre a través de un filtro (funcionando como riñón artificial) donde se realiza su depuración, retornando nuevamente al paciente libre de impurezas. Los pacientes que cursan con hemodiálisis están expuestos a una alta cantidad de agua de forma intravenosa (120 L aproximadamente) en una sola sesión de HD (Kashiwagi *et al.*, 2011), lo cual puede implicar una fuente de contaminación bacteriana importante si el agua no tiene las condiciones microbiológicas adecuadas. Es por esta razón que el control de calidad en el tratamiento de aguas para uso clínico, específicamente para hemodiálisis, ha cobrado importancia en los últimos años tanto en salud pública como privada debido a que se han reportado numerosos casos de complicaciones de carácter agudo o crónico en la salud de pacientes que cursan HD, causadas por contaminaciones microbianas (Figel *et al.*, 2015) y químicas. Debido a los avances tecnológicos, el tratamiento de aguas para HD ha evolucionado en cuanto a la

importancia en la exigencia de la calidad del agua para diálisis con respecto a la cantidad de compuestos químicos y microorganismos presentes, lo cual antiguamente no estaba completamente esclarecido. Esto ocurría en parte porque hasta la década de 1960, la HD no era masiva y los pacientes con falla renal sólo podían acceder a un número limitado de tratamiento. Además la calidad del agua para HD se controlaba solamente por parámetros como temperatura y conductividad de la fuente de agua no tratada usada para diálisis (Ward, 1997). Actualmente la restricción en las concentraciones de los componentes químicos del agua para HD, la utilización de barreras microbiológicas y tipos de membranas de OI de mayor especificidad, en cuanto al tamaño de las partículas que se quiera filtrar, ha permitido obtener agua para HD con un grado de pureza similar al exigido para soluciones empleadas en infusión intravenosa (Pérez-García *et al.*, 2016). Sin embargo, continúan produciéndose contaminaciones ya sea de carácter microbiológico por la presencia de bacterias con capacidad de producir toxinas pirogénicas, bacteremias, y contaminaciones químicas por la presencia de compuestos inorgánicos (e.g. Aluminio) y compuestos orgánicos (e.g. monoclóraminas) por encima de los límites establecidos. La Farmacopea Europea y la AAMI establecieron que la contaminación microbiológica del agua ultrapura para uso en HD debe cumplir con un recuento bacteriano menor a 10 UFC/100mL y menos de 0,03 UE/mL de endotoxinas (ET); y un recuento bacteriano inferior a 100 UFC/mL y menor a 0,25 UE/mL para endotoxinas en agua purificada. En Chile, el Reglamento sobre las prestaciones de diálisis y los establecimientos que las otorgan aprobado por el Ministerio de Salud en 2017 es más tolerante en comparación a las normas internacionales anteriormente mencionadas y recomienda un recuento bacteriano acorde a la calidad microbiológica solamente de agua purificada en el agua osmosada inferior a 100 UFC/mL y menor a 0,25 UE/mL para endotoxinas.

En toda Unidad de HD, existen estanques de acumulación de agua potable cuyo suministro alimenta los sistemas de pretratamiento de aguas. Las condiciones de operación de estos estanques permitiría la potencial contaminación del agua almacenada, con bacterias ambientales (Pérez-García *et al.*, 2016). Esta

agua luego de pasar por una serie de procesos fisicoquímicos, destinados a su purificación, es sometida a tratamiento por ósmosis inversa (OI) (Coulliette y Arduino, 2013), la cual permitiría remover un 99% de las bacterias presentes en el sistema (Flemming *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos estudios reportan que dentro de las membranas de OI, los microorganismos formarían biopelículas sobre los soportes poliméricos de fluoruro de polivinilideno (PDVF) generando un mal funcionamiento de estas membranas (Khan *et al.*, 2011; Herzberg y Elimelech, 2007), permitiendo el traspaso de bacterias y/o componentes celulares (endotoxinas), potencialmente dañinos para la salud de pacientes sometidos a este tratamiento (Park y Hu, 2010; Arduino, 2007). Por esto se hace necesaria la evaluación de bacterias presentes en estos sistemas de tratamiento de agua, a fin de identificar los puntos críticos del proceso. Este sistema de tratamiento de agua potable debe estar presente en toda unidad de diálisis y su importancia radica en remover contaminantes tanto químicos como microbiológicos por debajo de los límites establecidos permitidos por las normas internacionales como la Farmacopea Europea y la Asociación para el Avance de la Instrumentación Médica (AAMI), entre otros, con la finalidad de asegurar la obtención de agua de calidad para HD y de esta forma evitar poner en riesgo la salud de pacientes con enfermedad renal crónica terminal, dado que entra en contacto directo con la sangre del paciente.

El biofouling asociado a membranas de ósmosis inversa es un problema frecuente que ocurre durante el proceso de tratamiento de agua (Vrouwenvelder y van der Kooij, 2002). Es causado por la deposición, adhesión y proliferación de microorganismos en la superficie de las membranas de OI, donde se forman las biopelículas, lo cual presenta un desafío para el correcto funcionamiento de las membranas de OI. Este hecho perjudica la calidad del agua que se desea obtener, ya que altera el correcto funcionamiento del proceso de OI, el cual se ha descrito como el principal removedor de microorganismos en todo el sistema de tratamiento de agua.

En general, las membranas de OI retiene un 99% de las bacterias en un sistema de tratamiento de agua (Park y Hu, 2010). Al formarse biopelículas en las

membranas de OI, estas podrían posiblemente obstruirse (Hijnen *et al.*, 2009) y permitir el potencial traspaso de bacterias hacia el permeado. El biofouling ha sido considerado como uno de los principales factores que contribuyen a más del 45% de todas las incrustaciones de membranas (Komlenic, 2010), lo cual puede presentar diversos efectos adversos en sistemas de membranas tales como: disminución del flujo transmembrana debido a la formación de biopelícula de baja permeabilidad en la superficie de la membrana, se necesita una mayor presión diferencial y presión de alimentación para mantener la misma tasa de producción de agua osmosada (permeado) debido a la resistencia de la biopelícula (Abd El Aleem *et al.*, 1998), biodegradación de la membrana por efecto de sub productos ácidos que se concentran en la superficie de la membrana (Murphy *et al.*, 2001), aumento del paso de sales a través de la membrana lo cual reduce la calidad del agua tratada debido a la acumulación de iones disueltos en la biopelícula presente en la superficie de membrana y aumento en el consumo de energía de la planta debido a que se requiere una mayor presión para superar la resistencia hidráulica generada por la formación de la biopelícula y la disminución en el flujo transmembrana (Ridgway, 1991).

Se ha demostrado que el fouling de las membranas, por efecto de material particulado y coloidal, puede ser potencialmente reducido utilizando opciones de pretratamiento (Ridgway y Flemming, 1996), sin embargo en la práctica, la remoción de todos los microorganismos previo al proceso de OI no es posible, lo cual favorece la adherencia de bacterias, crecimiento y formación de biopelículas en las membranas OI, lo cual afecta el funcionamiento del sistema. El biofouling de estas membranas requiere mayor frecuencia en los ciclos de limpieza, lo cual acorta la vida útil de la membrana generando un incremento en los costos operacionales y de mantenimiento de la planta de tratamiento de agua. La biopelícula generada dificulta los procedimientos sanitarios y es muy difícil de removerla (Al Ashhab *et al.*, 2017). Además se ha demostrado que el biofouling puede alterar la superficie química de la membrana OI, permitiendo un estrechamiento de los canales de flujos a través de la superficie de la membrana de OI (Khak y Ihm, 1999). Diversos estudios

avalan la formación de biopelículas en membranas de OI. Bereschenko *et al.* (2008) demostraron que la comunidad bacteriana presente en la biopelícula que se forma en las membranas de OI era diferente de las demás comunidades bacteriana presentes en otras ubicaciones del sistema de tratamiento de agua, lo cual indica el desarrollo de una comunidad bacteriana especializada en las membranas OI. Sin embargo, las abundancias relativas de las diferentes especies presentes en la biopelícula madura formada en la membrana de OI fueron diferentes de aquellas presentes en el agua de alimentación, lo cual indica que la biopelícula se formó activamente en las láminas de las membranas OI y no fue un resultado de la concentración de las bacterias presentes en el agua de alimentación. Diversos estudios han demostrado que el *Phylum* de mayor abundancia en membranas de ósmosis inversa son *Proteobacterias* y *Firmicutes* (Chen *et al.*, 2017; Shahryari *et al.*, 2016; Bereschenko *et al.*, 2008).

Bajo este marco teórico, este trabajo propone evaluar y caracterizar la formación de biopelícula bacteriana potencialmente patógena en membranas de OI y detectar la presencia de endotoxinas dentro de un sistema de tratamiento de agua, a gran escala, para uso en hemodiálisis.

## **1.2 Plantas de tratamiento de agua para hemodiálisis**

Un sistema de tratamiento de aguas para uso en hemodiálisis se define como el conjunto de dispositivos de purificación del agua potable para su uso en HD (Bonnie-Schorn *et al.*, 1999). Los procesos para el tratamiento de agua para HD, de acuerdo a la Asociación para el Avance de la Instrumentación Médica (AAMI), se clasifican en dos tipos: a) el Pretratamiento, donde algunos de los constituyentes del agua potable ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) son removidos para proteger los componentes de tratamiento y b) Tratamiento del Agua incluye un proceso de ósmosis inversa con o sin presencia de tanques de desionización (DI). La ósmosis inversa es el proceso de separación por una membrana semipermeable para purificar

el agua basado en un tamizado y un rechazo iónico (Bonnie-Schorn *et al.*, 1999). Para lograr la ósmosis inversa se aplica una presión externa para vencer la presión osmótica, que es una propiedad coligativa producida por diferencias de potencial químico del solvente, un parámetro termodinámico, y de esta forma invertir el flujo natural del solvente. La OI tiene la capacidad de excluir iones metálicos, sales solubles y otras moléculas del agua a tratar. La ultrafiltración y el uso de filtros de retención de endotoxinas pueden ser incluidos inmediatamente después del tanque de almacenamiento y/o antes del sistema de distribución que dirige el agua tratada hacia los dializadores (Ward, 2004) con la finalidad de remover bacterias y endotoxinas mediante el uso de filtros con superficie positivamente cargada y exclusión por tamaño.

El proceso de tratamiento de aguas para HD consta de dos etapas. El Pretratamiento incluye un Sistema de Filtración Profunda Multimedia, compuesto de arenas de distintos tamaños, que permita remover sólidos presentes en el agua potable; Filtros de Carbón Activado Granular, que adsorbe materia orgánica; un intercambiador catiónico (ablandador), que reduzca la presencia de cationes polivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ); un Pre-filtro que remueva partículas remanentes (por ejemplo, filtro de 5  $\mu\text{m}$ ) previo al tratamiento. Los sistemas de pretratamiento son instalados previo al equipo de OI (que contiene un número variable de membranas) para reducir la carga orgánica e inorgánica de materia coloidal y particulado en la membrana y además minimizar problemas operacionales asociados. Una estrategia efectiva de pre-tratamiento surge como un requerimiento crucial para reducir el nivel de biofouling en las membranas y por ende el costo asociado al tratamiento de aguas (Ghaffour *et al.*, 2013). Sin embargo, el biofouling puede ocurrir de forma extensa en las membranas, incluso después que el agua de alimentación haya sido pretratada y sanitizada con cloro (Matin *et al.*, 2011). Es básico tener presente los problemas que el Pretratamiento puede generar en etapas posteriores: el cloro libre puede dañar las membranas de OI mediante oxidación de éstas (Park y Hu, 2010), la presencia de calcio puede saturarlas, o pasar estos elementos a la red de distribución y, por tanto, llegar hasta el paciente. La

contaminación bacteriana ocasionada por la biopelícula no es el único motivo de preocupación: estas colonias bacterianas inducen reacciones de óxido-reducción y cambios de pH en la superficie de membrana donde se han adherido, ocasionando una corrosión microbiana de estas superficies (Bonnie-Schorn *et al.*, 1999).

El equipo de ósmosis inversa genera un permeado que se define como el fluido que ha pasado a través de un dispositivo de tratamiento (como un módulo o cartridge donde se ubican las membranas de OI) y se ha purificado correctamente. Por el contrario el agua de rechazo o concentrado, es el agua que no ha pasado a través de las membranas OI y que concentra la totalidad de contaminantes microbiológicos y químicos (Pérez-García *et al.*, 2016). La calidad del agua para uso en HD puede aumentarse considerando una segunda osmosis en serie o en línea o en su defecto un equipo electrodeionizador. Luego para realizar la etapa de post-tratamiento se sugiere utilizar un equipo de luz ultravioleta (UV) ubicado después del estanque acumulador de reserva de agua tratada, además de un Sistema de Filtros que retengan fragmentos bacterianos como endotoxinas. La lámpara UV produce acción bactericida (Amato, 2001) generando lisis bacteriana y liberación de ET al agua tratada. Los materiales que conforman el sistema de distribución de agua osmosada comprenden el uso de cañerías de distribución las cuales no deben contribuir a la contaminación química del agua y deben ser compatibles con los diferentes desinfectantes a utilizar en su mantención. Las cañerías deben ser continuas evitando empalmes y acodaduras. El agua tratada no deberá entrar en contacto con metales debido a la condición acida que podría adquirir ésta. La cañería principal deberá mantener un flujo turbulento que impida el estancamiento y su conexión hasta los monitores de diálisis deberá ser de la menor longitud posible, asegurando una velocidad mayor a 1 m/seg para evitar la contaminación y el riesgo de formación de biopelículas.

### 1.3 Biofouling en membranas de ósmosis inversa

Las etapas determinantes en la formación del biofouling:

#### a) Transporte de los microorganismos hacia la membrana de ósmosis inversa

Las fuerzas que transportan bacterias hacia una superficie de membrana han sido estudiadas por Marshall y Blainey (1991). Las fuerzas dinámicas de fluidos son el principal mecanismo para transportar bacterias hacia la superficie de membranas. En membranas OI de configuración en espiral (TFC), los espaciadores ubicados entre las envolturas de membranas están diseñados para promover turbulencia y ayudar a transportar el agua de alimentación de vuelta al flujo masivo. Sin embargo, al generarse turbulencia surgen áreas de bajo flujo de agua justo aguas debajo de cada travesaño en el espaciador, y por tanto el biofouling puede desarrollarse en estas áreas (Milstead y Riley, 1993). La materia orgánica y las bacterias atrapadas en el espaciador quedan retenida allí hasta que cambie el patrón del flujo. Mientras esto ocurre, otras fuerzas están en operación. Por ejemplo, el movimiento Browniano favorece el transporte de células no móviles hacia la vecindad de la superficie de membrana, mientras que células móviles que presentan quimiotaxis pueden avanzar hacia la superficie de membrana donde existe concentración de nutrientes (Wilbert, 1997).

#### b) Adhesión bacteriana y formación de biopelículas en superficie de membrana de ósmosis inversa

La adhesión de las células bacterianas en la superficie de la membrana constituye el primer paso en el biofouling de membrana (Flemming y Schaule, 1988), lo cual conduce hacia la formación de la capa de biopelícula. La biopelícula puede estar compuesta por poblaciones de diferentes tipos de microorganismos (por ejemplo, virus, bacterias, algas, protozoos y hongos), siendo bacterias las más

descritas en la literatura. La adhesión bacteriana inicial es mediada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Bendinger *et al.*, 1993), seguida por crecimiento y multiplicación celular a expensas de nutrientes solubles presentes en el agua de alimentación o compuestos orgánicos adsorbidos en la superficie de membrana (Costerton *et al.*, 1994). Las bacterias que conforman la biopelícula producen una matriz de exopolisacárido denominado sustancias poliméricas extracelulares (EPS) las cuales al ser excretadas, actúan como un soporte de anclaje celular para con el substrato, condicionando y estimulando aún más la colonización bacteriana en superficies (Marshall, 1985). La adhesión de bacterias a la superficie de membrana es afectada por ciertos factores tales como: material de la membrana (naturaleza del substrato) (Ridgway, 1991), rugosidad de superficie de la membrana (Park *et al.*, 2005), hidrofobicidad y carga en la superficie de membrana (Daniels, 1980). Mc Eldowney y Fletcher (1986) demostraron que la adhesión bacteriana se incrementa cuando aumenta la concentración de electrolitos; sin embargo otros autores (Ridgway *et al.*, 1985; Donlan y Pipes, 1988) demostraron que no había una correlación significativa entre la adhesión bacteriana inicial y la concentración de electrolitos en el medio. Ridgway *et al.*, (1985) encontraron que el pH tiene un bajo efecto en la adhesión de bacterias a la superficie de membranas de acetato de celulosa. De manera similar, Sadr Ghayeni *et al.*, (1998), reportaron que la adhesión inicial a membranas de OI, por parte de tres bacterias de aguas residuales pertenecientes al género *Pseudomonas*, no estaba afectado por el pH en el rango 4-8, pero se veía influenciado por la fuerza iónica del agua de alimentación, determinado que un medio con baja fuerza iónica puede reducir la adhesión de bacterias.

La formación de la biopelícula, en una membrana de OI, ocurre de la siguiente manera: a) primero debe ocurrir una adsorción de especies orgánicas y partículas en suspensión sobre la superficie de la membrana húmeda lo cual genera un acondicionamiento del substratum, b) transporte de células bacterianas hacia el substratum acondicionado, c) adhesión de las células bacterianas en la superficie de la membrana, d) crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos

adheridos y desarrollo de la biopelícula y e) limitación del crecimiento de la biopelícula por efecto de fuerzas de corte de fluido (*Shear Forces*) lo cual gatilla el proceso de des-adhesión de bacterias viables y no viables, para lograr un estado estable de resistencia al biofouling (Al-Ahmad *et al.*, 2000). En general, bacterias presentes en aguas de alimentación para sistemas de OI están sometidas a transporte hacia la superficie de membrana donde inicialmente ocurre una adhesión reversible. Posteriormente ocurre una adhesión irreversible asociada a la biosíntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). El crecimiento y multiplicación bacteriano a expensas de los nutrientes presentes en aguas de alimentación resulta en la formación de la biopelícula. La compleja formación de la biopelícula involucra comunicación celular (*quorum sensing*) y un gradiente de formación de funciones biológicas entre células ubicadas en diferentes zonas de la biopelícula, generándose de esta manera diferentes capas intercomunicadas entre sí. Finalmente una biopelícula completamente formada es capaz de desprender bacterias viables y restos de bacterias no viables a ubicaciones aguas abajo en la línea de tratamiento (Ridgeway, 2010; Hoek, 2013). Los microorganismos que conforman la biopelícula, están embebidos en una matriz de EPS hidratada que constituye su ambiente inmediato. En la mayoría de las biopelículas, los microorganismos aportan con menos del 10% del peso seco total de la biopelícula, mientras que la matriz de EPS, la cual es mayoritariamente producida por los propios microorganismos, aporta con más del 90% del peso seco (Flemming y Wingender, 2010). En la mayoría de las condiciones ambientales, los compuestos de carbono orgánico proporcionan los nutrientes para el crecimiento de microorganismos y aportan la energía necesaria a la biomasa. Una amplia variedad de compuestos orgánicos tales como ácidos carboxílicos, aminoácidos, carbohidratos y proteínas, favorecen el crecimiento bacteriano en ambientes acuáticos y la formación y crecimiento de biopelículas, provocando problemas operacionales en sistemas de tratamiento de agua tales como obstrucción del canal de alimentación por efecto de concentraciones de biopelícula tan bajas como del orden de microgramos por litro (Hijnen *et al.*, 2009).

c) Rol de sustancias poliméricas extracelulares en el biofouling de membranas de ósmosis inversa

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son mayoritariamente secreciones de alto peso molecular provenientes de microorganismos y consisten en diferentes sustancias orgánicas tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Tsuneda *et al.*, 2003). Los EPS unen microorganismos en una matriz tridimensional y de esta manera afectan las características físico químicas de los agregados bacterianos, tales como transferencia de masa, características de la superficie, capacidad de adsorción y estabilidad (Sheng *et al.*, 2010).

El EPS se distribuye en capa de profundidad variable a través de la biopelícula (Zhang y Bishop, 2001) y establece la integridad funcional y estructural de la biopelícula bacteriana y contribuye en forma significativa en la organización de la comunidad de la biopelícula (Branda *et al.*, 2005). El EPS contribuye a la estabilidad mecánica de la biopelícula, permitiéndole soportar fuerzas de corte considerables (Mayer *et al.*, 1999). Además, el EPS producido en una superficie sólida promueve la adhesión bacteriana alterando las características físico químicas de la superficie colonizada tales como carga, hidrofobicidad y aspereza (Gómez-Suárez *et al.*, 2002), generándose “andamios” con características físicas adecuadas y estructuras de poros interconectados que favorecen la adhesión celular (Chen y Ma, 2004). La adhesión celular a superficies sólidas es inhibida por interacciones electrostáticas a bajas concentraciones de lipopolisacáridos (LPS) y se incrementa por efecto de interacciones poliméricas a altas concentraciones de LPS (Tsuneda *et al.*, 2003).

#### **1.4 Bacterias asociadas a sistemas de tratamiento de agua para hemodiálisis**

Las bacterias son frecuentemente detectables en sistemas de tratamiento de agua para HD presentando un alto riesgo en la salud de los usuarios de las unidades HD, sobre todo si dichas bacterias se encuentran en alta concentración. Existe evidencia que avala la prevalencia de cierto tipo de bacterias infecciosas que llegan

al torrente sanguíneo de pacientes a través del agua osmosada (Arduino, 2007) tales como: *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Flavobacterium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. incluyendo *P. aeruginosa*, *Ralstonia picketti*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* y micobacterias no tuberculosas. Hongos tales como *Candida albicans* y *Phialemonium curvatum*, también han sido encontrados en sistemas de diálisis, pero son poco frecuentes y poco asociados a impactos en la salud. Sin embargo *Candida parapsilosis* si se ha asociado a infecciones del torrente sanguíneo (Rosenberg, 2005).

Estudios realizados por Chen *et al.* (2017), a partir de muestras de agua obtenidas en los diferentes segmentos que conforman la planta de tratamiento de agua demostraron la presencia de bacterias tales como *Bacillus cereus* y *Paenibacillus* sp., en el agua que ingresa a la planta de tratamiento, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Paenibacillus* sp., *Streptomyces caespitosus* y *Micrococcus lylae*, en el filtro de arena, *Bacillus beringensis*, *Bacillus korensis*, *Exiguobacterium* sp., *Rothia mucilaginosa*, *Acidovorax delafieldii*, *Hydrogenophaga* sp., y *Acinetobacter beijerinckii*, en filtros de carbón activado, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter* sp., *Stappia indica*, *Pelomonas* sp., *Halomonas* sp., *Brevundimonas aurantiaca*, *Novosphingobium* sp., *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus* sp., y *Tumebacillus algifaecis*, en el ablandador de agua, y finalmente *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia* sp., *Ralstonia pickettii* y *Herbaspirillum huttiense* subesp. *Putei*, en agua obtenida post ósmosis inversa. Estudios realizados por Shahryari *et al.*, (2016) demostraron que la mayor prevalencia de especies bacterianas obtenidas a partir de muestras de aguas de plantas de tratamiento de agua para HD en 5 hospitales de Irán, fueron *Pelomonas saccharophila*, *Sphingomonas adhaesiva*, *Bacillus subtilis*, *Dechloromonas agitata*, *Bacillus licheniformis* y *Porphyrobacter donghaensis*.

Cabe destacar que entre los brotes de infecciones por bacterias Gram negativas que se han reportado en unidades HD, la desinfección inadecuada del sistema de tratamiento de agua y de las líneas de distribución de agua se ha sugerido como una de las posibles causas (Pisani *et al.*, 2000; Arvanitidou *et al.*,

2003; Magalhães *et al.*, 2003), ya que existen microorganismos adaptados a un medio con baja concentración de nutrientes (oligotróficos) como el de los circuitos de agua tratada.

Actualmente la metodología clásica para el cultivo de bacterias heterótrofas en agua utiliza medios de cultivo pobres en nutrientes, como por ejemplo el Reasoner 2-agar (R2A) o el triptona-glucosa-extracto de carne-agar (TGS-agar) con tiempo de incubación de 1-7 días. Es debido a esto que las técnicas moleculares actuales cobran importancia en su potencial uso para la identificación bacteriana en un tiempo menor que con las técnicas convencionales (Shahryari *et al.*, 2016), favoreciendo un diagnóstico asertivo temprano.

El aporte de este trabajo es entregar evidencia científica formal sin precedentes para que los Centros de Diálisis a nivel nacional, tomen medidas preventivas y aborden mayores puntos de control en cuanto a sus procedimientos, y de esta forma evitar potenciales brotes infecciosos, resguardando de esta manera la salud de pacientes que cursan hemodiálisis.

## **1.5 Consecuencias de la presencia de biopelículas en la salud humana**

Las biopelículas son altamente resistentes a los desinfectantes empleados debido a la estructura de las comunidades bacterianas que se generan y al desarrollo de una matriz multicapa de exopolisacáridos que se adhiere a los soportes poliméricos. La prevención en el crecimiento inicial de una biopelícula es lo recomendable, y parte de esta táctica consiste en la elección apropiada de materiales que constituyen el sistema de distribución de agua para diálisis en combinación con una desinfección compatible (Coulliette y Arduino, 2013). Se ha demostrado que un diseño inadecuado del sistema de distribución de agua, sumado a métodos deficientes de desinfección, favorecen el crecimiento bacteriano de patógenos oportunistas y la formación de biopelículas en el sistema de tratamiento de agua. Las biopelículas actúan como una fuente de fragmentos bacteriano tales como DNA y ET, los cuales son liberados al agua en tratamiento y podrían

potencialmente penetrar las membranas de diálisis e ingresar al torrente sanguíneo de pacientes sometidos a HD (Kashiwagi *et al.*, 2011; Hoenich *et al.*, 2005).

Estudios han revelado que la mayoría de las cepas identificadas como *P. aeruginosa* son resistentes al proceso de desinfección utilizado en el sistema de distribución de agua (Tapia y Yee, 2006). Esto puede favorecer la adherencia bacteriana en las líneas de distribución de agua por formación de biopelículas.

Adicionalmente se demostró que los aislados de *P. aeruginosa* se adherían al plástico, demostrando la capacidad de éstas a formar biopelículas (Borgues *et al.*, 2007). La relevancia de la formación de biopelículas radica en una mayor resistencia a los procesos de desinfección y la constante presencia de microorganismos en los sistemas de tratamiento de agua para uso en HD, junto con la liberación de componentes celulares tales como endotoxinas. Esto caracteriza de esta manera el foco de contaminación (Rioufol *et al.*, 1999; Dasgupta, 2002; Cappelli *et al.*, 2003)

Por otro lado, bacterias Gram negativas, que producen ET y otras sustancias pirogénicas, aisladas desde el agua tratada, son capaces de pasar a la sangre a través de las membranas del dializador, activar a los monocitos, producir citoquinas y dar lugar a una inflamación crónica en el paciente. La presencia de contaminantes en aguas tratadas para uso en HD desencadena la liberación de marcadores de inflamación como la proteína C reactiva (PCR), interleuquinas (IL-6), fibrinógeno y moléculas de adhesión intercelular (sICAM-1) (Stenvinkel y Alvestrand, 2002). Las endotoxinas son sustancias con gran capacidad pirogénica, forman parte de la membrana externa de los microorganismos Gram negativos, específicamente el Lípido A del LPS, y pueden ser liberadas a la circulación por lisis bacteriana. Las sustancias pirogénicas son capaces de estimular a las células presentadoras de antígeno, fundamentalmente a los monocitos. Dichas sustancias tienen pesos moleculares inferiores a 10 kDa y, por tanto, podrían pasar las membranas de diálisis tanto por retrofiltración como por retrodifusión. Diversos estudios han demostrado que la utilización de agua ultrapura para la confección del líquido de diálisis (LD) ultrapuro contribuye en una serie de beneficios en la salud de pacientes sometidos a hemodiálisis.

El LD es un elemento fundamental de la HD y es una mezcla de bicarbonato en solución acuosa con agua pura o ultrapura proveniente de la planta de tratamiento de agua, la cual se pone en contacto con la sangre a través de la membrana semipermeable del dializador durante la sesión de HD. Esto permite el intercambio de sustancias, fundamentalmente solutos, con la sangre de forma bidireccional. El uso de LD ultrapuro se acompaña de una reducción del estado inflamatorio del paciente (Arizono *et al.*, 2004), reduciendo las necesidades de factores eritropoyéticos (Hsu *et al.*, 2004) y los niveles de B2 microglobulina (Furuya *et al.*, 2005), permitiendo mejorar el perfil lipídico y demieloperoxidasa (Honda y col., 2009; Tao y col., 2010). La activación de los monocitos y la apoptosis disminuyen al usar LD ultrapuro (Guo y col., 2011). De la misma manera su uso mejora la conservación de la función renal residual (Schiffl *et al.*, 2002) y el estatus nutricional (Schiffl *et al.*, 2001).

Por otro lado, el LD ultrapuro se asocia a un descenso de las endotoxinas vasculares, con lo que mejora la elasticidad vascular y disminuye la inflamación sistémica (Kwan *et al.*, 2013). Un estudio reciente muestra que el uso de LD ultrapuro en los pacientes en HD hace descender los marcadores de inflamación y estrés oxidativo, aumenta la albúmina sérica, la hemoglobina y disminuye los requerimientos de eritropoyetina (Susantitaphong *et al.*, 2013). Aunque esos resultados son marcadores subrogados, se puede inferir que debe de tener un beneficio cardiovascular. En otro estudio se ha encontrado una mayor supervivencia en los pacientes tratados con diálisis de alta permeabilidad cuando se usa un LD ultrapuro, comparado con un líquido convencional o puro (Asci *et al.*, 2013). El uso de LD ultrapuro debe ser obligado en los pacientes que están siendo dializados con membranas de alto flujo. El motivo es la evidencia de que su uso en estos pacientes mejora la supervivencia y disminuye los episodios cardiovasculares (Ouseph *et al.*, 2007; Stenvinkel *et al.*, 2008; Lederer *et al.*, 2002).

Se debe tener en cuenta que el propio tratamiento de agua y su sistema de distribución pueden ser fuente de contaminación. Así, las resinas de los descalcificadores y desionizadores o el carbón activado pueden ser fuente de

contaminación bacteriana, del mismo modo que el uso inadecuado de materiales como cobre o plomo en sistemas de distribución de agua o la presencia de restos de desinfectantes o desincrustantes, empleados en la desinfección del sistema de tratamiento, pueden ser causas de graves intoxicaciones.



## 1.6 HIPOTESIS DE TRABAJO

El presente trabajo plantea la siguiente hipótesis:

Bacterias presentes en sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis forman biopelículas sobre las membranas de ósmosis inversa, pudiendo traspasar bacterias potencialmente patógenas y/o componentes celulares (endotoxinas) hacia el agua osmosada, lo cual podría causar daño en la salud de pacientes sometidos a hemodiálisis.



## **1.7 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de bacterias en muestras obtenidas de sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis de Centros de Atención de Salud en Chile y caracterizarlas.

## **1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Aislar y caracterizar bacterias en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa utilizada en un sistema de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis.

2) Detectar la presencia de biopelículas bacterianas en membranas de ósmosis inversa de un sistema de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis.

3) Detectar la presencia de endotoxinas bacterianas en agua osmosada para uso en hemodiálisis.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Toma de muestra

Se obtuvo 1 L de muestras de agua en triplicado a la entrada (muestra obtenida del estanque de acopio de agua potable) y salida (muestra de agua obtenida de la toma de agua osmosada que se conecta al dializador) del proceso de OI de sistemas de tratamiento de agua dentro dos unidades de hemodiálisis, una perteneciente a la Región de Valparaíso y otra perteneciente a la Región del Bío-Bío, Chile. Dichas muestras de agua fueron almacenadas a 4°C. Las muestras de agua (3 L en total) fueron concentradas en filtros de nitrato de celulosa de 0,22 µm por medio de un sistema de filtración al vacío. Dichos filtros fueron sonicados tal como se describe a continuación. Alícuotas del sonificado se depositaron sobre la superficie de diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para su posterior aislamiento y recuento bacteriano.

Las muestras de las membranas de OI se obtuvieron de los Centros de Hemodiálisis mencionados anteriormente. Las membranas fueron cortadas en tres segmentos; inicial (A), medio (B) y final (C) como se indica en la figura 1, y almacenadas a 4°C dentro de bolsas de sellado al vacío para su posterior análisis.

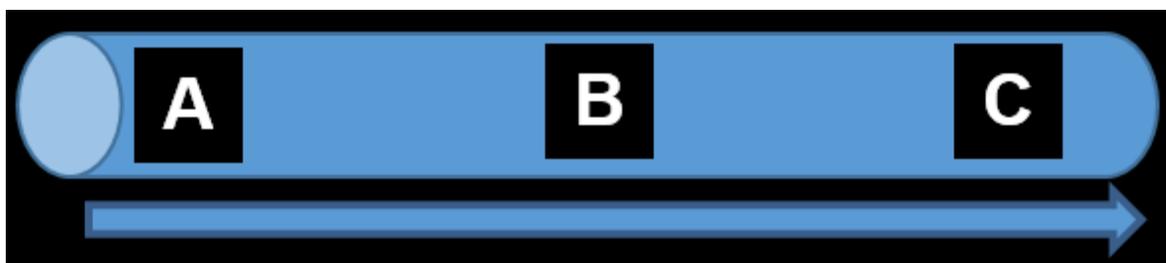


Figura 1. Esquema de muestreo en columna de osmosis inversa. La flecha indica la dirección del flujo del agua en la columna.

## **2.2 Aislamiento de bacterias en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa**

Las muestras de agua (3 L en total) fueron concentradas en filtros de nitrato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  por medio de un sistema de filtración al vacío. Dichos filtros fueron sonicados en tubos Falcon con 10 mL de buffer PBS 1X en pulsos de 3 y 2 minutos. Se sembraron por diseminación en superficie 100  $\mu\text{L}$  de sonificado en diferentes medios: agar R2A, agar cristal violeta, agar MacConkey, agar cromogénico, agar nutritivo y agar tripticasa. Dichos medios se incubaron por 24 - 48 h a 30°C para la posterior caracterización de bacterias obtenidas en los medios de cultivo. En caso de no haber crecimiento a las 24 h se dejó incubar por un máximo de 7 días. Cada muestra de membrana de OI (9  $\text{cm}^2$ ) fue sonicada en 10 mL de buffer PBS 1X en pulsos de 3 y 2 minutos. Los sonicados (100  $\mu\text{L}$ ) se sembraron como se mencionó anteriormente en placas con diferentes medios, los cuales se incubaron por 24 - 48 h a 30°C para su posterior caracterización.

Las colonias aisladas en medios selectivos para bacterias Gram negativas, fueron re-asiladas en placas con agar tripticasa, agar Macconkey y agar cromogénico para determinar diferencias o similitudes. Éstas se dejaron incubar a 30° C por 24 - 48 h. Se realizaron los respectivos ceparios a partir de las colonias re-asiladas en agar tripticasa.

## **2.3 Recuento bacteriano en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa**

Se realizó recuento total de bacterias heterótrofas mediante el método de diseminación en superficie utilizando para esto las muestras de agua antes y después del proceso de OI. Se filtraron 3L de muestras de agua utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y un sistema de filtración al vacío para forzar el paso del líquido a través del filtro. Luego se sonicó el filtro en 10 mL de buffer PBS 1X, se realizó dilución seriada del sonificado y se alicuotaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana la cual se sembró

en la superficie de una placa con agar R2A. Se realizó el mismo procedimiento con las membranas de OI. Se incubaron las placas a 30° C entre 1-7 días y los recuentos fueron expresados en UFC por mililitro de muestra (Pérez-García y col., 2016).

## **2.4 Identificación molecular de bacterias aisladas**

El ADN bacteriano de las cepas aisladas y caracterizadas fenotípicamente fue obtenido tomando una asada de colonias a partir de una placa de agar tripticasa, la cual fue inoculada en tubos Eppendorf libres de DNAasas con 1 mL de agua DEPC (Dietilpirocarbonato). El ADN de dicha suspensión bacteriana fue extraído mediante InstaGene™ Matrix (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para efectos de la amplificación del gen ADNr 16s a partir del ADN bacteriano extraído desde las cepas aisladas también se utilizaron partidores universales para el dominio bacterias EUB I (9-27f) y EUB II (1542r). El mix de PCR fue realizado en un volumen total de 50 µL, conteniendo 25 µL Dream Taq Green® PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 µL de los partidores EUB II (1542r a una concentración de 10 µM) y 1 µL de EUB I (9-27f a una concentración de 10 µM), 20 µL de DNA templado y 3 µL con agua DEPC (Dietilpirocarbonato).

Las condiciones para la PCR se basaron en una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos y finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron secuenciados en la Universidad Católica de Chile mediante el método de Sanger en un secuenciador ABI PRISM 3500 xl (Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas mediante el programa Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation) y analizadas mediante la plataforma bioinformática ARB Phylogenetic program (ARB Silva Database).

## 2.5 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislados obtenidos de muestras de agua y de membranas OI fue determinada utilizando técnicas de difusión estándar de disco de acuerdo a las recomendaciones de Clinical Laboratory Standards Institute (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2017). Las cepas aisladas anteriormente fueron sembradas en 5 mL de caldo tripticasa y se dejaron incubar por 18 h a 30° C. Se realizó dilución seriada del cultivo hasta llegar a una turbidez similar a 0,5 McFarland. Se sembraron los aislados en placas con agar Müller-Hinton y se ubicaron discos antibióticos en la superficie del agar. Los discos utilizados fueron Neo-Sensitabs (Rosco, Dinamarca): ampicilina (10 mg), cloranfenicol (30 mg), tetraciclina (30 mg), cefotaxima (30 mg), ciprofloxacino (5 mg), trimetoprim/sulfametoxazol (1.25 mg/23.75 mg) y gentamicina (10 mg). Las placas se dejaron incubar por la noche a 30°C y los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos. Se utilizó como control positivo de bacterias Gram negativas fermentadores la cepa *E. coli* ATCC 25922 y como control positivo de bacterias Gram negativas no fermentadores la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

## 2.6 Caracterización metabólica de la comunidad bacteriana presente en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis

Para el análisis metabólico se utilizó el kit BIOLOG EcoPlate™ siguiendo las instrucciones del fabricante (BIOLOG®, Hayward, CA, USA). (Garland y Mills, 1991). Biolog Ecoplate™ es un sistema de 96 pocillos los cuales contiene 31 fuentes de carbono y un pocillo control sin sustrato por triplicado. Los sustratos al ser metabolizados por las bacterias producen un color violeta por efecto de la reducción de sales de tetrazolium, el cual es medido por medio de un espectrofotómetro de placa a 590 nm. Se inocularon 150 µL de cada muestra de sonificado descrito en aislamiento bacteriano en cada pocillo los cuales fueron incubados a 30°C. Se midió la densidad óptica de cada pocillo a  $\lambda = 590$  nm durante 168 horas con intervalos de

24 horas (Garland, 1997), usando el lector de micro placas (Epoch™ de BIOTEK®).

Por medio de este kit se midieron varios índices como: desarrollo de color en los pocillos de las micro placas (AWCD), índice de Shannon-Weaver (H') y el índice de riqueza (R) ( $OD > 0,25$ ) (Haack *et al.*, 1990; Garland *et al.*, 1997). Estos índices fueron analizados en el software GraphPad Prism5®, utilizando ANOVA de una vía y Test de Tukey's con un parámetro de 95% de confianza. Las fórmulas de los índices se detallan en la Tabla 1.

Las fuentes de carbono fueron divididas según categorías como; carbohidratos (N=10), ácidos carboxílicos (N=9), aminoácidos (N=6), polímeros (N=4) y aminas (N=2) (Garland & Mills, 1991). Las fuentes de carbono fueron analizadas como los AWCD relativos (AWCD/AWCD0), el cual fue la razón entre el AWCD de cada fuente de carbono y el AWCD considerando todo los sustratos.

Tabla 1. Índices de los perfiles metabólicos.

Índices	Abreviación	Fórmula	Variables
<b>Desarrollo de color en los pocillos de las microplacas</b>	AWCD	$OD = C - R$ $\sum OD / N$	C= densidad óptica de cada fuente de carbono. R= densidad óptica del pocillo control. N= número de fuentes de carbono
<b>Shanon-Weaver</b>	H'	$-\sum p_i (\ln p_i)$	Pi= es la razón entre la actividad de cada sustrato (ODi) y la sumatoria de la actividad de todos los sustratos ( $\sum ODi$ ).
<b>Enriquecimiento</b>	R	$OD > 0,25$	*

## **2.7 Caracterización Molecular de la comunidad bacteriana presente en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis**

### *2.7.1 Extracción de ADN de comunidades bacterianas provenientes del agua y de membranas de ósmosis inversa*

Las muestras de aguas, antes y después del proceso de OI, fueron filtradas en filtros de nitrato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  por medio de un sistema de filtración al vacío. Dicho filtro se dividió en 4 trozos los cuales fueron introducidos por separado en cuatro tubos Eppendorf con 700  $\mu\text{L}$  de buffer PBS 1X. Los tubos fueron sonicados en pulsos de 3 y 2 minutos. Luego los filtros fueron removidos y los sonicados fueron centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos. Una vez formado el pellet se descartó el sobrenadante, se juntaron los pellets en un solo tubo Eppendorf los cuales fueron resuspendidos en 1 mL de buffer PBS 1X. Finalmente se procedió a extraer el ADN total de dichas muestras por medio de UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio laboratorios Inc.) según las instrucciones del fabricante.

Para el caso de la comunidad bacteriana adherida a las membranas de OI, se cortó una superficie 81  $\text{cm}^2$  de membrana (por cada muestra), la cual fue segmentada en trozos más pequeños. Dichos trozos se agregaron a tubos Falcon con 5 mL de buffer PBS 1X, los cuales fueron sonicados por 5 minutos, agitados por 5 minutos, sonicados por 5 minutos y agitados por 5 minutos. El sonicado obtenido fue centrifugado por 10 minutos a 9.000 x g. Una vez obtenido el pellet se descartó el sobrenadante. El pellet fue traspasado a un tubo Power Bead y el ADN total de dicha muestra fue extraído mediante Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio laboratorios Inc.) según las indicaciones del fabricante.

El ADN total extraído fue utilizado como templado para amplificar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el gen ADNr 16s y a partir de éste, amplificar la región V3 del gen ADNr 16s. Los productos de PCR de la región V3 del gen ADNr 16s fueron sometidos a una Electroforesis en Gel con gradiente

Denaturante (DGGE), el cual fue ejecutado en un gradiente de desnaturalización del 20% al 80% para los análisis de los índices ecológicos (León, 2013; Escalante y col., 2006).

Todo los ADN extraídos fueron almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis, amplificación y secuenciación.

### *2.7.2 Secuenciación masiva Illumina (NGS)*

El ADN total extraído de los diferentes segmentos de membrana OI y de muestras de agua fue cuantificado y enviados a la Unidad de Secuenciación Genoma Mayor, Universidad Mayor, Chile, para su secuenciación de segunda generación (NGS) mediante la plataforma de secuenciación Illumina. Sólo las muestras con un ADN no degradado, medido por electroforesis en gel de agarosa, y una concentración  $\geq 4$  ng/ $\mu\text{L}$ , medido por fluorimetría (Fluorometría QuantiFluor, Promega) calificaron para la elaboración de genotecas mediante el kit Amplicon Sequence 16S rRNA (Perkin Elmer). El tamaño, distribución e integridad de los fragmentos que conformaron las genotecas fueron analizados por un Bioanalyzer 2100 (Agilent). Posteriormente las genotecas fueron secuenciadas. Dichas secuencias fueron analizadas mediante el programa Metataxa 2.0 y de esta manera se elaboró la metagenómica de las comunidades bacterianas presentes en las muestras mencionadas.

### *2.7.3 Amplificación del gen ADNr 16s y de la región V3 del gen ADNr 16s*

Se amplificó por PCR el gen ADNr 16s a partir del ADN total extraído de comunidades bacterianas presentes en muestras de membrana de OI y agua. Para esto se utilizaron partidores universales para el dominio bacterias EUB I (9-27f) y EUB II (1542r). El mix de PCR fue realizado en un volumen total de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 25  $\mu\text{L}$  Dream Taq Green® PCR Master Mix (Thermo Scientific), 5  $\mu\text{L}$  de los partidores EUB II (1542r a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ ) y 5  $\mu\text{L}$  de EUB I (9-27f a

una concentración de 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de DNA templado y 14  $\mu$ L con agua DEPC (Dietilpirocarbonato).

Las condiciones para la PCR se basaron en una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos y finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se utilizaron como templado los productos de PCR obtenidos con partidores EUB a partir del ADN total extraído y se amplificó la región V3 del gen ADNr 16s. Se utilizaron los partidores P3 (338f) y P2 (534r). El partidor P3 estaba enriquecido con 40 bases de GC para permitir la separación de las bandas en el DGGE (Tabla 2). La mix de PCR de la región V3 fue realizada en un volumen total de 50  $\mu$ L, conteniendo 25  $\mu$ L Dream Taq Green® PCR Master Mix (Thermo Scientific), 5  $\mu$ L de los partidores P2 (534r una concentración de 10  $\mu$ M) y 5  $\mu$ L de P3 (338f a una concentración de 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de DNA templado y 14  $\mu$ L con agua DEPC (Dietilpirocarbonato). Se realizó una PCR-Touchdown siguiendo las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 20 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 61°C por 45 segundos (la temperatura de alineamiento fue decreciendo 0,5°C en cada ciclo hasta llegar a 51°C) y elongación a 72°C por 90 segundos, finalmente se realizarán 10 ciclos de: denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 51°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos.

Tabla 2. Secuencia de partidores y tamaño de los fragmentos amplificados del gen ADNr 16s y región V3 del mismo gen.

Partidores	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
<b>EUB I</b>	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	1533 pb	Wang <i>et al.</i> , 2008
<b>EUB II</b>	5'-AGG GAG TGA TCC ANC CRC A-3'		
<b>P3</b>	5'-40 GC+TAG GGG AGG CAG CAG-3'	193 pb	Wang <i>et al.</i> , 2008
<b>P2</b>	5'ATT ACC GCG GCT GG-3'		

#### 2.7.4 Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante (DGGE)

Para el análisis de la región V3 del ADNr 16s se prepararon geles con una concentración de agente denaturante del 20% al 80%. Para esto se utilizaron 13 mL de cada solución stock (al 20% y al 80%) para la formación del gradiente (Tabla 3). Para lograr la polimerización de la poliacrilamida se agregó a cada solución stock, 130  $\mu$ L de persulfato de amonio (BioRad®) al 10% y 13  $\mu$ l de N'-Tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (BioRad®). El gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente denaturante proporcionado por el fabricante del equipo, siguiendo sus indicaciones. Se cargaron en cada carril 12  $\mu$ L de los productos de la amplificación con los partidores P2-P3, mezclado con 3  $\mu$ L de buffer de carga a una concentración 6x obteniendo una proporción 4:1. Esta mezcla fue cargada en los geles denaturantes por medio de una jeringa Hamilton.

Tabla 3. Composición de soluciones stock de DGGE.

	20%	80%
<b>Acrilamida Bis 40%</b>	9,4 mL	9,4 mL
<b>TAE 50X</b>	1 mL	1 mL
<b>Formamida</b>	4 mL	16 mL
<b>Urea</b>	4,2 g	16,8 g

Aforar a 50 mL con agua DEPC

La técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante se realizó en el equipo DGGE-1001 (C.B.S Scientific Company®). Este equipo posee una cámara de electroforesis vertical cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA, pH 8,3 a 25°C). El casete que contiene los geles fue embebido en esta solución. La electroforesis fue corrida a 85 V por 15 horas a 60°C. El gel fue teñido con una solución de SYBR Gold Nucleic acid gel stain (Molecular Probes Invitrogen®) al 0,05% durante 1 hora en oscuridad. Posteriormente se visualizaron las bandas en UltraBright LED Transilluminator, 470nm (LB-16 MAESTROGEN) y se fotografiaron

con una cámara Canon PowerShot G12 de 10.0MP en formato RAW, para así obtener un registro de los patrones de las bandas de cada muestra y su posterior análisis informático.

Los patrones únicos de DGGE o Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU's) se examinaron usando el índice de diversidad H (Shannon y Weaver, 1963) para indicar aspectos de la diversidad microbiana.

Las imágenes del gel fueron reconstruidas con software Photoshop CS6.v13.0 (Adobe). Las bandas del DGGE del producto V3, se analizó usando el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, describiéndose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel. Para la comparación se construyó una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda individual por cada columna. Para la comparación de perfiles de banda, se construyó una matriz binaria que representa los patrones de las bandas, los cuales son usados para la construcción de una matriz de distancia. La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada *fingerprint* de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas (Guzmán, 2014). Un análisis de clustering y MDS se llevaron a cabo con el PRIMER V6 software package (Clarke y Gorley, 2001).

## **2.8 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Se visualizó la presencia de biopelículas en la membrana de ósmosis inversa por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). El tratamiento de la muestra implicó lavado, fijación y secado de un trozo de membrana de OI. Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces con solución tampón salino-fosfato (PBS, pH 7,4) y dispuestas en capas sobre cubreobjetos recubiertos con polisina. La fijación se realizó mediante el fijador de Karnovsky modificada (2% de paraformaldehído y glutaraldehído al 3% en tampón 0,1 M de fosfato de sodio, pH 7,4). Las muestras

fueron lavadas de nuevo con PBS y agua destilada. Las células fijadas fueron deshidratadas a través de una serie de alcohol etílico (30, 50, 70, 90 y 100%) y, finalmente, en capas con alcohol de t-butilo para la liofilización y la pulverización iónica de recubrimiento. Las muestras se visualizaron bajo un JEOL JSM 6380LV SEM (Torres *et al.*, 2012). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Concepción.

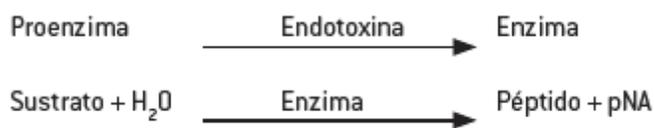
## 2.9 Prueba de lisados de amebocitos de *Limulus* (LAL)

Con la finalidad de detectar endotoxinas presentes en las muestras de agua osmosada, se realizó la prueba LAL. Para esto se utilizó un kit comercial Kinetic-QCL™ (LONZA) el cual es un ensayo cinético y cuantitativo para la detección de endotoxina bacteriana Gram negativa. Se mezcló una muestra de agua osmosada con el reactivo LAL/sustrato, la cual se colocó en el lector de microplacas de incubación que detecta automáticamente a lo largo del tiempo la aparición de un color amarillo. El tiempo necesario antes de la aparición del color amarillo (tiempo de reacción) es inversamente proporcional a la cantidad de endotoxina existente. Es decir, con la presencia de una cantidad de endotoxina de hasta 50 UE/mL, la reacción aparece rápidamente, pero con una cantidad de endotoxina cercana a 0,005 UE/mL, aumenta el tiempo de reacción. El rango de sensibilidad de este kit es de 0,005 - 50 UE/mL. La concentración de endotoxina en muestras desconocidas puede calcularse a partir de una curva patrón utilizando como estándar endotoxinas de *E. coli* (O:113: H10).

La utilización de LAL para la detección de endotoxinas evolucionó a partir de la observación realizada por Bang (1956) en la que infección por bacterias Gram negativas en *Limulus polyphemus*, el cangrejo herradura, causó una coagulación intravascular mortal. Se demostró posteriormente que esta coagulación fue el resultado de una reacción entre la endotoxina y una proteína coagulable en los amebocitos circulantes de *Limulus* (Levin y Bang, 1964). Luego a partir del desarrollo de un anticoagulante adecuado para la sangre de *Limulus*, se preparó un lisado a

partir de amebocitos lavados, lo cual fue un indicador sensible de la presencia de endotoxinas (Levin y Bang, 1964). Finalmente se logró purificar y caracterizar la proteína coagulable de LAL y se demostró que la reacción con la endotoxina era enzimática (Solum, 1970; Solum, 1973; Young *et al.*, 1972).

El método actual de LAL utiliza la parte inicial de la reacción de la endotoxina de LAL para activar una enzima, que, a su vez, libera p-nitroanilina (pNA) desde un sustrato sintético, lo que produce un color amarillo. El principio se basa en la siguiente reacción:



Las endotoxinas de bacterias Gram negativas catalizan la activación de la proenzima en el LAL (Young, Levin & Prendergast, 1972). La tasa inicial de activación viene determinada por la concentración de endotoxina presente. La enzima activada cataliza la liberación de pNA del sustrato incoloro Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. La pNA libre se mide fotométricamente, a 405 nm de forma continua durante todo el período de incubación. La concentración de endotoxinas en una muestra se calcula comparando su tiempo de reacción con una curva patrón.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Recuento de bacterias en muestras de agua y membranas de ósmosis inversa

Como se puede apreciar en la figura 2, se realizó recuento bacteriano, por técnica de diseminación en superficie, de bacterias presentes en membranas OI y en muestras de agua de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso. El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas al comparar las muestras ( $P < 0,0001$ ). Con respecto a las bacterias presentes en los diferentes segmentos de membrana OI se determinó que  $HN A > HN C > HN B$  en cuanto al recuento de células viables. Con respecto a las muestras de agua no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre HN AP y HN AO en cuanto al recuento de células viables.

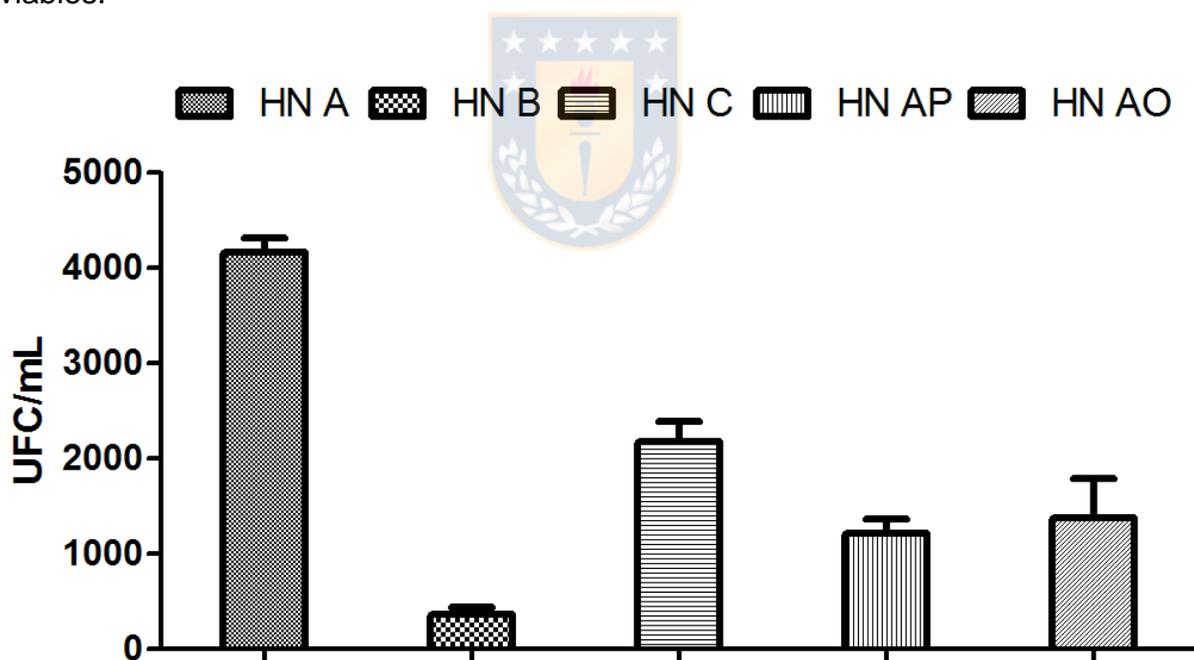


Figura 2. Recuento de bacterias viables en segmento inicial (HN A), medio (HNB) y final (HN C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HN AP) y agua de salida (HN AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso, Chile.

En la figura 3 se muestra recuento bacteriano por técnica de diseminación en superficie de bacterias presentes en membranas OI y en muestras de agua de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío. El análisis estadístico indicó que hay diferencias significativas al comparar las muestras ( $P=0,0004$ ). Con respecto a las bacterias presentes en los diferentes segmentos de membrana OI se determinó que  $HC A > HC B$  y que  $HC C > HC B$  en cuanto al recuento de células viables. HC A no presentó diferencias significativas ( $P>0,05$ ) con respecto a HC C por lo cual se considera que tienen recuentos bacterianos similares. Con respecto a las muestras de agua se encontró que existen diferencias significativas ( $P<0,0004$ ), siendo  $HC AO > HC AP$  en cuanto al recuento de células viables.

Al comparar estadísticamente cada segmento de membrana OI del Centro de Diálisis perteneciente a la Región de Valparaíso con los del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío se observó que HN A con respecto a HC A; HN B con respecto a HC B; y HN C con respecto a HC C, no presentaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) en cuanto al recuento de células viables. Al realizar el mismo análisis, pero con las muestras de agua se determinó que en todas las comparaciones habían diferencias significativas ( $P<0,0001$ ). HN AP presentó un recuento bacteriano significativamente mayor que HC AP y HN AO presentó un recuento bacteriano significativamente menor que HC AO.

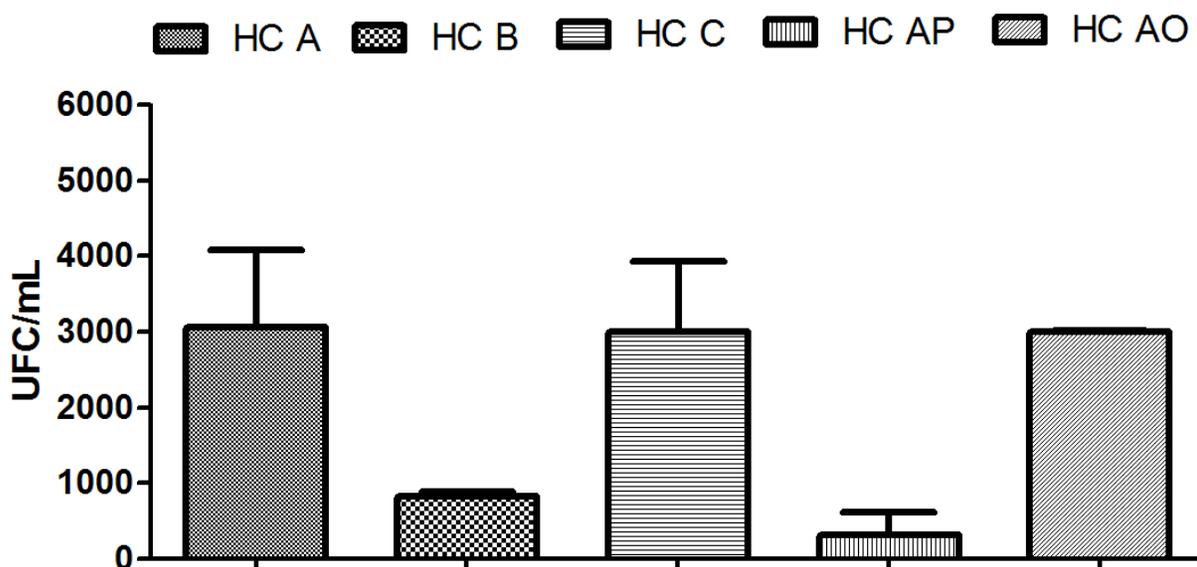


Figura 3. Recuento de bacterias viables en segmento inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HC AP) y agua de salida (HC AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, Chile.

### 3.2 Antibiogramas

De acuerdo a los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana aplicados a las cepas aisladas se encontró que de un total de 15 cepas aisladas desde muestras de agua y membranas de OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso, un 73% de los aislados era resistente a ampicilina, un 33% era resistente a cloranfenicol, un 27% era resistente a tetraciclina, un 60% era resistente a cefotaxima, 0% era resistente a ciprofloxacino, un 20% era resistente a sulfametoxazol/trimetoprim y un 40% resistente a gentamicina.

Para efectos de un total de 14 cepas aisladas desde muestras de agua y membranas de OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío se encontró que un 64% de los aislados era resistente a ampicilina, un 43% era resistente a cloranfenicol, un 21% era resistente a tetraciclina, un 43% era resistente a cefotaxima, un 21% era resistente a ciprofloxacino, un 57% era resistente a

sulfametoxazol/trimetoprim y un 21% resistente a gentamicina. Dicha estadística fue realizada a partir de la tabla IV que se muestran a continuación.

Tabla 4. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de cepas aisladas.

Cepa	AM 10	C 30	Te 30	CTX 30	CIP 5	TSX 25	GE 10
HN A 3	R	R	R	R	S	S	S
HN A 5	R	R	S	R	S	R	S
HN A 7	R	R	S	R	S	R	S
HN B 3	R	I	R	R	S	S	R
HN B 5	R	R	R	R	S	S	R
HN B 6	R	S	S	S	S	S	S
HN C 3	R	S	S	R	S	S	S
HN C 7	R	I	I	R	S	S	R
HN C 10	R	I	R	R	S	S	R
HN C 12	R	I	I	R	S	S	R
HN AP 4	S	R	S	S	S	S	S
HN AP 8	S	S	S	S	I	R	S
HN AP 10	I	S	S	S	I	S	S
HN AO 3	S	S	S	I	S	S	S
HN AO 7	R	I	S	S	S	S	R
HC A 1	S	S	S	S	R	S	S
HC A 4	S	S	S	S	R	S	S
HC A 9	R	I	S	R	S	R	S
HC B 1	S	S	S	S	S	R	S
HC B 3	R	R	R	I	R	R	R
HC B 7	R	R	S	I	S	R	S
HC C 3	R	I	S	R	S	R	S
HC C 7	R	R	S	R	S	R	S
HC C 9	R	I	S	R	S	R	S
HC AP 7	S	S	S	S	S	S	S
HC AP10	S	R	S	S	S	S	S
HC AO 3	R	R	R	R	S	S	R
HC AO 7	R	R	R	R	S	R	S
HC AO 12	R	S	S	S	S	S	R
<i>E. coli</i> ATCC 25922	R	S	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	R	R	R	R	S	R	S

**S:** Susceptible / **R:** Resistente / **I:** Susceptibilidad Intermedia

**Antibióticos:** **AM 10:** ampicilina (10 mg); **C 30:** cloranfenicol (30 mg); **Te 30:** tetraciclina (30 mg); **CTX 30:** cefotaxima (30 mg); **CIP 5:** ciprofloxacino (5 mg); **TSX 25:** trimetoprim/sulfametoxazol (1.25 mg/23.75 mg); **GE 10:** gentamicina (10 mg).

### 3.3 Identificación molecular cepas aisladas provenientes del agua y de membranas de ósmosis inversa

El gen ADNr 16s presente en el ADN bacteriano extraído a partir de 15 de los aislados obtenidos fue amplificado mediante PCR con los partidores EUB I (9-27f) y EUB II (1542r). Luego, los productos de PCR de tamaño aproximado de 1500 pb fueron enviados con su partidador forward EUB I (9-27f a una concentración 5  $\mu$ M) a la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde dichos amplicones fueron secuenciados por método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron procesadas por BLAST con un porcentaje de identidad de 96% - 98%. Se analizaron las secuencias relativas más cercanas por medio de Gen Bank y se encontró que los principales *phyla* fueron: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, tal como se puede apreciar en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencias relativas de cepas aisladas.

Cepa	Secuencia relativa más cercana	Phylum	Porcentajes de identidad (%)	Gen Bank no. acceso
HN A 3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	98	MH114031.1
HN B 5	<i>Pseudomonas veronii</i>	<i>Proteobacteria</i>	95	MH482963.1
HN B 6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Proteobacteria</i>	96	FN395264.1
HN C 3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Proteobacteria</i>	98	MG575921.1
HN C 12	<i>Pigmentiphaga kullae</i>	<i>Proteobacteria</i>	98	KR856352.1
HN AP 4	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	97	MH844635.1
HN AP 10	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	95	JQ316230.1
HN AO 7	<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroidetes</i>	96	CP008741.1
HC A 1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	98	MK883238.1
HC A 9	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	97	LC435711.1
HC B 1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Firmicutes</i>	98	MG996881.1
HC C 7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Proteobacteria</i>	98	EU434450.1
HC AP 7	<i>Pseudomonas poae</i>	<i>Proteobacteria</i>	97	MG835964.1
HC AO 3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	97	KP663381.1
HC AO 7	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	98	KY357351.1

### 3.4 Caracterización metabólica de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis

La caracterización metabólica fue realizada por medio del kit Biolog Ecoplate™ (Biolog®) el cual comprende 31 fuentes de carbono en triplicado, las cuales fueron metabolizadas por las bacterias presentes en membranas OI y en muestras de agua, generando un cambio de coloración en cada pocillo inoculado (color violeta), el cual fue medido a 590 nm. El ensayo fue realizado durante 96 h. Se obtuvieron a partir de las absorbancias medidas distintos índices de diversidad bacteriana tales como el índice de desarrollo de color en los pocillos de las microplacas (AWCD, de sus siglas en inglés), índice de Shanon-Weaver ( $H'$ ) y el índice de Enriquecimiento (R). Se evaluó diferencias estadísticamente significativas de estos índices mediante ANOVA de una vía y posteriormente Test de Tukey's con un intervalo de confianza de un 95%.

Las diferentes fuentes de carbono fueron agrupadas según la siguiente clasificación: carbohidratos (N=10), ácidos carboxílicos (N=9), aminoácidos (N=6), polímeros (N=4) y aminas (N=2). Las fuentes de carbono fueron analizadas a las 96 h de incubación, como los AWCD relativos (AWCD/AWCD<sub>0</sub>), que se define como la razón entre el AWCD de cada fuente de carbono y el AWCD considerando todo los sustratos. En la figura 4 se puede apreciar los AWCD/AWCD<sub>0</sub> de las diferentes fuentes de carbono metabolizadas por comunidades bacterianas adherida a membranas de OI y presentes en muestras de agua de un Centro de Diálisis perteneciente a la Región de Valparaíso.

Los análisis estadísticos indicaron que al comparar la oxidación de los carbohidratos por parte de las bacterias presentes en membranas OI, sí hay diferencias significativas siendo las comunidades bacterianas presentes en la sección media (HN B) de la columna de OI mayormente capaces de oxidar carbohidratos que la sección inicial de la membrana OI (HN A) ( $P=0,0395$ ). El resto de las comunidades adheridas a membranas OI (HN A con respecto a HN C y HN C con respecto a HNB) no presenta diferencias significativas, es decir son similares en

cuanto a su capacidad de oxidar carbohidratos ( $P > 0,05$ ). Con respecto a las bacterias presentes en agua de ingreso al sistema de OI (HN AP) y las bacterias presentes en el agua que sale del sistema de OI (HN AO) no se presentaron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de oxidar carbohidratos ( $P > 0,05$ ).

Al comparar la oxidación de ácidos carboxílicos por parte de las bacterias presentes en membranas OI, sí hay diferencias significativas entre las comunidades bacterianas presentes en las tres secciones analizadas de la columna de OI ( $P < 0,0001$ ). Ordenadas de mayor a menor,  $HN A > HN B > HN C$  en cuanto a su capacidad de oxidar ácidos carboxílicos. Con respecto a las bacterias presentes en agua de ingreso al sistema de OI (HN AP) y las bacterias presentes en el agua que sale del sistema de OI (HN AO) no se presentaron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de oxidar ácidos carboxílicos ( $P > 0,05$ ).

Los análisis estadísticos indicaron que no existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de oxidación de aminoácidos por parte de bacterias presentes en membranas OI de los tres segmentos de la columna de OI analizados (HN A, HN B y HN C) ( $P = 0,0796$ ). Por el contrario, bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI (HN AP) sí presentaron diferencias significativas con respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HN AO) en cuanto a su capacidad de oxidar aminoácidos ( $P < 0,0001$ ), siendo mayor su capacidad de oxidar aminoácidos en HN AP en comparación con HN AO.

Al comparar la oxidación de polímeros por parte de las bacterias presentes en membranas OI, sí hay diferencias significativas entre las comunidades bacterianas presentes en la sección inicial (HN A) con respecto a la sección final (HN C) de la columna de OI ( $P = 0,0255$ ), siendo HN C mayormente capaz de oxidar polímeros que HN A. Los otros segmentos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre ellos. Las comunidades bacterianas presentes en las muestras de agua no presentaron diferencias significativas en cuanto a la oxidación de polímeros ( $P > 0,05$ ).

Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de oxidación de aminas por parte de bacterias presentes en

membranas OI de la sección media (HN B) con respecto a la sección final (HN C) de la columna de OI ( $P=0,0326$ ), siendo HN C mayormente capaz de oxidar aminas que HN B. El resto de los segmentos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre ellos. Bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI (HN AP) no presentaron diferencias significativas con respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HN AO) en cuanto a su capacidad de oxidar aminoácidos ( $P>0,05$ ).

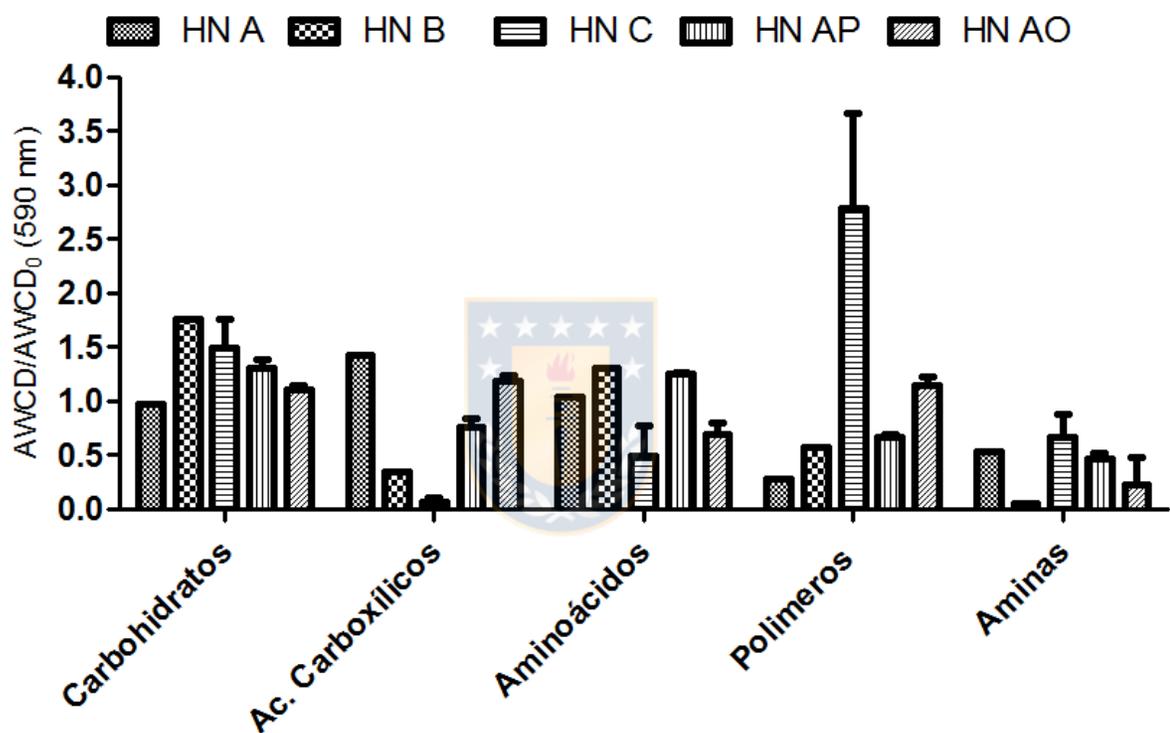


Figura 4. Índice AWCD/AWCD<sub>0</sub> por grupos de fuentes de carbono de bacterias provenientes de segmento inicial (HN A), medio (HNB) y final (HN C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HN AP) y agua de salida (HN AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso, Chile.

En la figura 5 se puede apreciar los AWCD/AWCD<sub>0</sub> de las diferentes fuentes de carbono metabolizadas por bacterias adheridas a membranas de OI y presentes en muestras de agua de un Centro de Diálisis perteneciente a la Región del Bío-Bío.

Los análisis estadísticos indicaron que al comparar la oxidación de los carbohidratos por parte de las bacterias presentes en membranas OI no se presentaron diferencias significativas entre los segmentos inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) que comprenden la columna de OI ( $P > 0,05$ ). Por el contrario, bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI (HC AP) sí presentaron diferencias significativas con respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HC AO) en cuanto a su capacidad de oxidar carbohidratos ( $P = 0,0004$ ), siendo mayor su capacidad de oxidar carbohidratos en HC AP en comparación con HC AO.

Al comparar la oxidación de ácidos carboxílicos por parte de las bacterias presentes en membranas OI, no se observaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas presentes en las tres secciones analizadas de la columna de OI ( $P = 0,1869$ ). Las comunidades bacterianas presentes en las muestras de agua tampoco presentaron diferencias significativas en cuanto a la oxidación de ácidos carboxílicos ( $P = 0,0608$ ).

Los análisis estadísticos indicaron que no existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de oxidación de aminoácidos por parte de bacterias presentes en membranas OI de los tres segmentos de la columna de OI analizados (HC A, HC B y HC C) ( $P = 0,4011$ ). Por el contrario, bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI (HC AP) sí presentaron diferencias significativas con respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HC AO) en cuanto a su capacidad de oxidar aminoácidos ( $P < 0,0001$ ), siendo mayor su capacidad de oxidar aminoácidos en HC AO en comparación con HC AP.

Al comparar la oxidación de polímeros por parte de las bacterias presentes en membranas OI, no se presentaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas presentes en la sección inicial (HC A), media (HC B) final (HC C) de la columna de OI ( $P = 0,0614$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la oxidación de polímeros por parte de bacterias presentes en las muestras de agua ( $P = 0,1473$ ).

No se registraron diferencias significativas en cuanto a la oxidación de aminas por parte de bacterias presentes en los tres segmentos de la membrana OI ( $P=0,0558$ ). Por el contrario, bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI (HC AP) sí presentaron diferencias significativas con respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HC AO) en cuanto a su capacidad de oxidar aminas ( $P=0,0002$ ), siendo mayor su capacidad de oxidar aminas en HC AO en comparación con HC AP.

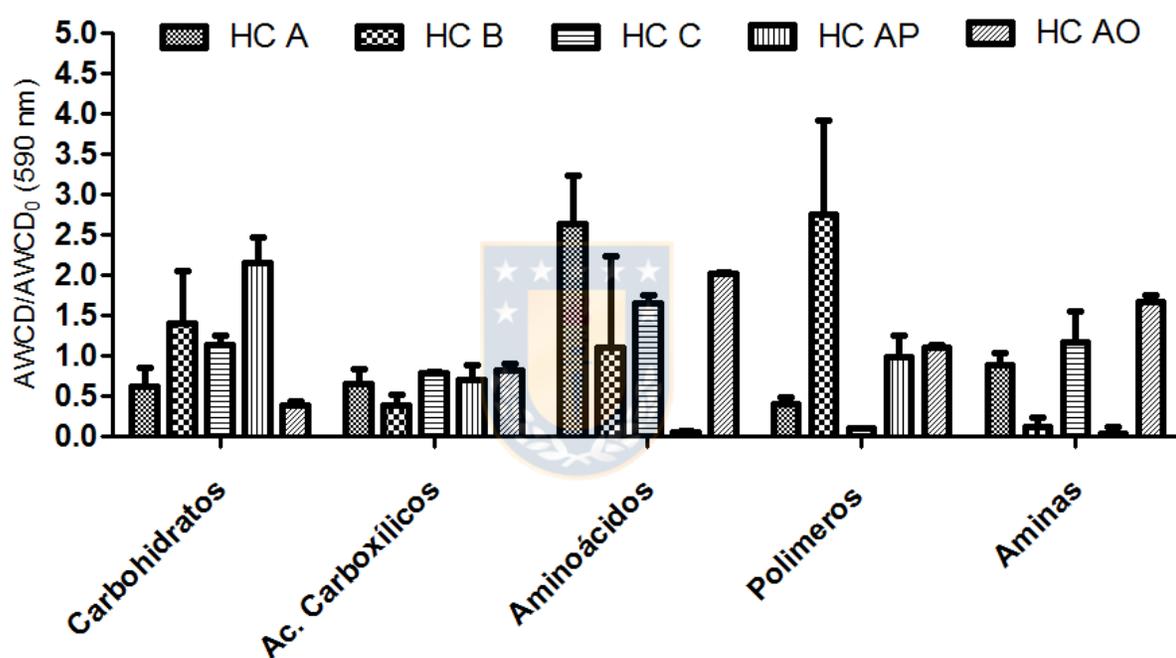


Figura 5. Índice AWCD/AWCD0 por grupos de fuentes de carbono de bacterias provenientes de segmento inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de membranas de osmosis inversa y agua de ingreso (HC AP) y agua de salida (HC AO) al sistema de osmosis inversa de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, Chile.

Al comparar estadísticamente cada segmento de membrana OI del Centro de Diálisis perteneciente a la Región de Valparaíso con los del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío desde el punto de vista de la oxidación de carbohidratos se

observó que no existían diferencias significativas entre ellos ( $P=0,1901$ ). Por el contrario, al comparar bacterias presentes en las muestras de agua, estas sí presentaron diferencias significativas desde el punto de vista de la oxidación de carbohidratos ( $P=0,0004$ ). Se observó que  $HN\ AP < HC\ AP$  y  $HN\ AO > HC\ AO$  con respecto a su capacidad de oxidar carbohidratos.

Al realizar el mismo análisis con respecto a la oxidación de los ácidos carboxílicos se determinó que existían diferencias significativas al comparar los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis descritos ( $P<0,0001$ ). Se observó que  $HN\ A > HC\ A$  y  $HN\ C < HC\ C$ .  $HN\ B$  no presentó diferencias significativas con respecto a  $HC\ B$  ( $P>0,05$ ). Al comparar las muestras de agua de los dos Centros de Diálisis no se encontraron diferencias significativas con respecto a la oxidación de los ácidos carboxílicos ( $P=0,0608$ ).

Al comparar la oxidación de los aminoácidos entre los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis descritos se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P=0,2043$ ). Por el contrario, en las muestras de agua sí hubo diferencias significativas ( $P<0,0001$ ), siendo  $HN\ AP > HC\ AP$  y  $HC\ AO > HN\ AO$  con respecto a la oxidación de los aminoácidos.

Los análisis estadísticos demostraron que al comparar los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes segmentos de membrana OI analizados ( $P=0,0159$ ) con respecto a la oxidación de polímeros. Tampoco hubo diferencias significativas entre las muestras de agua comparadas con respecto a la oxidación de polímeros.

Finalmente, al comparar la oxidación de las aminas entre los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis descritos se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P=0,2043$ ). Con respecto a las muestras de agua, sólo se determinó que  $HC\ AO > HN\ AO$  ( $P=0,0002$ ). No se observaron diferencias significativas entre  $HN\ AP$  y  $HC\ AP$  con respecto a la oxidación de las aminas ( $P>0,05$ ).

En la figura 6 se puede apreciar el desarrollo del índice de riqueza (R) de todas las muestras tanto de membranas de OI como de agua de dos Centros de

Diálisis en Chile. El índice de riqueza (R) muestra el número de fuentes de carbono que las comunidades bacterianas son capaces de oxidar, de un total de 31 fuentes de carbono (100%). Los análisis estadísticos determinaron que en todas las comparaciones existió diferencia significativa ( $P < 0,0001$ ). Para el caso de las comunidades bacterianas presentes en membranas OI obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región Valparaíso, se encontró que  $HN A > HN B > HN C$  en cuanto al número de fuentes de carbono que son capaces de oxidar. Con respecto a las bacterias presentes en muestras de agua se demostró que  $HN AP > HN AO$  en cuanto al número de fuentes de carbono que son capaces de oxidar.

Al comparar estadísticamente las muestras de membrana de OI provenientes de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío se encontró que  $HC C > HC A > HC B$  en cuanto al número de fuentes de carbono que son capaces de oxidar. Con respecto a las bacterias presentes en muestras de agua se demostró que  $HC AO > HC AP$  en cuanto al número de fuentes de carbono que son capaces de oxidar.

Los análisis estadísticos demostraron que al comparar los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis se encontraron diferencias significativas entre los diferentes segmentos de membrana OI analizados ( $P < 0,0001$ ), siendo  $HN A > HC A$ ,  $HN B > HC B$  y  $HN C < HC C$ , en cuanto al número de fuentes de carbono que son capaces de oxidar. Con respecto a las muestras de agua  $HN AP > HC AP$  y  $HN AO < HC AO$  en cuanto al número de fuentes de carbono que las comunidades bacterianas son capaces de oxidar.

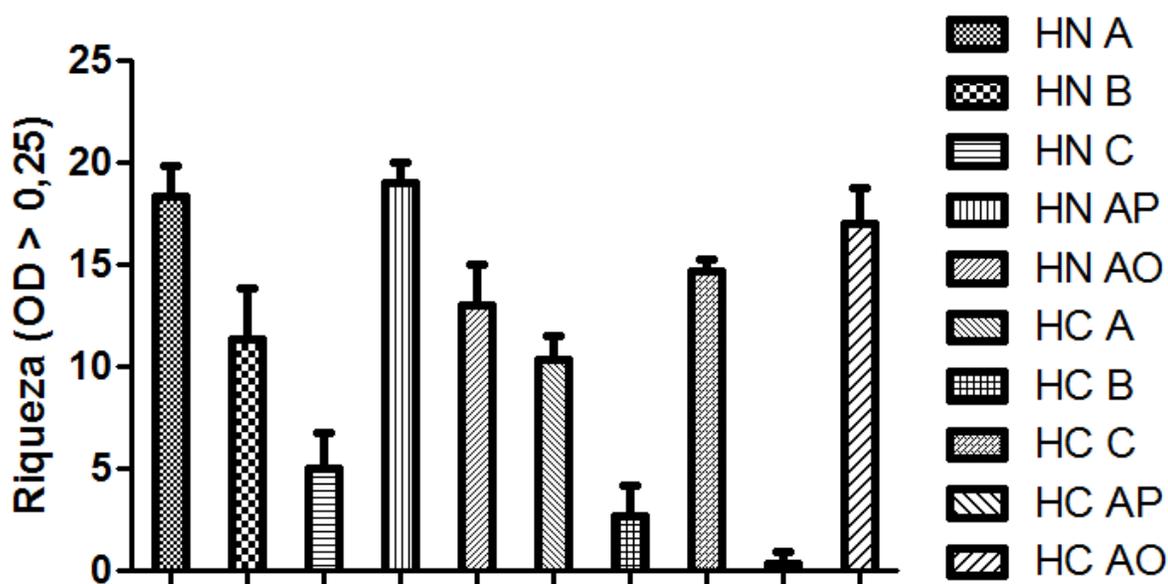


Figura 6. Índice R para las distintas muestras de agua y membrana de osmosis inversas analizadas a las 96 h de incubación.

La figura 7 muestra el desarrollo del índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) de todas las muestras tanto de membranas de OI como de agua de dos Centros de Diálisis en Chile. Los análisis estadísticos demostraron que la gran mayoría de las muestras comparadas presentan diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ). Para el caso de las comunidades bacterianas presentes en membranas OI obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región Valparaíso, se encontró que  $HN A > HN C$  y que  $HN B > HN C$  ( $P = 0,0006$ ) en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono. No se observaron diferencias significativas al comparar  $HN A$  con  $HN B$  ( $P > 0,05$ ). Con respecto a las bacterias presentes en muestras de agua no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) al comparar  $HN AP$  con  $HN AO$  en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono.

Al comparar estadísticamente las muestras de membrana de OI provenientes de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío no se encontró diferencias significativas ( $P = 0,1350$ ) entre  $HC A$ ,  $HC B$  y  $HC C$  en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono. Por el contrario, bacterias presentes en el agua que ingresa al sistema OI ( $HC AP$ ) sí presentaron diferencias significativas con

respecto a bacterias presentes en el agua que sale del sistema OI (HC AO) en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono ( $P=0,0002$ ), siendo HC AO > HC AP respecto a dicho aspecto.

Los análisis estadísticos demostraron que al comparar los segmentos de membrana OI de los dos Centros de Diálisis sólo se encontraron diferencias significativas entre los segmentos HN C y HC C ( $P=0,0013$ ), siendo HN C < HC C, en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono. No se observaron diferencias significativas entre HN A y HC A; y HN B con respecto a HC B ( $P>0,05$ ). Con respecto a las muestras de agua HN AP > HC AP ( $P=0,0002$ ), en cuanto a la diversidad del consumo de las fuentes de carbono por parte de las comunidades bacterianas. No se observaron diferencias significativas entre HN AO y HC AO ( $P>0,05$ ).

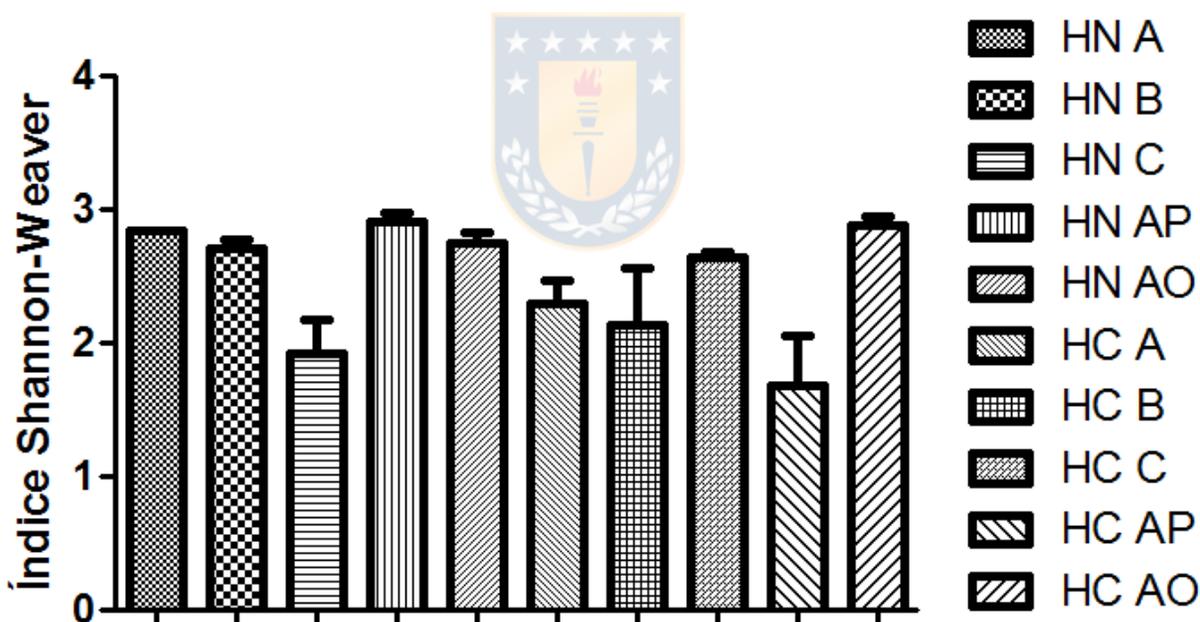


Figura 7. Índice H' para las distintas muestras de agua y membrana de osmosis inversas analizadas a las 96 h de incubación.

### **3.5 Caracterización molecular de comunidades bacterianas desde sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis**

#### *3.5.1 Caracterización molecular por DGGE de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis*

El producto de PCR de la región V3 del gen ADNr 16s (tamaño aproximado de 190 pb) de cada una de las muestras de agua y membrana OI fue separado mediante DGGE. Las bandas del perfil de DGGE u OTU's encontradas se analizaron mediante la correlación de Bray-Curtis basado en la presencia o ausencia de bandas u OTU's. Adicionalmente se analizó la similitud entre los segmentos de membrana OI de cada Centro de Diálisis por medio del método de escalamiento multidimensional (MDS) el cual utiliza una matriz de distancia que posee la correlación de Bray-Curtis. Los MDS fueron editados, obviando las similitudes inferiores a un 80% para una mejor visualización, tal como se aprecia en la figura 8 y 9. Las bandas del perfil de DGGE de las muestras de agua para cada Centro de Diálisis no pudieron ser analizadas mediante este método dado que presentaban muy pocas bandas (N muy bajo) para ser analizadas por el programa PRIMER V6.

Los resultados del MDS de las muestras de membrana OI del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (figura 8) demostraron que existe un 80% de similitud entre bacterias presentes en los segmentos inicial, medio y final de la membrana OI. A su vez, se observa una agrupación en la cual bacterias presentes en el segmento inicial y medio de la membrana OI, comparten un 98% de similitud.

Por su parte, los resultados del MDS de las muestras de membrana OI del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (figura 9) demostraron que existe un 90% de similitud entre bacterias presentes en los segmentos inicial, medio y final de la membrana OI. A su vez, se observa una agrupación en la cual bacterias presentes en el segmento inicial y medio de la membrana OI, comparten un 96% de similitud. Como las muestras fueron cargadas en triplicado para cada segmento de membrana se observa un 99% de similitud entre ellas.

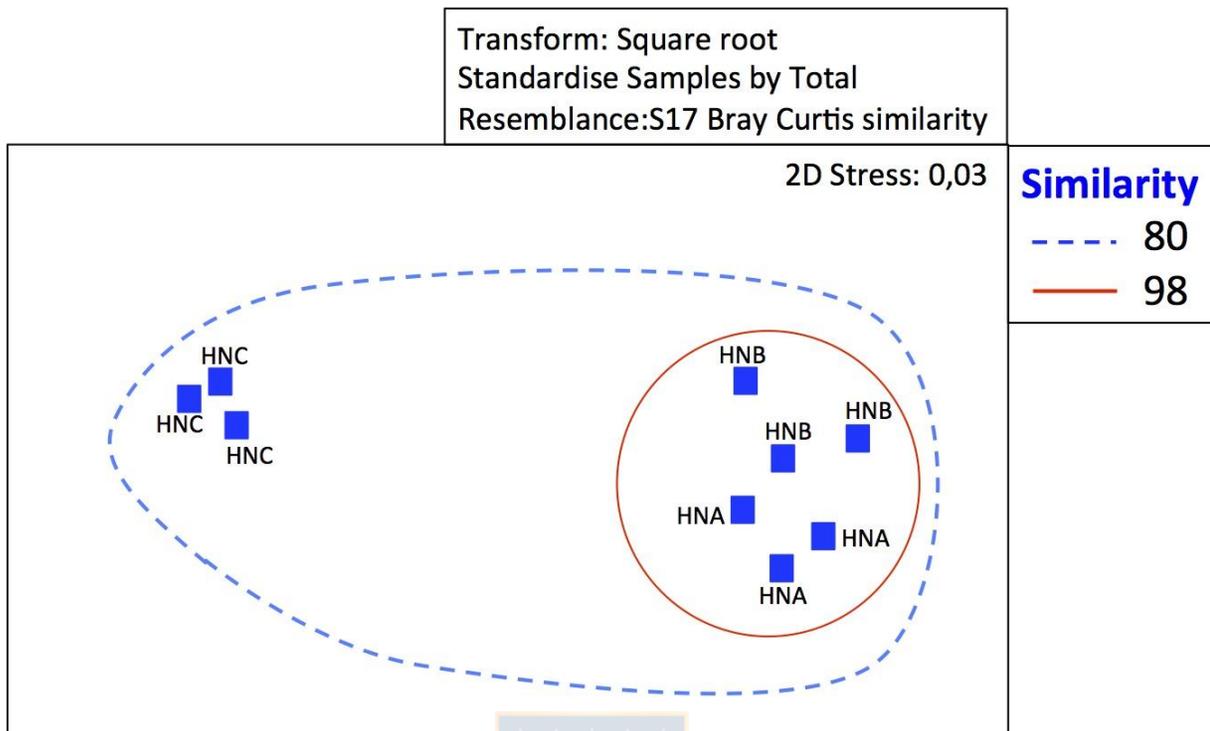


Figura 8. Diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) del patrón de bandeo mediante DGGE de las muestras de segmentos de membrana OI inicial (HN A), medio (HN B) y final (HN C) de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso.

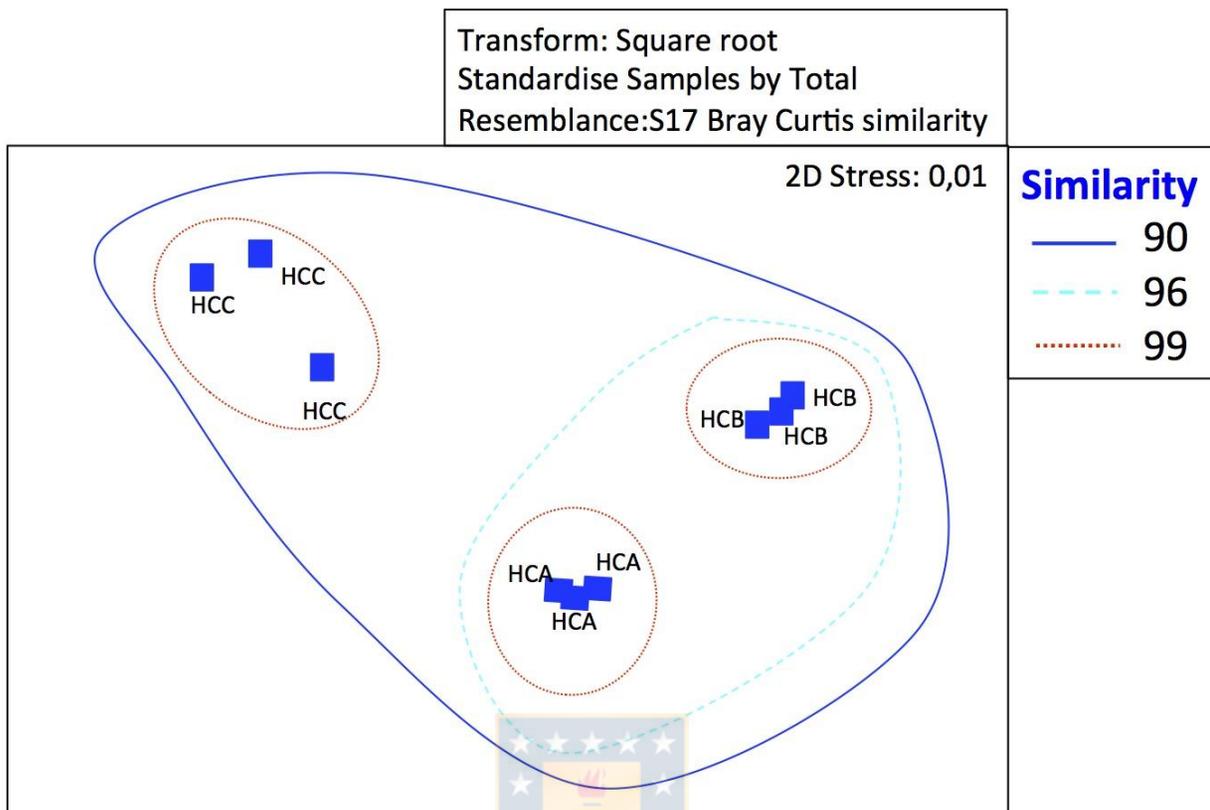


Figura 9. Diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) del patrón de bandeo mediante DGGE de las muestras de segmentos de membrana OI inicial (HC A), medio (HC B) y final (HC C) de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío.

3.5.2 Secuenciación masiva de comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de aguas para hemodiálisis

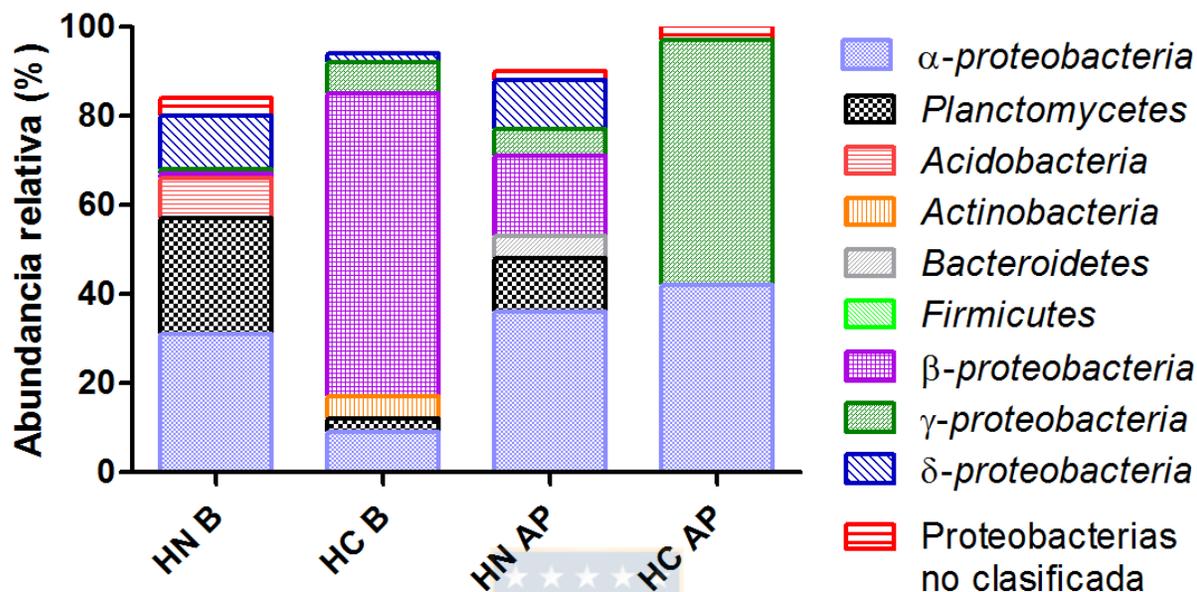


Figura 10. Abundancias relativas de los principales *phyla* encontrados en el análisis de metagenómica.

Los resultados obtenidos del análisis de metagenómica de muestras de ADN total extraído a partir de muestras de membrana de OI y agua potable acumulada en estanques de acopio que ingresa al sistema de OI, indicaron que las abundancias relativas de los principales *phyla* encontrados fueron: *Proteobacteria* (49%), *Planctomycetes* (26%) y *Acidobacteria* (9%) en el segmento medio de membrana OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN B); *Proteobacteria* (86%), *Actinobacteria* (5%) y *Planctomycetes* (3%) en el segmento medio de membrana OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC B); *Proteobacteria* (73%), *Planctomycetes* (12%) y *Bacteroidetes* (5%) en agua potable que ingresa al sistema de OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN AP); *Proteobacteria* (99,872%), *Firmicutes* (0,0401%) y *Bacteroidetes* (0,0327%) en agua potable que ingresa al sistema de OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC AP)

Se realizó una diferenciación de las distintas clases de *Proteobacteria* encontradas en cuanto a sus abundancias relativas y se determinó lo siguiente:  $\alpha$ -*proteobacteria* (31%),  $\beta$ -*proteobacteria* (1%),  $\gamma$ -*proteobacteria* (1%),  $\delta$ -*proteobacteria* (12%) y *Proteobacteria* no clasificada (4%) en el segmento medio de membrana OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN B);  $\alpha$ -*proteobacteria* (9%),  $\beta$ -*proteobacteria* (68%),  $\gamma$ -*proteobacteria* (7%) y  $\delta$ -*proteobacteria* (2%) en el segmento medio de membrana OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC B);  $\alpha$ -*proteobacteria* (36%),  $\beta$ -*proteobacteria* (18%),  $\gamma$ -*proteobacteria* (6%),  $\delta$ -*proteobacteria* (11%) y *Proteobacteria* no clasificada (2%) en agua potable que ingresa al sistema de OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN AP); );  $\alpha$ -*proteobacteria* (42%),  $\gamma$ -*proteobacteria* (55%) y *Proteobacteria* no clasificada (3%) en agua potable que ingresa al sistema de OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC AP).

### **3.6 Detección de biopelícula bacteriana en membranas de ósmosis inversa de sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis**

Se determinó mediante microscopía electrónica de barrido la formación de biopelícula bacteriana en membranas OI de dos Centros de Diálisis pertenecientes a la Región del Bío-Bío y a la Región de Valparaíso, como se puede apreciar en la figura 11 y 12 respectivamente.

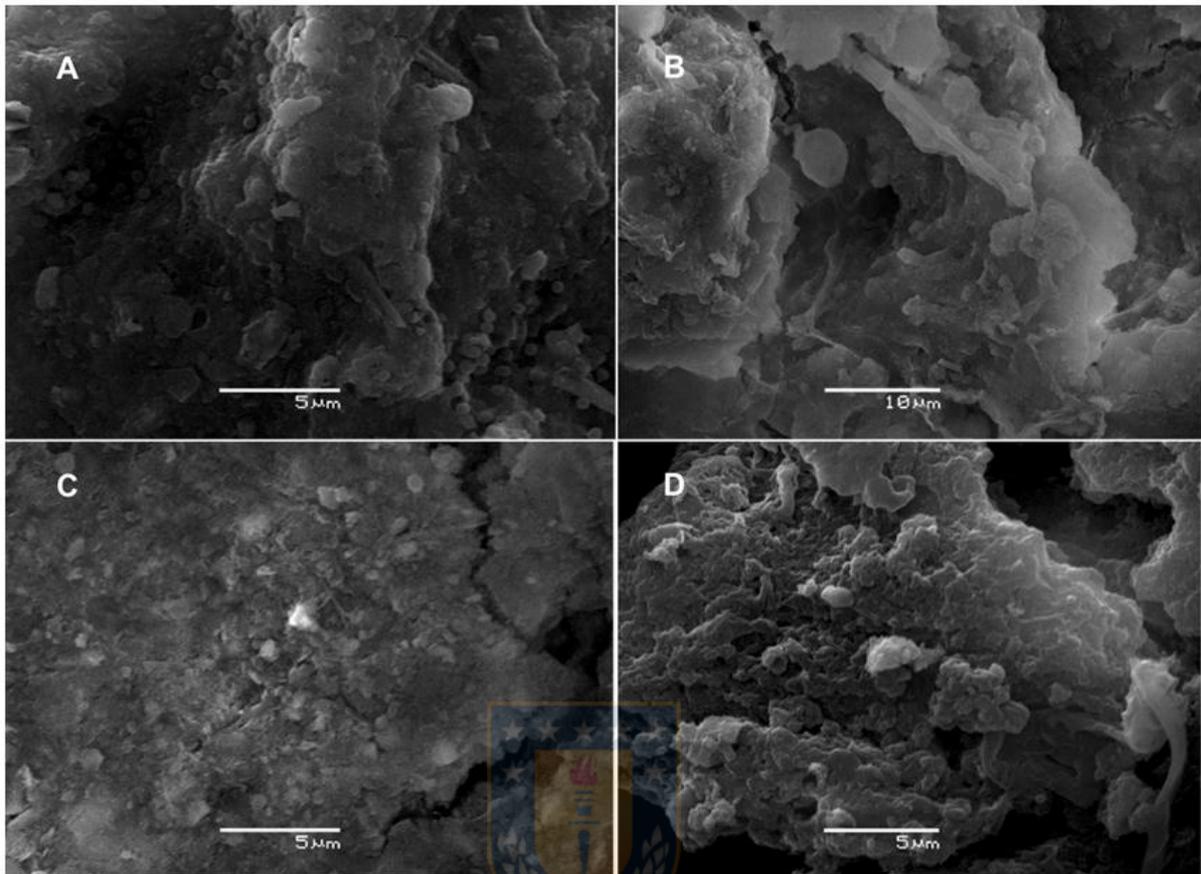


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas formadas en membrana OI y bacterias desprendidas de la membrana. A) Biopelícula formada en membrana OI porción inicial (HC A) B) Biopelícula formada en membrana OI porción media (HC B). C) Biopelícula formada en membrana OI porción final (HC C) D) Bacterias desprendidas de la membrana OI por sonicación porción inicial (HC A). Muestras obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío.

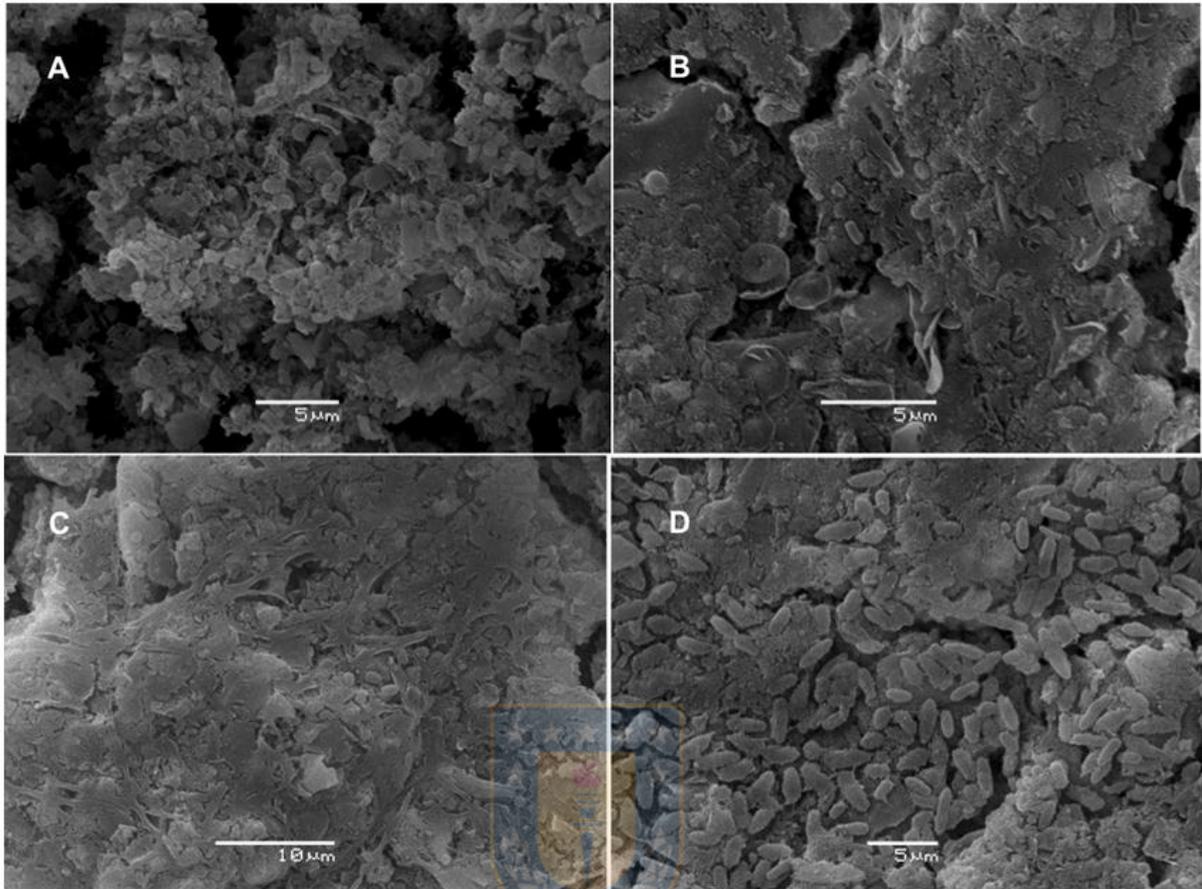


Figura 12. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas formadas en membrana OI y bacterias desprendidas de la membrana. A) Biopelícula formada en membrana OI porción inicial (HN A) B) Biopelícula formada en membrana OI porción media (HN B). C) Biopelícula formada en membrana OI porción final (HN C) D) Bacterias desprendidas de la membrana OI por sonicación porción final (HN C). Muestras obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso.

### 3.7 Determinación de endotoxinas bacterianas en agua osmosada para uso en hemodiálisis

Se determinó mediante el ensayo de LAL, la cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en el agua que sale del sistema de osmosis inversa (agua osmosada). En ambos Centros de Diálisis se encontró que la cantidad de endotoxinas era menor a 0,25 Unidades de Endotoxinas por mL.

Tabla 6. Resultados determinación de endotoxina en agua osmosada

Muestra analizada	UE/mL
HN AO	<0,25
HC AO	<0,25
Endotoxinas de <i>E. coli</i> (O:113:H10)	0,005 - 50

HN AO: agua osmosada Centro de Diálisis Región de Valparaíso, Chile.

HC AO: agua osmosada Centro de Diálisis Región del Bío-Bío, Chile.

Las Endotoxinas de *E. coli* (O:113:H10) corresponden al estándar patrón para la construcción de la curva de calibración.

#### 4. DISCUSIÓN

Los recuentos bacterianos obtenidos de membrana OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso indican que la mayor carga bacteriana se concentra al inicio de la columna de OI HN A, en comparación con el resto de los segmentos medio y final HN B y HN C, respectivamente. Esto pudo deberse a que la mayor concentración de bacterias, componentes orgánicos y de sales, producto de la alta presión a la cual ingresa el agua pre-tratada a la membrana de OI, se produce al inicio de la columna de OI, lo cual estaría potencialmente generando un ambiente óptimo para la adhesión de bacterias que ingresan a la membrana desde una perspectiva nutricional y de pH favorable para la formación de biopelículas. La mayoría de las bacterias son capaces de sobrevivir en la biopelícula, des-adherirse de ésta por efecto de fuerzas de corte de fluido (*Shear Forces*) y colonizar diferentes partes del sistema de suministro de agua de la planta de tratamiento (Al-Ahmad *et al.*, 2000; Bereschenko *et al.*, 2008), utilizando trazas de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Kulakov *et al.*, 2002). El mismo comportamiento se registró en el segmento inicial de la columna de OI HC A de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, en donde se observó incremento en la carga bacteriana en comparación con el segmento medio HC B. Sin embargo los recuentos encontrados en el segmento final de la columna OI (HC C) eran similares a los del segmento inicial. Esto pudo deberse a que en esa zona de la membrana, existe una menor turbulencia del agua de alimentación, lo cual permitiría una mayor permanencia de las bacterias en esta zona, favoreciendo la adhesión a la membrana y posterior formación de biopelículas (Milstead y Riley, 1993). En ambos Centros de Diálisis se registró que en el segmento medio de la columna OI era la zona con menor recuento bacteriano. Esto pudo deberse a que en dicha zona los sólidos disueltos y las sales inorgánicas no están tan concentradas como al inicio de la columna de OI, lo cual implicaría un déficit de nutrientes y de condiciones de pH para adhesión bacteriana y posterior formación de la biopelícula en la membrana OI.

Al comparar los recuentos bacterianos en el agua que ingresa al sistema de OI v/s los recuentos bacterianos del agua que sale del sistema OI en ambos Centros de

Diálisis, se encontró que en ambos casos los recuentos eran mayores en el agua osmosada (agua que sale del sistema OI) en comparación con el agua que ingresa al sistema de OI. Esto puede deberse a que como el agua que ingresa a la membrana OI es pre-tratada y el cloro que lleva es removido en la etapa de pretratamiento (Matin *et al.*, 2011), pueden quedar remanentes de cloro dependiendo del estado funcional de los filtros de carbón activado, lo cual permitiría la inhibición bacteriana. Por otro lado el hecho de encontrar mayores recuentos en el agua osmosada en ambos Centros de Diálisis indicaría que podría existir paso de bacterias a través de la membrana OI que estarían contaminando la red de distribución de agua lo cual podría potencialmente poner en riesgo a pacientes que cursan hemodiálisis. De esta forma, el hecho de encontrar recuentos bacterianos > 100 UFC/mL en agua osmosada, podría reflejar un estado disfuncional del sistema de ósmosis inversa, y sugiere que existe un grado de contaminación bacteriano importante en el agua osmosada de los Centros de Diálisis que operan en el país, incumpliendo los límites máximos permitidos para agua pura (Pérez-García *et al.*, 2016). Al comparar los recuentos bacterianos en el agua osmosada del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso con el Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío se pudo observar que éste último tiene un mayor recuento que el primero, lo cual podría indicar un mayor grado de contaminación bacteriana.

Los perfiles metabólicos obtenidos de las muestras de membrana de OI y agua, de ambos Centros de Diálisis, fueron analizados de acuerdo a la potencial utilización de diferentes fuentes de carbono por parte de comunidades bacterianas (31 en total) presentes en el kit Biolog Ecoplate (Muñiz *et al.*, 2014). Dicho kit contiene 96 pocillos con diferentes fuentes de carbono y sales de tetrazolium que al reducirse producto de la metabolización de las fuentes de carbono por parte de comunidades bacterianas, genera un color violeta que es medido por espectrofotometría a 590 nm.

Con respecto a los análisis de los índices de riqueza para las distintas muestras de membranas de ósmosis inversa entre ambos Centros de Diálisis, se encontró que el segmento inicial de la membrana OI HN A poseía mayor riqueza

metabólica que HC A, el segmento medio HN B poseía mayor riqueza metabólica que HC B y finalmente el segmento final HN C poseía menor riqueza metabólica que el segmento HC C. Esto indicaría que las comunidades bacterianas presentes en las membranas OI del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso tienen mayores competencias metabólicas para metabolizar en promedio 11 de las 31 fuentes de carbono que comprende el kit Biolog Ecoplate, en comparación con las comunidades bacterianas presentes en el Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío que en promedio sólo puede metabolizar 9 de 31 fuentes de carbono. Con respecto a las muestras de agua de alimentación HN AP (19 de 31 fuentes de carbono) tiene mayor riqueza microbiana que HC AP (1 de 31 fuentes de carbono). Con respecto a las muestras de agua osmosada HN AO (13 de 31 fuentes de carbono) tiene menor riqueza microbiana que HC AO (13 de 31 fuentes de carbono).

Al analizar los índices de Shannon-Weaver se encontró que solamente el segmento HN C presentaba diferencias estadísticamente significativas en comparación con el segmento HC C, siendo éste último mayor que el primero. Esto podría indicar que el segmento final de la columna OI del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso posee mayor diversidad en cuanto al consumo de fuentes de carbono en comparación con el segmento final de la columna OI del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío. Los demás segmentos comparados poseen diversidades en cuanto al consumo de fuentes de carbono similares. Al promediar los  $H'$  de las muestras de membrana OI, en ambos Centros de Diálisis se encontró que ambos poseen una biodiversidad específica de especies normal ya que los valores de  $H'$  fluctúan entre 2-3. Si  $H' < 2$  se considera biodiversidad específica de especies baja y si  $H' > 3$  se considera biodiversidad específica de especies alta (Pla, 2006). Al comparar las muestras de agua que ingresan al sistema de OI se encontró que la muestra de agua proveniente del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN AP) posee mayor diversidad en cuanto al consumo de fuentes de carbono en comparación con la muestra de agua proveniente del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC AP). Se considera que HN AP ( $H'=2,9$ ) posee una biodiversidad específica de especies normal en comparación con HC AP ( $H'=1,7$ ) que posee una

biodiversidad específica de especies baja. Al comparar las muestras de agua que salen del sistema de OI se encontró una biodiversidad específica de especies normal en ambos Centros de Diálisis.

El agua usada en sesiones de HD podría ser la responsable de la transmisión de un número creciente de infecciones, principalmente causadas por la presencia de bacterias, endotoxinas y productos derivados de bacterias (Bambauer *et al.*, 1994). Diversos estudios han registrado brotes infecciosos en pacientes que cursan HD (Novosad *et al.*, 2019; Haethem y Anwer, 2019; Montaña-Remacha *et al.*, 2014), sin embargo, no se ha logrado esclarecer si la etiología de la infección se produce por causas nosocomiales (cateterización deficiente por ejemplo) o por baja calidad bacteriológica del agua tratada. En Chile las infecciones son la tercera causa de hospitalización de pacientes que cursan con HD de acuerdo a lo descrito por Poblete (2018) y tampoco se especifica la etiología.

Con respecto a las secuencias relativas de los aislados obtenidos de ambos Centros de Diálisis se encontró que el *phylum* predominante fue *Proteobacterias*. Esto concuerda con estudios realizados por Chen *et al.* (2017) y Shahryari *et al.* (2016) quienes reportaron mayor predominancia de *Proteobacterias* en membranas OI y en agua osmosada, respectivamente, en diferentes Centros de Diálisis. Cabe destacar que muchas de las cepas aisladas e identificadas molecularmente son potencialmente patógenas para el ser humano, siempre y cuando estén a una concentración por sobre los límites máximos permitidos por entidades como la AAMI o la Farmacopea Europea que regulan la calidad bacteriológica del agua. Se logró aislar *Stenotrophomonas maltophilia* a partir del segmento medio de membrana OI proveniente de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso (HN B 6) y *Stenotrophomonas* sp. a partir de agua osmosada proveniente de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío (HC AO 3 y HC AO 7). Esto podría presentar un alto riesgo en la salud de pacientes que cursan hemodiálisis ya que se ha descrito a esta bacteria como un patógeno emergente en Unidades HD (De Mauri *et al.*, 2014). Dicha cepa por lo general es resistente a penicilinas de espectro extendido, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos (Pankuch *et al.*, 1994;

Vartivarian et al., 1994) y susceptible a quinolonas de última generación, aminoglucósidos y sulfametoxazol/trimetoprim (Nicodemo & Paez, 2007; Samonis et al., 2012). Sin embargo, estudios recientes han demostrado resistencia intrínseca a sulfametoxazol/trimetoprim (Fonseca et al., 2018) y otros agentes antimicrobianos como  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas, debido a  $\beta$ -lactamasas codificadas en cromosoma inducible, expresión de bombas de eflujo multidrogas y baja permeabilidad de la membrana externa, de acuerdo a lo descrito por Trifonova y Strateva, (2018). El desarrollo de resistencia adquirida, como resultado de la transferencia de genes transportados por integrones, transposones y plásmidos, drásticamente limita las opciones disponibles para la terapia antimicrobiana contra este patógeno nosocomial (Looney et al., 2009; Brooke, 2014).

. Vale destacar que los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (Tabla IV) respecto a *Stenotrophomonas* sp. concuerdan con lo descrito en la literatura, siendo la cepa HC AO 7 resistente a sulfametoxazol/trimetoprim.

*S. maltophilia* predominantemente causa infecciones del tracto respiratorio, y menos comúnmente infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas y tejido blando, bacteremia, septicemia, endocarditis, meningitis, infecciones oftálmicas, osteocondritis y peritonitis (Brooke, 2012; Denton y Kerr, 1998). Este patógeno oportunista es el responsable de infecciones nosocomiales en pacientes de unidades de cuidados intensivos (pacientes intubados asociados a neumonía y septicemia), pacientes inmunocomprometidos con enfermedades hematológicas e infecciones pulmonares crónicas en pacientes con fibrosis quística (Nseir et al., 2006; Demiraslan et al., 2013; Waters et al., 2013; Scholte et al., 2016). En el genoma de *S. maltophilia* varias enzimas extracelulares se encuentran codificadas, las cuales participan en la patogénesis de la infección (Crossman et al., 2008). Dichos factores de virulencia comprenden: proteasas (gelatinasa, elastasa, fibrinolisisina), nucleasas (DNAsas y RNAsas), hialuronidasas, heparinasas, hemolisisnas, citotoxinas y sideroforos. Adicionalmente, existen factores de virulencia asociados a esta bacteria como el LPS, pili (fimbria), adhesinas no-pilosas y flagelo (Trifonova y Strateva,

2018). Otra característica importante de *S. maltophilia* es su capacidad de formar biopelículas en diferentes superficies abióticas y en el tejido del hospedador. Esta habilidad le confiere una alta resistencia hacia muchos agentes antimicrobianos y soluciones antisépticas, y contrarresta la defensa inmune del hospedador (Brooke, 2012; de Oliveira-Garcia *et al.*, 2003).

Otra bacteria de importancia clínica que se logró aislar e identificar molecularmente en ambos Centros de Diálisis fue *Pseudomonas* sp. la cual ha sido descrita en la formación de biopelículas en Centros de Diálisis (Heidarieh *et al.*, 2016) y como patógeno oportunista en infecciones de pacientes que cursan HD (Shimon *et al.*, 2018). Se sabe que el género *Pseudomonas* contiene más de 120 especies y está ampliamente distribuido en ambiente como por ejemplo en ecosistemas acuíferos y de suelo, y puede infectar tanto a plantas como animales y humanos (Peix *et al.*, 2009; Spiers *et al.*, 2000).

En la literatura, el modelo de estudio por elección para el género *Pseudomonas* es *P. aeruginosa*. Dicha especie fue utilizada como modelo para comparar los resultados obtenidos. De acuerdo a la identificación molecular y antibiogramas de las cepas aisladas a partir de muestras de agua y membranas OI se determinó que sólo la cepa HC A1 identificada como *Pseudomonas* sp. fue resistente a ciprofloxacino. La literatura ha reportado que *P. aeruginosa* es capaz de adquirir resistencia a través de mutación en genes cromosómicos específicos (Lambert, 2002). La resistencia a fluorquinolonas puede ser adquirida por la modificación de la topoisomerasa tipo II que comprende a la DNA girasa (gen *gryA*) y topoisomerasa IV (gen *parC*), lo cual inhibe la unión a este antibiótico (Nakano *et al.*, 1997; Yonezawa *et al.*, 1995). Un estudio realizado por Lutz y Lee (2011) encontraron que el 96% de los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos en aguas de uso recreacional, eran resistentes a amikacina, aztreonam, gentamicina, ticarcilina/ácido clavulánico y sulfametoxazol/trimetoprim. Sin embargo, las cepas identificadas como *Pseudomonas* sp. (HN A3 y HC A1) fueron sensibles a gentamicina y sulfametoxazol/trimetoprim. Esto indica que es generalmente aceptado que cepas

ambientales de *Pseudomonas* presenten baja resistencia a antibióticos, sin embargo esta suposición no ha sido completamente clarificada (Streeter y Katouli, 2016).

*P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa principalmente infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (Brown *et al.*, 2012), infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, infecciones a la piel y tejido blando en pacientes quemados, queratitis bacteriana y septicemia. Su patogénesis ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que es un proceso multifactorial mediado por *quorum sensing* (QS). Este proceso de QS favorece la comunicación célula a célula a través de la producción de a través de la producción de moléculas de señalización denominadas autoinductores para apuntar a receptores específicos para la activación. Cuando existe una máxima activación de receptores, se inducen la expresión de genes de diversos factores de virulencia y formación de biopelículas (O'Loughlin *et al.*, 2013). Estos factores de virulencia contribuyen en la colonización y evasión del sistema inmune del hospedador para causar infección y comprenden al pili tipo IV que contribuye en la adhesión y formación de biopelículas por parte de esta bacteria a la superficie celular del hospedador como primer paso hacia la colonización e inicio de la enfermedad (Pizzaro-Cerda, 2006). Otro factor de virulencia importante es el sistema de secreción tipo III mediante el cual esta bacteria inyecta proteínas efectoras tóxicas en el citosol de células eucarióticas, inhibiendo sus funciones celulares lo cual permitiría la sobrevivencia bacteriana (Streeter y Katouli, 2016). Otro factor de virulencia secretado por *P. aeruginosa* son la fosfolipasas C hemolíticas, la cual degrada a la fosfatidilcolina y esfingomiolina que se encuentran comúnmente en membranas de células eucarióticas y surfactante pulmonar del hospedador, y principalmente generan daño pulmonar (Jackson *et al.*, 2013).

En este estudio se lograron encontrar dos cepas Gram positivas a partir de membranas OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío, HC A9 y HC B1, identificadas como *Staphylococcus sp.* y *Staphylococcus pasteurii* respectivamente. Estudios realizados por Nguyen *et al.* (2017) indican que la gran mayoría de las infecciones del torrente sanguíneo en pacientes que cursan hemodiálisis, son

causadas comúnmente por organismos Gram positivos, y menos comúnmente por organismos Gram negativos. Sin embargo, las causas y condiciones mediante las cuales un patógeno Gram positivo o negativo ingresa al torrente sanguíneo de un paciente que cursa HD, a través del agua que fue tratada, no están completamente esclarecidos. Diversos estudios indican que la principal causa de infección en pacientes cateterizados que cursan HD es por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Este patógeno nosocomial también tiene la capacidad de formar biopelículas en superficies inertes como catéteres y en el tejido del hospedador e implantes. La expresión de muchos de los factores de patogenicidad dentro de biopelículas formadas por *S. aureus* indican que existe una alta abundancia de biosíntesis de proteínas capsulares, junto con la secreción de diversos factores de virulencia tales como: hemolisinas, leucotoxinas y lipasas que forman parte de la matriz extracelular de la biopelícula (Graf *et al.*, 2019)

Los resultados de metagenómica confirmaron la cercanía genética que existe entre comunidades bacterianas de ambos Centros de Diálisis. Se encontró que tanto en muestras de membrana de OI como en muestras de agua el phylum de mayor abundancia relativa fue el de Proteobacteria. Esto se correlaciona con la identificación molecular realizada a cepas aisladas en las cuales se encontró una gran frecuencia de Proteobacteria en ambos Centros de Diálisis. Vale destacar que todas las bacterias aisladas desde membranas de OI fueron *Proteobacterias*, específicamente encontrándose mayor incidencia de  $\gamma$ -*proteobacteria* en los segmentos inicial y medio en la membrana de OI y  $\alpha$ -*proteobacteria* y  $\beta$ -*proteobacteria* en el segmento final de membrana de OI obtenida de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso. Sin embargo el análisis de la metagenómica arrojó un 1% de abundancia relativa de  $\gamma$ -*proteobacteria* presente en el segmento medio de membrana de OI (HN B) y una mayor frecuencia de  $\alpha$ -*proteobacteria* (31%). A su vez, con respecto al agua potable que ingresa al sistema de OI (HN AP), sólo se logró aislar una sola  $\beta$ -*proteobacteria* lo cual podría correlacionarse con el 18% de abundancia relativa encontrada para  $\beta$ -*proteobacteria* en esta misma

muestra. Sin embargo, la mayor abundancia relativa de comunidades bacterianas en esta muestra (HN AP) radica en  $\alpha$ -proteobacteria (36%).

A su vez, las bacterias aisladas a partir de membranas de OI obtenidas de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío resultaron ser en su mayoría *Firmicutes* y  $\gamma$ -*proteobacteria* a diferencia de los resultados de metagenómica de esta misma muestra (HC B) que arrojó una mayor abundancia relativa para  $\beta$ -*proteobacteria* (68%). Chen *et al.*, (2017) demostró mediante identificación molecular de cepas aisladas de agua potable y de biopelículas presentes en membranas de OI que la mayor frecuencia de *phyla* era *Firmicutes* y *Proteobacteria* respectivamente.

En el caso del aislamiento bacteriano a partir del agua potable (HC AP) que ingresa al sistema de OI se logró aislar sólo una cepa perteneciente a  $\gamma$ -*proteobacteria* identificada como *Pseudomonas poae* (HC AP 7). Esto se correlaciona con los resultados de la metagenómica obtenidos en donde se encontró un 55% de abundancia relativa para  $\gamma$ -proteobacteria en este mismo tipo de muestra.

Cabe mencionar que se escogieron arbitrariamente los segmentos medios de membrana de OI de ambos Centros de Diálisis (HN B y HC B) para la metagenómica ya que los resultados presentados en el diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) del patrón de bandeo mediante DGGE de las muestras de segmentos de membrana OI inicial, medio y final muestran una alta similitud entre las comunidades bacterianas adheridas en los distintos segmentos (80% de similitud para las comunidades bacterianas presentes en membrana de OI de un Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso y 90% de similitud para las comunidades bacterianas presentes en membrana de OI de un Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío). La metagenómica de las muestras de agua osmosada (HN AO y HC AO) no pudo ser realizada dado que el ADN extraído fue deficiente y no cumplía con los requisitos de integridad y cantidad para ser sometido a secuenciación masiva.

Lo mencionado anteriormente se correlaciona con los resultados obtenidos por Bereschenko *et al.*, (2008) quien realizó clonación de productos de PCR y análisis de secuencias de ADN extraído a partir de muestras de biopelícula obtenidas en

distintos puntos de una planta de tratamiento de agua. Mediante análisis filogenético de las secuencias obtenidas se encontró que el phylum *Proteobacteria* predominaba en todas las librerías de clones y que la clase  $\beta$ -*proteobacteria* era la más abundante en muestras de agua potable de alimentación al sistema de OI y agua osmosada (85% y 65% del total de clones, respectivamente). A su vez se encontró mayor abundancia de  $\alpha$ -*proteobacteria* en biopelículas adheridas a membranas de OI (35% del total de clones). De acuerdo a los resultados de metagenómica se encontró mayor abundancia de  $\alpha$ -*proteobacteria* (36%) y  $\gamma$ -*proteobacteria* (55%) en HN AP y HC AP, respectivamente. Sin embargo sólo en HN AP se logró detectar la presencia de  $\beta$ -*proteobacteria* (18%), lo cual concuerda con el estudio mencionado. Por su parte los resultados de metagenómica de esta tesis indicaron mayor abundancia de  $\alpha$ -*proteobacteria* (31%) en HN B lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Bereschenko *et al.*, (2008). Al Ashhab *et al.*, (2017) mediante secuenciación masiva y metagenómica, determinó que  $\beta$ -*proteobacteria* seguido por  $\gamma$ -*proteobacteria* eran las clases más abundante en biopelículas formadas en membranas de OI, lo cual concuerda con la metagenómica de HC B, donde se observó mayor abundancia relativa de  $\beta$ -*proteobacteria*.

## 5. CONCLUSIONES

Se logró aislar y caracterizar bacterias potencialmente patógenas en muestras de agua que entra al sistema de ósmosis inversa, en membranas de ósmosis inversa y en el agua que sale del sistema de ósmosis inversa u agua osmosada, en ambos Centros de Diálisis estudiados.

Desde las muestras de agua que entra al sistema de ósmosis inversa, en membranas de ósmosis inversa y en el agua que sale del sistema de ósmosis inversa u agua osmosada, en ambos Centros de Diálisis estudiados, se aislaron 29 cepas bacterianas diferentes, correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Pigmentiphaga*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Bacteroides* y *Staphylococcus*.

Los análisis de los perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas presentes en muestras de membranas de OI indicaron que las comunidades bacterianas presentes en las membranas OI del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso tienen mayores competencias metabólicas para oxidar las fuentes de carbono que comprende el kit Biolog Ecoplate, en comparación con las comunidades bacterianas presentes en el Centro de Diálisis de la Región del Bio-Bío. En ambos Centros de Diálisis se encontró una biodiversidad específica de especies normal para este tipo de muestras.

Los análisis de los perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas presentes en muestras de agua de alimentación indicaron que las comunidades bacterianas presentes en muestras de agua de alimentación del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso tienen mayores competencias metabólicas para oxidar las fuentes de carbono que comprende el kit Biolog Ecoplate, en comparación con las comunidades bacterianas presentes en agua de alimentación del Centro de Diálisis de la Región del Bio-Bío.

Las comunidades bacterianas presentes en agua osmosada del Centro de Diálisis de la Región del Bio-Bío presentaron mayor capacidad de oxidar fuentes de carbono que en las comunidades bacterianas presentes en agua osmosada del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso.

Las muestras de agua de alimentación proveniente del Centro de Diálisis de la Región de Valparaíso poseen mayor diversidad en cuanto al consumo de fuentes de carbono en comparación con la muestra de agua de alimentación proveniente del Centro de Diálisis de la Región del Bío-Bío. Se encontró una biodiversidad específica de especies normal en muestras de agua osmosada en ambos Centros de Diálisis.

La metagenómica demostró que los principales *phyla* encontrados en muestras de agua de alimentación y membranas de OI, en ambos Centros de Diálisis fueron: *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, teniendo mayor abundancia relativa, en ambos Centros de Diálisis, el grupo *Proteobacteria*.

Se logró detectar la presencia de biopelículas en membranas de ósmosis inversa de los sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis de ambos Centros de Diálisis estudiados.

Se logró detectar la presencia endotoxinas bacterianas en agua osmosada para uso en hemodiálisis en ambos Centros de Diálisis estudiados, sin embargo la concentración de estas endotoxinas fue inferior a 0,25 UE/mL lo cual indica que ambos Centros de Diálisis estudiados cumplen con la normativa del MINSAL para el agua tratada.

## 6. PROYECCIONES

Determinar genes de resistencia a antibióticos en cepas aisladas.

Determinar la abundancia relativa mediante hibridación fluorescente *in situ* de las comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis.

Estudiar la estructura de las comunidades bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de agua para uso en hemodiálisis en el tiempo.

Estudiar y analizar la vida útil de la membrana de ósmosis inversa en el tiempo.

Una forma de evitar la formación de biopelículas en membranas de OI la presencia de bacterias en todo el sistema de distribución de agua de la planta de tratamiento para uso en HD sería ejerciendo mayores pesquisas de la calidad microbiológica en agua tratada (semanalmente). Si los resultados excedieran los límites máximos permitidos para el control bacteriológico y de endotoxinas del agua tratada se sugiere aumentar la frecuencia en los ciclos de desinfección de la planta de agua (semanalmente). Si esto no mejora se propone evaluar el reemplazo de las membranas de OI, las cuales tienen una expectativa de vida útil de 3-5 años, dependiendo del tipo de agua y carga bacteriana en el agua de alimentación. Adicionalmente se sugiere la instalación de ultrafiltros de 1  $\mu\text{m}$  previo al sistema de OI, estanques de acumulación de agua tratada cónicos e idealmente de acero inoxidable de grado farmacéutico sellados herméticamente y con filtros de venteo antibacteriano de 0,22  $\mu\text{m}$ , instalación de equipo de luz ultravioleta y filtros pirogénicos de 0,22  $\mu\text{m}$  a la salida de los estanques de acumulación de agua tratada al igual que para lisar y retener fragmentos bacterianos.

## 7. REFERENCIAS

Abd El Aleem F.A., Al-Sugair K.A., Alamad M.I. Biofouling problems in membrane processes for water desalination and reuse in Saudi Arabia. 1998. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **41**: 19–23.

Al Ashhab A., Sweity A., Bayramoglu B., Herzberg M., Gillor O. 2017. Biofouling of reverse osmosis membranes: effects of cleaning on biofilm microbial communities, membrane performance, and adherence of extracellular polymeric substances. *Biofouling.* **33**(5): 397-409.

Al-Ahmad, M.; Abd El-Aleem, F.A.; Mutiri, A.; Ubaisy, A. 2000. Biofouling in RO membrane systems. Part 1: Fundamentals and control. *Desalination.* **132**: 173–179.

Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 25-119.

Amato R.L. 2001. Chronic inflammatory disease related to water purity in dialysis treatments. *Water treatment. Cont Dial Nephrol.* **22**: 34–1239.

Arduino M.J. 2007. Dialysis-Associated Complications and Their Control. In: Jarvis W.R. (Ed.). In Bennett and Brachman's Hospital Infections, 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins: 341–371.

Arizono K., Nomura K., Motoyama T., Matsushita Y., Matsuoka K., Miyazu R., et al. 2004. Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis. *Blood Purif.* **22**(2): 26–9.

Arvanitidou M., Vayona A., Spanakis N., Tsakris A. 2003. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol.* **95**: 180–185.

Asci G., Tz H., Ozkahya M., Duman S., Demirci M.S., Cirit M., et al., EGE Study Group. 2013. The impact of membrane permeability and dialysate purity on cardiovascular outcomes. *JAm Soc Nephrol.* **24**: 1014–23.

Association AWW: Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies. New York, NY: McGraw-Hill, Inc., 1999.

Bambauer R., Schauer M., Jung W.K., Daum V., Vienken J. 1994. Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. *ASAIO J.* **40**: 1012–1016.

Bang F.B. 1956. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **98**: 325.

Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf L., Zehnder A.J.B. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3937–3977.

Bereschenko L.A., Heilig G. H. J., Nederlof M. M., van Loosdrecht M. C. M., Stams A. J. M., Euverink G. J. W. 2008. Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(17): 5297–5304.

Bonnie-Schorn E., Grassmann A., Uhlenbusch-Körwer I., Weber C., Vienken J. 1999. *Calidad del Agua en Hemodiálisis. Good Dialysis Practice Volumen 1.* PABST Science Publishers. Lengerich, Alemania. pp. 11-164.

Borges C.R.M., Lascowski K.M.S., Filho N.R., Pelayo J.S. 2007. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1791–1797.

Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. 2005. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol*. **13**: 20–26.

Brooke J.S. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev*. **25**: 2–41.

Brooke J.S. 2014. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther*. **12**: 1–4.

Brown S.P., Cornfort D.M., Mideo N. 2012. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity and control. *Trends Microbiol*. **20**(7): 336-42.

Cappelli G., Sereni L., Scialoja M.G., Morselli M., Perrone S., Ciuffreda A., Bellesia M., Inguaggiato, P., et al. 2003. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant*. **18**: 2105–2111.

Chen L., Zhu X., Zhang M., Wang Y., Lv T., Zhang S., Yu X. 2017. Profiling Total Viable Bacteria in Hemodialysis Water Treatment System. *J. Microbiol. Biotechnol*. **27**(5): 995-1004.

Chen V.J., Ma P.X. 2004. Nano-fibrous poly(L-Lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials*. **25**: 2065–2073.

Costerton J.W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol*. **176**: 2137–2142.

Coulliette A.D., Arduino M.J. 2013. Hemodialysis and Water Quality. *Seminars in Dialysis*. **26**(4): 427-438.

Crossman L.C, Gould V.C., Dow J.M., et al. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol*. **9**: R74.

Daniels S.L. 1980. Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surface. In: Bitton G., Marshall K.C. (eds.). *Adsorption of microorganisms to surface*. John Wiley & Sons: New York, NY, USA. pp. 5–185.

Dasgupta M.K. 2002. Biofilms and infection in dialysis patients. *Semin Dial*. **15**: 338–346.

De Mauri A., Torreggiani M., Chiarinotti D., Andreoni S., Molinari G., De Leo M. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging pathogen in dialysis units. *Journal of Medical Microbiology*. **63**: 1407-1410.

de Oliveira-Garcia D., Dall'Agnol M., Rosales M., et al. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol*. **5**: 625–636.

Demiraslan H., Sevim M., Pala C., et al. 2013. Risk factors influencing mortality related to *Stenotrophomonas maltophilia* infection in hematology-oncology patients. *Int J Hematol*. **97**: 414–420.

Denton M., Kerr K.G. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev*. **11**: 57–80.

Donlan R.M., Pipes W.O. 1988. Selected drinking water characteristics and attached microbial population densities. *J. Am. Water Work. Assoc.* **80**: 70–76.

Escalante G., Campos V.L., Valenzuela C., Yañez J., Zaror C., Mondaca M.A. 2006. Rol de los microorganismos en la especiación química del arsénico: análisis de sedimentos del río camarones, I Región. Chile. *Revista AIDIS*.

Figel I.C., Dalzoto P.R., Pimentel I.C. 2015. Microbiological quality of water and dialysate from haemodialysis units in Southern Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz.* **74**(1): 66–70.

Flemming H.C., Schaule G. 1988. Biofouling on membranes—A microbiological approach. *Desalination.* **70**: 95–119.

Flemming H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–633.



Flemming H.C., Griebe T., Schaule G., Schmitt J., Tamachkiarowa A. 1997. Biofouling—The Achille's heel of membrane processes. *Desalination.* **113**: 215–225.

Fonseca C., Jonasb D., Garcia J.I., Ferraz J., Perdigão L.V., Ruedas R., Morenoc L.Z., Rossi A., Levina A.S., Figueiredo S. 2018. Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: Description of new MLST profiles and resistance and virulence genes using whole-genome sequencing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* **15**: 212–214.

Furuya R., Kumagai H., Takahashi M., Sano K., Hishida A. 2005. Ultrapure dialysate reduces plasma levels of beta2-microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients. *Blood Purif.* **23**: 311–6.

Garland J. 1997. MiniReview: Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecol.* **24**: 289-300.

Garland J. L. & Mills A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 2351-2359.

Ghaffour N., Missimer T.M., Amy G.L. 2013. Technical review and evaluation of the economics of water desalination: current and future challenges for better water supply sustainability. *Desalination.* **309**: 197-207.

Gómez-Suárez C., Pasma J., Van der Borden A.J., Wingender J., Flemming, H.C., Busscher H.J., van der Maei H.C. 2002. Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* **148**: 1161–1169.

Graf A.C., Leonard A., Schauble M., Rieckmann L.M., Hoyer J., Maas S., Lalk M., Becher D., Pane-Farre J., Riedel K. 2019. Virulence Factors Produced by *Staphylococcus aureus* Biofilms Have a Moonlighting Function Contributing to Biofilm Integrity. *Molecular & Cellular Proteomics.* **18** (6): 1036-1053.

Guo L.L., Pan Y., Zhu X.J., Tan L.Y., Xu Q.J., Jin H.M. 2011. Conventional, but not high-purity, dialysate-induced monocyte apoptosis is mediated by activation of PKC-delta and inflammatory factors release. *Nephrol Dial Transplant.* **26**: 1516–22.

Haack S.K., Garchow H., Klug M.J., Forny L.J. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1458–1468.

Haethem Q.M., Anwer T.S. 2019. Molecular study of bacterial infection from hemodialysis patients in Wasit centre, Iraq. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **10**(1): 489-499.

Heidarieh P., Hashemi Shahraki A., Yaghoubfar R., Hajehasani A., Mirsaeidi M. 2016. Microbiological Analysis of Hemodialysis Water in a Developing Country. *ASAIO Journal.* **62**(3): 332-339.

Herzberg M., Elimelech M. 2007. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. *Journal of Membrane Science.* **295**: 11–20.

Herzberg M., Elimelech M. 2007. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. *Journal of Membrane Science.* **295**: 11–20.

Hijnen W.A.M., Biraud D., Cornelissen E.R., van der Kooij D. 2009. Threshold concentration of easily organic carbon in feedwater for biofouling of spiral-wound membranes. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 4890–4895.

Hoek E.M.V. 2013. In High Throughput Screening of Biofilm Formation and Removal on Water Treatment Membranes, ACS Advances in Materials & Processes for Polymeric Membrane Mediated Water Purification, Pacific Grove, California, USA, February 24-27, 2013; Freeman, B., Ed. American Chemical Society: Pacific Grove, California, USA.

Hoenic N.A., Ronco C., Levin R. 2005. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif.* **24** (1): 11-18.

Honda H., Suzuki H., Hosaka N., Hirai Y., Sanada D., Nakamura M., et al. 2009. Ultrapure dialysate influences serummyeloperoxidase levels and lipid metabolism. *Blood Purif.* **28**: 29–39.

Hsu P.Y., Lin C.L., Yu C.C., Chien C.C., Hsiau T.G., Sun T.H., et al. Ultrapure dialysate improves iron utilization and erythropoietin response in chronic hemodialysis patients — a prospective cross-over study. *J Nephrol.* **17**: 693–700.

Jackson A.A., Gross M.J., Daniels E.F., Hampton T.H., Hammons J.H., Vallet-Gely I., et al. 2013. Anr and its activation by PlcH activity in *Pseudomonas aeruginosa* host colonization and virulence. *J Bacteriol.* **195**(13): 3093-104.

Kashiwagi T., Sato K., Kawakami S., Kiyomoto M., Takei H., Suzuki T., Genei H., Nakata H., Iino Y., Katayama Y. 2011. The performance evaluation of endotoxin retentive filters in haemodialysis. *J Nippon Med Sch.* **78** (4): 214-223.

Khan M.M.T., Stewart P.S., Moll D.J., Mickols W.E., Nelson S.E., Camper A.K. 2011. Characterization and effect of biofouling on polyamide reverse osmosis and nanofiltration membrane surfaces. *Biofouling.* **27**(2): 173-183.

Komlenic, R. 2010. Rethinking the causes of membrane biofouling. *Filtration & Separation.* **47**: 26–28.

Kulakov L.A., McAlister M.B., Ogden K.L., Larkin M.J., O'Hanlon J.F. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1548–1555.

Kwak S.Y., Ihm D.W. 1999. Use of atomic force microscopy and solid-state NMR spectroscopy to characterize structure property-performance correlation in high-flux reverse osmosis (RO) membranes. *J Membrane Sci.* **158**:143–153.

Kwan B.C., Chow K.M., Ma T.K., Cheng P.M., Leung C.B., Li P.K., et al. 2013. Effect of using ultrapure dialysate for hemodialysis on the level of circulating bacterial fragment in renal failure patients. *Nephron Clin Pract.* **123**: 246–53.

Lambert P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J RSoc Med. **95**(41): 22-26.

Lederer S.R., Schiff H. 2002. Ultrapure dialysis fluid lowers the cardiovascular morbidity in patients on maintenance hemodialysis by reducing continuous microinflammation. Nephron. **91**: 452–5.

León, C. 2013. Biotransformación de roxarsona por bacterias asociadas a suelo agrícola y su implicancia en la contaminación de los sistemas acuáticos. Tesis Magíster en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas.

Levin J., Bang F.B. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull Johns Hopkins Hosp. **115**: 337.

Levin J., Bang F.B. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. **115**: 265.

Looney W.J., Narita M., Mühlemann K. 2009. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis. **9**: 312–323.

Magalhães M., Doherty C., Govan J.R.W., Vandamme P. 2003. Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients. J Hosp Infect. **54**: 120–123.

Manz W., Amman R., Ludwig R., Wagner M., Schleifer K.H. 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. Systematic and Applied Microbiology. **15**: 593-600.

Marshall K.C. 1985. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In: Savage D.C., Fletcher M., (eds.). *Bacterial Adhesion*. Plenum Press: New York, NY, USA. pp. 133–161.

Marshall K.C., Blainey B.L. 1991. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: Flemming, H.C., Geesey G.G., (eds.). *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water System* Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. pp. 29–46.

Matin A., Khan Z., Zaidi S.M.J., Boyce M.C. 2011. Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: phenomena and prevention. *Desalination*. **281**: 1-16.

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H.C. 1999. The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 3–16.

Mc Eldowney S., Fletcher, M. 1986. Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 513–523.

Meier H., Amann R., Ludwig R., Schleifer K.H. 1999. Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C Content. *Systematic and Applied Microbiology*. **22**: 186-196.

Milstead C.E., Riley R.L. 1993. Development of an Improved Cleaning Solution for ROWPU Units; SST Report No.2809–1; Technical Report for Separation Systems Technology: San Diego, CA, USA.

Montaño-Remacha C., Márquez-Cruz M.D., Hidalgo-Guzmán P., Sánchez-Porto A., Téllez-Pérez F.P. 2015. Brote de bacteriemia por *Burkholderia cepacia* en una unidad de hemodiálisis de Cádiz, 2014. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **33**(10): 646-650.

Muñiz S., Lacarta J., Pata M.P., Jiménez J.J., Navarro E. 2014. Analysis of the Diversity of Substrate Utilisation of Soil Bacteria Exposed to Cd and Earthworm Activity Using Generalised Additive Models. *PLoS ONE*. **9**(1): e85057.

Murphy A.P., Moody C.D., Riley R.L., Lin S.W., Murugaverl B., Rusin P. 2001. Microbiological damage of cellulose acetate RO membranes. *J. Membr. Sci.* **193**: 111–121.

Nakano M., Deguchi T., Kawamura T., Yasuda M., Kimura M., Okano Y., et al. 1997. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(10):2289-91.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement NCCLS document M100-S24. Wayne, PA, USA.

Nguyen D.B., Shugart A., Lines C., et al. 2017. National Healthcare Safety Network (NHSN) dialysis event surveillance report for 2014. *Clin J Am Soc Nephrol.* **12**(7):1139-1146.

Nicodemo A.C., Paez J. I. 2007. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **26**: 229–237.

Novosad S.A., Lake J., Nguyen D., Soda E., Moulton-Meissner H., Pho M.T., Gualandi N., Bepo L., Stanton R.A., Daniels J.B., Turabelidze G., Van Allen K., Arduino M., Halpin A.L., Layden J., Patel P.R. 2019. Multicenter Outbreak of Gram-Negative Bloodstream Infections in Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis.* **74**(5): 610-619.

Nseir S., Di Pompeo C., Brisson H. 2006. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care.* **10**: R143.

O'Loughlin C.T., Miller L.C., Drescher K., Semmelhack M.F., Bassler B.L. 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**(44):17981-6.

Ouseph R., Jones S., Dhananjaya N., Ward R.A. 2007. Use of ultrafiltered dialysate is associated with improvements in haemodialysis associated morbidity in patients treated with reused dialysers. *Nephrol Dial Transplant.* **22**: 2269–75.

Pankuch G. A., Jacobs M. R., Rittenhouse S. F., Appelbaum P. C. 1994. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight beta-lactams (including beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2317–2322.

Park N., Kwon B., Kim I.S., Cho J. 2005. Biofouling potential of various NF membranes with respect to bacteria and their soluble microbial products (SMP): Characterization, flux decline, and transport parameters. *J. Membr. Sci.* **258**: 43–54.

Park S.K., Hu J.Y. 2010. Assessment of the extent of bacterial growth in reverse osmosis system for improving drinking water quality. *Journal of Environmental Science and Health.* **45**: 968–977.

Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol.* **9**(6):1132-47.

Pérez-García R., García R., González E., Solozábal C., Ramírez R., Martín-Rabadán P., Sobrino P.E., Gallego O., Domínguez J., de la Cueva E., Ferllen R. 2016. Guía de gestión de calidad del líquido de diálisis (LD). *Nefrología.* **36**(3): 1-52.

Pielou E.C. 1975. *Ecological diversity*. Wiley, New York.

Pisani B., Simões, M., Prandi M.A.G., Rocha M.M.M., Gonçalves, C.R., Vaz T.M.I., Irino K. 2000. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz.* **59**: 51–56.



Pizzaro-Cerda J. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* **124**(4):715-27.

Pla L. 2006. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia.* **31**(8): 583-590.

Poblete H. 2018. XXXVIII Cuenta de Hemodiálisis Crónica (HDC) en Chile. *Sociedad Chilena de Nefrología, Registro de Diálisis.* 3-120.

Ridgway H. 2010. Membrane materials: Theory, chemistry, structure and the future. In: Ridgway H. (ed.). *International Symposium on Membrane Biofouling...Science & Solutions*, National Water Research Institute: Bisbee, Arizona, USA.

Ridgway H.F., Flemming H.C. 1996. Membrane biofouling. In: Mallevalle.P.E.O.J., Wiesner.M.R, (eds.). Water treatment membrane processes. McGraw-Hill. New York. p. 6.1–6.62.

Ridgway H.F., Rigby M.G., Argo D.G. 1985. Bacterial adhesion and fouling of reverse osmosis membranes. J. Am. Water Work. Assoc. **77**: 97–106.

Ridgway H.F., Safarik J. 1991. Biofouling of reverse osmosis membranes. In: Flemming H.C., Geesey G.G. (eds.) Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water System. Springer Verlag: Heidelberg, Germany. pp. 81–111.

Rioufol C., Devys C., Meunier G., Perraud M., Goulet D. 1999. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. J Hosp Infect. **43**: 203–209.

Rosenberg J. 2005. Primary bloodstream infections associated with dialyzer reuse in California dialysis centers. 43rd Meeting of the Infectious Diseases Society of America.

Sadr Ghayeni S.B., Beatson P.J., Schneider R.P., Fane A.G. 1998. Adhesion of wastewater bacteria to reverse osmosis membranes. J. Membr. Sci. **138**: 29–42.

Samonis G., Karageorgopoulos D. E., Maraki S., Levis P., Dimopoulou D., Spernovasilis N. A., Kofteridis D. P., Falagas M. E. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. PLoS ONE. **7**: e37375.

Schiffel H., Lang S.M., Fischer R. 2002. Ultrapure dialysis fluid slows loss of residual renal function in new dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. **17**: 1814–8.

Schiffl H., Lang S.M., Stratakis D., Fischer R. 2001. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant.* **16**: 1863–9.

Scholte J.B., Zhou T.L., Bergmans D.C., et al. 2016. *Stenotrophomonas maltophilia* ventilator-associated pneumonia. A retrospective matched case-control study. *Infect Dis.* **48**: 738–743.

Shahryari A., Nikaeen M., Hatamzadeh M., Vahid Dastjerdi M., Hassanzadeh A. 2016. Evaluation of bacteriological and chemical quality of dialysis water and fluid in Isfahan, Central Iran. *Iran J Public Health.* **45**(5): 650-656.

Shannon C.E., Weaver W. 1963. *The mathematical theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana.

Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y. 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* **28**: 882–894.

Shimon O., Green H., Eliakim-Raz N., Rozen-Zvi B., Ben-Zvi H., Zohar I., Bishara J., Yahav D. 2018. Gram-negative bloodstream infections in hemodialysis patients: A retrospective study. *Clinical Nephrology.* **90**(2):117-124.

Solum N.O. 1970. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **23**: 170.

Solum N.O. 1973. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* **2**: 55.

Spiers A.J., Buckling A., Rainey P.B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology.* **146**(10): 2345-50.

Stenvinkel P., Alvestrand A. 2002. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial.* **15**: 329–337.

Stenvinkel P., Carrero J.J., Axelsson J., Lindholm B., Heimbürger O., Massy Z. 2008. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: How do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J AmSoc Nephrol.* **3**: 505–21.

Streeter K., Katouli M. 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med.* **2**(1): 25-32.

Susantitaphong P., Riella C., Jaber B.L. 2013. Effect of ultrapuredialysate on markers of inflammation, oxidative stress, nutrition and anemia parameters: A meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* **28**: 438–46.

Tao J., Sun Y., Li X., Li H., Liu S., Wen Y., et al. 2010. Conventional versus ultrapure dialysate for lowering serum lipoprotein(a) levels in patients on long-term hemodialysis: a randomized trial. *Int J Artif Organs.* **33**: 290–6.

Tapia G., Yee J. 2006. Biofilm: its relevance in kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* **13**: 215–224.

Torres S.K., Campos V.L., León C.G., Rodríguez-Llamazares S.M., Rojas S.M., González M., Smith C., Mondaca M.A. 2012. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research.* **14**: 1-9.

Trifonova A., Strateva T. 2018. *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infectious Diseases.* **0**(0): 1-12.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata, A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 287–292.

Vartivarian S., Anaissie E., Bodey G., Sprigg H., Rolston K. 1994. A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 624–627.

Vrouwenvelder J.S., van der Kooij D. 2002. Diagnosis of fouling problems of NF and RO membrane installations by a quick scan. *Desalination.* **153**: 121–124.

Ward R.A. 1997. Water processing for hemodialysis. Part I: a historical perspective. *Semin Dial.* **10**:26–31.

Ward R.A. 2004. Ultrapure dialysate. *Semin Dial.* **17**:489–497.

Waters V., Atenafu E.G., Lu A., et al. 2013. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* **12**: 482–486.

Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7): 8-2853.

Wilbert M.C. 1997. Enhancement of Membrane Fouling Resistance through Surface Modification. A Study Using the Principle of Membrane Fouling and Cleaning To Develop Ways to Enhance Membrane Fouling Resistance; Water Treatment Technology Program Report No. 22; US Department of the Interior, Bureau of Reclamation: Denver, CO, USA, 1997.

Yonezawa M., Takahata M., Matsubara N., Watanabe Y., Narita H. 1995. DNA gyrasegyrA mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(9):1970-2.

Young N.S., Levin J., Prendergast R.A. 1972. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* **51**: 1790.

Zhang X.Q., Bishop P.L. 2001. Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilms. *J. Environ. Eng.* **127**: 850–856.

