



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

DESINFECCIÓN MEDIANTE CLORO Y OZONO PARA INACTIVAR *Vibrio cholerae* EN SU  
ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE, UTILIZANDO MICROSCOPIA FESEM PARA  
EVALUAR LOS DAÑOS A LA BACTERIA

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
I. Q. ATENGUEÑO REYES KARINA

TUTOR PRINCIPAL  
M. en C. ISAURA YÁÑEZ NOGUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR  
DRA. SOFÍA E. GARRIDO HOYOS, IMTA  
M. en C. GLORIA MORENO RODRÍGUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. Garrido Hoyos Sofía Esperanza

Secretario: M. en C. Moreno Rodríguez Gloria

Vocal: Dra. Orta Ledesma María Teresa

1<sup>er.</sup> Suplente: Dr. De los Cobos Vasconcelos Daniel

2<sup>do.</sup> Suplente: M. en C. Yáñez Noguez Isaura

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de ingeniería ambiental, Instituto de Ingeniería, UNAM, Ciudad de México

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México

**TUTOR DE TESIS:**

M. en C. Isaura Yáñez Noguez

-----  
**FIRMA**

*(Segunda hoja)*



**El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015**

**No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del  
09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020**

## Agradecimientos

- Al CONACyT por el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.
- Al posgrado de Maestría y Doctorado en Ingeniería Ambiental por la aceptación al programa y por la orientación recibida a lo largo de mi estancia.
- Al proyecto IT100618 PAPIIT-DGAPA por el apoyo y recursos otorgados para el desarrollo de este trabajo.
- Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM (II UNAM) por las facilidades brindadas para la realización de la experimentación correspondiente.
- Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) por las facilidades brindadas para la realización de los ensayos de q-PCR-PMA.
- Dr. Omar Novelo Peralta del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME) del Instituto en Investigaciones en Materiales (IIM) por el apoyo brindado para la obtención de las imágenes FESEM.
- A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfías del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo en el secado a punto crítico de las muestras para microscopía FESEM.
- A la Mtra. Isaura Yáñez por su apoyo y orientación recibida a lo largo de la elaboración del trabajo experimental y del escrito de tesis.
- A la Dra. Sofía Garrido y a la M. en C. Gloria Moreno, por sus observaciones y comentarios a lo largo de la elaboración de este trabajo.
- A la Dra. Teresa Orta por el tiempo invertido y las observaciones hechas a este trabajo, así como el apoyo recibido durante la realización del trabajo de tesis.
- Al Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos del II UNAM por su ayuda en la obtención de las imágenes FESEM y por el tiempo invertido para la revisión del presente trabajo.
- A Beatriz Casasola, por la ayuda y orientación en la realización de las pruebas de q-PCR-PMA, te lo agradezco mucho.
- A los compañeros del cubículo 410 del edificio 5 del lingen, por su ayuda, especialmente a Axa.

- A David y Anelly por ser buenos compañeros y amigos en el laboratorio, en el cubículo y fuera del Instituto de Ingeniería.
- A Alejandro, aunque no lo conozco mucho, ha sido un gran apoyo para mí.
- A Emilio por preocuparse tanto por mí y darme su apoyo cuando más lo he necesitado.
- A Paquito, por preocuparse por mí y ser mi mejor amigo, a pesar de que esté lejos, le tengo mucho aprecio, aunque a veces solo me molesta con lo que le confío.
- A mis mejores amigas, Jocelyn y Johana, por estar siempre a mi lado y ser las mejores amigas del mundo.
- A mis amigos de generación de IQ36, Ale, Kevin, Carlos, Myrna, Fidel, Julio, Diana, Enrique, Chío, por seguir siendo parte de mi vida aún después de la carrera.
- A mi familia, por siempre apoyarme y estar conmigo cuando más los necesito.
- A mis dos gatas, Mako y Lince por sus maullidos y ronroneos que siempre me daban ánimo de seguir adelante.
- Y sobre todo, a la UNAM, por ser parte de mi vida desde el CCH, le debo mucho a esta hermosa universidad.

*El hombre que conoce la verdad está más allá del bien y el mal.  
El hombre que conoce la verdad ha comprendido que la ilusión  
es la realidad única y que la sustancia es la gran impostora.*

H. P. Lovecraft

### **Participación en congresos**

- Atengueño Reyes, K., Yáñez Noguez, I., Orta Ledesma, M. T. (Octubre, 2018) *Daños estructurales a la bacteria Vibrio cholerae viable no cultivable sometida a procesos de desinfección mediante cloro y ozono.* XXXVI Congreso interamericano de Ingeniería sanitaria y ambiental. Congreso realizado en Guayaquil, Ecuador. (Presentado en ponencia oral)
- Yáñez Noguez, I., Orta Ledesma, M. T., Atengueño Reyes, K. (Octubre 2018) *Cinética de desinfección con cloro y ozono para inactivar las formas resistentes de Vibrio cholerae en agua.* XXXVI Congreso interamericano de Ingeniería sanitaria y ambiental. Congreso realizado en Guayaquil, Ecuador. (Ganador en la categoría de Mejor trabajo técnico de Agua Potable).
- Yáñez Noguez, I., Atengueño Reyes, K., Pérez Cenobio, D., Luna Hernández, A. J., Orta Ledesma, M. T. (octubre 2018). *Efecto del cloro y el ozono en la ultraestructura celular de Vibrio cholerae variante rugosa.* XXXVI Congreso interamericano de Ingeniería sanitaria y ambiental. Congreso realizado en Guayaquil, Ecuador.

## Índice

Índice.....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de gráficas.....	xi
Índice de Tablas .....	xii
Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco teórico.....	5
2.1 Calidad del agua .....	5
2.2 <i>Vibrio</i> .....	10
2.2.1 <i>Vibrio cholerae</i> .....	10
2.2.2 Cuadro clínico.....	13
2.2.3 Toxina colérica.....	14
2.2.4 Riesgo biológico.....	15
2.3 Cólera .....	16
2.3.1 Cólera en el mundo.....	16
2.3.2 Cólera en México .....	18
2.4 Bacterias viables no cultivables (VNC) .....	20
2.5. Desinfección de agua .....	22
2.5.1 Agentes químicos .....	23
2.5.1.1 Cloro.....	23
2.5.1.2 Dióxido de cloro .....	32
2.5.1.3 Ozono .....	34
2.5.1.4 Otros desinfectantes químicos .....	40
2.5.2 Agentes físicos .....	45
2.5.2.1 Radiación UV.....	45
2.5.2.2 Otros agentes físicos para desinfección de agua .....	47
2.5.3 Comparación de las características de desinfectantes.....	48
2.5.4 Mecanismos de desinfección .....	51
2.5.4.1 Mecanismo de desinfección del cloro.....	51
2.5.4.2 Mecanismo de desinfección del ozono.....	52
2.5.5 Modelos de cinéticas de desinfección .....	54
2.6 Análisis de biología molecular .....	56
2.6.1 Tinciones .....	56
2.6.2 Tinciones genéticas .....	57
2.6.3 PCR.....	57
2.6.4 Electroforesis en gel .....	59
2.6.5 q-PCR.....	59
2.7 Microscopía electrónica.....	59
2.7.1 Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) .	62
2.7.2 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	65
3 Antecedentes.....	66

4	Hipótesis y objetivos .....	73
4.1	Hipótesis .....	73
4.2	Objetivo general .....	73
4.2.1	Objetivos específicos .....	73
5	Metodología.....	74
5.1	Cultivo de <i>V. cholerae</i> e inducción al estado VNC .....	74
5.2.1	Supervisión de la pérdida de cultivo por siembra en placa.....	76
5.2.2	Microscopía óptica .....	77
5.3	Parámetros fisicoquímicos.....	77
5.4	Desinfección.....	78
5.4.1	Desinfección con cloro y ozono.....	79
5.5	Microscopía FESEM.....	87
5.6	Análisis de q-PCR-PMA .....	90
5.6.1	Propidio de monoazida (PMA) .....	90
5.6.2	Extracción de ADN.....	91
5.6.3	q-PCR.....	92
6	Diseño experimental .....	94
7	Resultados y discusión .....	98
8.	Conclusiones .....	131
9.	Glosario .....	132
10.	Bibliografía .....	134
	ANEXOS.....	142
	Anexo A. Preparación de soluciones .....	142
	Anexo B. Memoria fotográfica .....	146
	ANEXO C. Programa en RStudio .....	151
	ANEXO D. Prueba de Tukey .....	154

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Vías de transmisión y ejemplos de agentes patógenos relacionados con el agua (OMS, 2006) .....	8
<b>Figura 2</b> <i>Vibrio cholerae</i> .....	11
<b>Figura 3</b> Clasificación serológica de <i>V. cholerae</i> .....	11
<b>Figura 4</b> Ciclo de vida de <i>V. cholerae</i> .....	13
<b>Figura 5</b> Mecanismo de la toxina colérica (Garza-Velasco et. al., 1998) .....	14
<b>Figura 6</b> Acción de la toxina colérica .....	15
<b>Figura 7</b> Eventos evolutivos clave en la epidemiología del cólera desde 1817.....	18
<b>Figura 8</b> Estados de México afectados por el brote de cólera, año 2013.....	19
<b>Figura 9</b> Cólera en México (elaboración propia).....	20
<b>Figura 10</b> Curva en la cloración a punto de quiebre (CONAGUA, 2007) .....	30
<b>Figura 11</b> Esquema básico de la ozonización (Solsona, 2012) .....	36
<b>Figura 12</b> Diagrama de un generador de ozono de tubos dieléctrico (Solsona, 2012).....	37
<b>Figura 13</b> Contactor de agitación por turbina .....	37
<b>Figura 14</b> Contactor de burbuja.....	38
<b>Figura 15</b> Efecto de la turbiedad en la desinfección con radiación UV (CONAGUA, 2007) .....	46
<b>Figura 16</b> Escala de pH para el par HOCl/OCl <sup>-</sup> (elaboración propia) .....	51
<b>Figura 17</b> Mecanismo de acción del cloro (ACC, 2016).....	52
<b>Figura 18</b> Ozono atacando la pared celular.....	53
<b>Figura 19</b> Lisis celular causada por la oxidación con ozono .....	53
<b>Figura 20</b> Curvas de sobrevivencia (adaptado de Gyürék y Finch, 1998).....	54
<b>Figura 21</b> Proceso de replicación de ADN.....	58
<b>Figura 22</b> Componentes de un microscopio SEM (Serveis Tècnics D'Investigació, 2012) .....	62
<b>Figura 23</b> Volumen de excitación primaria (Sorrivas et. al., 2014).....	64
<b>Figura 24</b> Diagrama general de la metodología.....	74
<b>Figura 25</b> Espectrofotómetro BIO-RAD Smart Spect™ 3000.....	75
<b>Figura 26</b> Cultivo de <i>V. cholerae</i> .....	76
<b>Figura 27</b> Potenciómetro TermoScientific Orion Star A211 .....	78
<b>Figura 28</b> Kit multiparámetros Oakton PCD650.....	78
<b>Figura 29</b> Equipo medición cloro Hach.....	79
<b>Figura 30</b> Columna de vidrio .....	80
<b>Figura 31</b> Lavador de gases.....	82
<b>Figura 32</b> Titulación de yoduro de potasio.....	82
<b>Figura 33</b> Diagrama de proceso de ozonización .....	83
<b>Figura 34</b> Espectrofotómetro Hach.....	84
<b>Figura 35</b> Desinfección con cloro y ozono .....	86

<b>Figura 36</b> Minicentrífuga Spectrafuge 24D Labnet .....	87
<b>Figura 37</b> Preparación de muestras para microscopía electrónica FESEM .....	88
<b>Figura 38</b> Microscopio electrónico FESEM JEOL JSM-7600F .....	89
<b>Figura 39</b> Equipo de sputtering .....	89
<b>Figura 40.</b> Diagrama de tratamiento de muestras para microscopía FESEM .....	89
<b>Figura 41</b> Exposición de la mezcla de reacción a luz halógena.....	90
<b>Figura 42</b> Extractor de ácidos nucleicos Biomériux easyMAG™ .....	91
<b>Figura 43</b> Etapas de extracción de ácido nucleicos.....	92
<b>Figura 44</b> Análisis q-PCR-PMA .....	93
<b>Figura 45</b> Pérdida de cultivo de <i>V. cholerae</i> en placas de TSA.....	100
<b>Figura 46</b> Siembra en agar TCBS para confirmación de <i>V. cholerae</i> .....	101
<b>Figura 47</b> Morfología <i>V. cholerae</i> , día 21 de inducción (Tinción de Gram), aumento a 100x con aceite de inmersión en microscopio óptico.....	102
<b>Figura 48</b> Micrografías de la inducción de <i>V. cholerae</i> a VNC.....	103
<b>Figura 49</b> Micrografías de la desinfección con cloro sobre <i>V. cholerae</i> VNC.....	110
<b>Figura 50</b> Micrografías de la desinfección con ozono sobre <i>V. cholerae</i> VNC.....	118
<b>Figura 51</b> Cocoides a $Ct= 18 \text{ mg min L}^{-1}$ para el desinfectante ozono .....	118
<b>Figura 52</b> Resonancia del ozono, CONAGUA, 2007 .....	119
<b>Figura 53</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tratada con ozono, observación por microscopía TEM.....	122
<b>Figura 54</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tratada con ozono, observación por microscopía SEM.....	123

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1</b>	Caudal potabilizado municipal (CONAGUA, 2017) .....	9
<b>Gráfica 2</b>	Curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> .....	98
<b>Gráfica 3</b>	Demanda inicial de cloro para la bacteria <i>V. cholerae</i> VNC .....	106
<b>Gráfica 4</b>	Ley de Chick para el desinfectante cloro .....	108
<b>Gráfica 5</b>	Ley de Chick – Watson para el desinfectante cloro.....	109
<b>Gráfica 6</b>	Decaimiento de ozono en agua .....	113
<b>Gráfica 7</b>	Demanda inicial de ozono para la bacteria <i>V. cholerae</i> VNC .....	114
<b>Gráfica 8</b>	Ley de Chick para el desinfectante ozono.....	116
<b>Gráfica 9</b>	Ley de Chick – Watson para el desinfectante ozono.....	117
<b>Gráfica 10</b>	Interacción con respecto al tiempo para la desinfección con cloro .....	126
<b>Gráfica 11</b>	Interacción con respecto a la concentración para la desinfección con cloro	126
<b>Gráfica 12</b>	Interacción con respecto al tiempo para la desinfección con cloro .....	129
<b>Gráfica 13</b>	Interacción con respecto a la concentración para la desinfección con ozono	130

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Agentes patógenos transmitidos por el agua (OMS, 2006) .....	7
<b>Tabla 2</b> Taxonomía del género <i>Vibrio</i> de acuerdo con el manual de Bergey's.....	10
<b>Tabla 3</b> Bacterias reportadas que presentan el estado VNC (Oliver, 2005) .....	21
<b>Tabla 4</b> Factores que influyen en la desinfección .....	22
<b>Tabla 5</b> Vocabulario de cloración (CONAGUA, 2007).....	24
<b>Tabla 6</b> Características de algunos compuestos de cloro usados en cloración de agua (Solsona, 2002) .....	25
<b>Tabla 7</b> Dosis y condiciones de aplicación de cloro para la oxidación de Fe y Mn (CONAGUA, 2007) .....	28
<b>Tabla 8</b> Factores que afectan la eficiencia de la cloración .....	30
<b>Tabla 9</b> Dióxido de cloro (Elaboración propia, adaptado de Metcalf y Eddy, 1996).....	32
<b>Tabla 10</b> Métodos de determinación de cloro residual (CONAGUA, 2007) .....	33
<b>Tabla 11</b> Efectos del ozono sobre la salud (Water Environment Federation, 1996) .....	39
<b>Tabla 12</b> Características de otros desinfectantes químicos (elaboración propia).....	41
<b>Tabla 13</b> Agentes físicos para desinfección de agua.....	47
<b>Tabla 14</b> Comparación de características de los desinfectantes (Metcalf y Eddy, 1996) .....	49
<b>Tabla 15</b> Generalidades de los requerimientos de desinfección para una inactivación de 99% (Mihelcic y Zimmerman, 2012).....	50
<b>Tabla 16</b> Espectro de acción del ozono sobre microorganismos (adaptado de CONAGUA, 2007) .....	52
<b>Tabla 17</b> Modelos de cinética de desinfección; (Miranda, 2005).....	55
<b>Tabla 18</b> Principales señales en SEM y su aplicación (Sorrivas, et. al., 2014).....	64
<b>Tabla 19</b> Tiempos de contacto para el desinfectante cloro .....	80
<b>Tabla 20</b> Tiempos de contacto para el desinfectante ozono .....	85
<b>Tabla 21</b> Mezcla de reacción para q-PCR .....	92
<b>Tabla 22</b> Tiempos de contacto para cada desinfectante .....	95
<b>Tabla 23</b> Factor CT para el desinfectante ozono .....	96
<b>Tabla 24</b> Factor Ct para el desinfectante cloro .....	96
<b>Tabla 25</b> Parámetros fisicoquímicos del ASW .....	104
<b>Tabla 26</b> Resultados de q-PCR-PMA para <i>V. cholerae</i> VNC, desinfectante: Cloro.....	107
<b>Tabla 27</b> Desinfección con cloro sobre <i>V. cholerae</i> VNC.....	111
<b>Tabla 28</b> Dosis aplicadas de cloro en plantas potabilizadoras (CONAGUA; 2007) .....	111
<b>Tabla 29.</b> Resultados de q-PCR-PMA para <i>V. cholerae</i> VNC, desinfectante: Ozono....	115
<b>Tabla 30</b> Desinfección con ozono sobre <i>V. cholerae</i> VNC.....	120
<b>Tabla 31</b> Dosis de ozono para diversos contaminantes en agua (CONAGUA; 2007) ...	120
<b>Tabla 32</b> ANOVA para la desinfección con cloro .....	124
<b>Tabla 33</b> ANOVA para la desinfección con ozono .....	127

## Resumen

La bacteria *V. cholerae* ha tomado importancia debido a que puede adaptarse a los cambios ambientales que sufre su entorno, por ejemplo, cambios de temperatura, salinidad, pH, falta de nutrientes; permitiendo que estos patógenos generen resistencia. El mecanismo de defensa que presentan este patógeno es la inducción a un estado viable no cultivable (VNC), el cual consiste en un cambio morfológico de la célula bacteriana de bacilo a cocoide.

La bacteria *Vibrio cholerae* es un patógeno que ha participado en diferentes epidemias de cólera en los últimos años. Aunado a ello, se ha reportado su presencia en el ambiente acuoso en estado VNC. Esto adquiere relevancia, ya que, al generarse resistencia por parte de la bacteria, los procesos de desinfección convencionales no permiten una adecuada inactivación en el agua.

En este trabajo se probó la desinfección en el ambiente acuoso sobre la bacteria *V. cholerae* en estado VNC, aplicando ozono y comparando con el desinfectante común el cloro. La eficacia de los desinfectantes usados se determinó de manera cualitativa y cuantitativa. El aspecto cualitativo se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo observando los daños estructurales que ambos desinfectantes causan a la bacteria. La evaluación cuantitativa se llevó a cabo para determinar la remoción de *V. cholerae* en su estado VNC una vez realizado el proceso de desinfección con cloro u ozono, para ello se realizó el conteo de las células bacterianas intactas utilizando la técnica de biología molecular q-PCR-PMA.

Con los resultados obtenidos fue posible determinar que el ozono es un desinfectante altamente oxidante que a bajas concentraciones y bajos tiempos de contacto proporciona mayores porcentajes de inactivación que cloro para la bacteria *V. cholerae* en estado VNC y que los daños estructurales observados en las células fueron más severos con el ozono que con el cloro. Para ambos desinfectantes se usó en valor de Ct de  $1.5 \text{ mg min L}^{-1}$  se obtiene un porcentaje de remoción del 93.4% para el desinfectante cloro y para el ozono de 99.53%, observándose que a un valor igual de Ct el ozono es más eficaz para desinfectar.

## Abstract

The bacterium *Vibrio cholerae* has become important because it can adapt to environmental changes in the environment, for example, changes in temperature, salinity, pH, lack of nutrients, allowing to generate resistance. The defense mechanism presented by this pathogen is induction to a viable non-cultivable state (VBNC), which consists of a morphological change of the bacterial cell from bacillus to coccid.

The bacterium *V. cholerae* is a pathogen that has participated in different cholera epidemics in recent years. In addition, its presence has been reported in the aqueous environment in VBNC state. This acquires relevance, since, when resistance is generated on the part of the bacteria, the conventional disinfection processes do not allow an adequate inactivation in the water.

In this work was tested the disinfection in the aqueous environment on the bacterium *V. cholerae* in VBNC state, applying ozone and comparing with the common disinfectant chlorine. The effectiveness of the disinfectants used was determined qualitatively and quantitatively. The qualitative aspect was evaluated by field emission scanning electron microscopy (FESEM) observing the structural damage that both disinfectants cause to the bacteria. The quantitative evaluation was carried out to determine the removal of *V. cholerae* in its VNC state after the disinfection process with chlorine or ozone, for it was carried out the count of the intact bacterial cells using the technique of molecular biology q-PCR-PMA.

With the results obtained it was possible to determine that ozone is a highly oxidizing disinfectant that at low concentrations and low contact times provides higher percentages of inactivation than chlorine for the bacteria *V. cholerae* in VNC state and that the structural damage observed in the cells were more severe with ozone than with chlorine. For both disinfectants, a Ct value of 1.5 mg min L<sup>-1</sup> was used, obtaining a removal percentage of 93.4% for chlorine disinfectant and 99.53% for ozone, observing that at an equal Ct value, ozone is more effective for disinfecting.

## 1. Introducción

El agua contaminada y el saneamiento deficiente están relacionados con la transmisión de enfermedades como el cólera, otras diarreas, la disentería, la hepatitis A, la fiebre tifoidea y la poliomielitis. Los servicios de agua y saneamiento inexistentes, insuficientes o gestionados de forma inapropiada exponen a la población a riesgos prevenibles para su salud (OMS 2016). La gestión inadecuada de las aguas residuales urbanas e industriales, conlleva que el agua que beben cientos de millones de personas se vea peligrosamente contaminada por microorganismos y agentes químicos (OMS 2016). Los microorganismos presentes provocan enfermedades transmitidas por el agua, las cuales representan un tema de interés global que se estima causa más de 1.9 millones de muertes e innumerables casos de enfermedades cada año a nivel mundial (OMS 2011). Tal es el caso de las infecciones provocadas por la bacteria *Vibrio cholerae*.

El cólera, causado por *V. cholerae*, es una enfermedad diarreica aguda que, si no se trata, puede causar la muerte en cuestión de horas. Los investigadores calculan que cada año hay en el mundo entre 1,3 y 4 millones de casos de cólera, y entre 21 000 y 143 000 defunciones por esta causa (OMS, 2017).

El cólera es una enfermedad que se transmite por alimentos o agua contaminados con materia fecal. El cuadro clínico asociado a la enfermedad comprende diarrea intensa e indolora y vómitos. Se caracteriza por la presencia de heces líquidas con mucosidad, sin sangrado; estos efectos provocan la disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica, agotamiento de potasio, y en último término colapso vascular y muerte. Un 75% de las personas infectadas no presentan síntomas, el principal tratamiento es la rehidratación oral o intravenosa. Se ha reportado la presencia de *V. cholerae* en estado viable no cultivable (VNC) en ambientes acuáticos, esto indica la sobrevivencia de la bacteria fuera del intestino humano, al desarrollar el estado VNC puede sobrevivir hasta que encuentre condiciones favorables y vuelva a ser cultivable (Fernández y Alonso, 2009).

En México han existido brotes de la enfermedad como los de 1991 y 2001, sin embargo, en 2013 se reportó la transmisión de la enfermedad; se confirmaron 184 casos de cólera, cuya cepa fue identificada como O1 biotipo Ogawa. El mayor número de casos se localizó en Hidalgo con 157 casos, también hubo reportes en el Distrito Federal (Ciudad de México), Estado de México, San Luis Potosí y Veracruz. En el 2014 hasta la semana 48, se informó de 13 casos en Hidalgo y la Secretaría de Salud del estado de Querétaro reportó un caso. En 2015 se identificó un caso en Puebla y en agosto de 2016 se registró uno en Nayarit (Carrillo, 2015; CONAVE, 2016). Derivado de los brotes recientes, las autoridades sanitarias han reforzado la vigilancia, además de garantizar la disponibilidad y calidad de la atención prestada en unidades médicas.

A pesar de los brotes de cólera observados en el país, la normatividad mexicana no considera otros patógenos transmitidos a través del agua, específicamente no considera a *V. cholerae* dentro de la regulación nacional. La calidad del agua se evalúa conforme a la NOM-127-SSA1-1994 (2000), referida a “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”, la cual considera límites permisibles relacionados a parámetros bacteriológicos, físicos, propiedades organolépticas, químicas y radiactivas. Específicamente en el aspecto microbiológico, la norma oficial mexicana establece los límites permisibles considerando solo a las bacterias coliformes fecales y coliformes totales.

Ante esta problemática el presente estudio se enfoca en evaluar la eficacia del cloro y el ozono para la desinfección de agua contaminada con la bacteria *V. cholerae* en su estado VNC, la cual tiene importancia a nivel salud debido a casos de incidencia del cólera. Para dicha evaluación se utilizaron técnicas de biología molecular (q-PCR-PMA) para determinar la remoción de la bacteria mediante el conteo de logaritmos inactivados, así como micrografías de microscopía FESEM para la observación del daño celular después de la desinfección.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Calidad del agua

El agua es el principal vehículo de exposición humana a los peligros microbiológicos, al ser utilizada como bebida, en las actividades recreativas, en el riego de alimentos o en la conformación de aerosoles. Tanto bacterias como virus y parásitos pueden encontrarse contaminando este recurso. En el caso de estos últimos, la transmisión de parasitosis puede perdurar con el tiempo debido a que la gran mayoría de ellos posee un estadio que le confiere resistencia a los factores ambientales por largos períodos. Esto, unido al hecho de que en general no se realizan controles regulares de parásitos en las aguas que se usan como fuente de bebida, y menos aún en las que se usan como riego o con fines recreativos, hace que el riesgo de contraer parasitosis por hidrotransmisión sea desconocido y, en el mejor de los casos, subestimado (Mondaca y Campos, 2014).

Según la SEMARNAT en su publicación Estadísticas del agua en México versión 2015, hay estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que indican que en el mundo anualmente mueren aproximadamente 1.5 millones de niños por enfermedades diarreicas, de un total de 2.5 mil millones de casos infantiles anuales; ocurriendo en su mayoría en países en vías de desarrollo, lo que representa una carga significativa para los escasos recursos disponibles para salud pública. Adicionalmente, este tipo de enfermedades incide negativamente sobre la nutrición de los niños (CONAGUA, 2015).

Entre las enfermedades diarreicas se encuentran el cólera, la tifoidea y la disentería, todas ellas relacionadas con vías de transmisión fecal-oral. La mayor parte de las muertes por causa de estas enfermedades se podría evitar con acciones en los temas de agua potable, alcantarillado y saneamiento, pues se estima que el 88% de los casos de diarrea se ocasionan por agua contaminada, saneamiento inadecuado y malos hábitos de higiene (UN-UNEP Habitat, 2010).

La mayoría de las bacterias aparentemente no son patógenas para individuos “sanos”, razón por la que son ignoradas; sin embargo, en individuos susceptibles inmunológicamente débiles, producen enfermedades. Hay tendencia de preocupación por agentes que causan enfermedades gastrointestinales, dejando de lado los agentes transmitidos por el agua que causan infecciones en heridas: en los ojos, oídos, nariz, garganta u otras infecciones generalizadas en el cuerpo (Reasoner, 1998).

#### *Calidad fisicoquímica del agua potable.*

Algunas especies biológicas, físicas y químicas pueden afectar la aceptabilidad del agua para consumo humano. Por ejemplo:

- a) Apariencia estética: turbiedad, olor, color y sabor (OPS, 2004).
- b) Composición química: metales pesados, cianuro, cloro residual, dureza, fluoruros, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, plaguicidas, pH, SDT, trihalometanos (NOM-127-SSA1-1994).

#### *Calidad microbiológica del agua potable*

El agua no debe contener patógenos que puedan afectar la salud del consumidor. Los patógenos transmitidos por el agua incluyen muchos tipos de microorganismos tales como: bacterias, virus, protozoos y, en ocasiones, helmintos (lombrices), todos ellos muy diferentes en tamaño, estructura y composición. Los indicadores de contaminación fecal (coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*) no deben estar presentes. La calidad del agua debe mantenerse desde que sale de la planta de tratamiento hasta llegar al consumidor (OPS, 2004, Mondaca y Campos, 2014).

En la Tabla 1 se incluyen patógenos (bacterias, virus, protozoos, helmintos) de importancia para la salud debido a la persistencia de éstos en los sistemas de abastecimiento de agua.

**Tabla 1** Agentes patógenos transmitidos por el agua (OMS, 2006)

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua <sup>a</sup>	Resistencia al cloro <sup>b</sup>	Infectividad relativa <sup>c</sup>	Fuente animal importante
<b>Bacterias</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Baja	Puede proliferar	Baja	Baja	No
<i>Camylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Alta	Moderada	Baja	Moderada	Sí
<i>Escherichia coli</i> patógena <sup>d</sup>	Alta	Moderada	Baja	Baja	Sí
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Alta	Moderada	Baja	Alta	Sí
<i>Legionella</i> spp.	Alta	Prolifera	Baja	Moderada	No
Micobacterias no tuberculosas	Baja	Prolifera	Alta	Baja	No
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	Moderada	Puede proliferar	Moderada	Baja	No
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baja	Baja	No
Otras salmonelas	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja	Sí
<i>Shigella</i> spp.	Alta	Corta	Baja	Moderada	No
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	Baja	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Larga	Baja	Baja	Sí
<b>Virus</b>					
Adenovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Enterovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis A	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis E	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencialmente
Norovirus y sapovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencialmente
Rotavirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
<b>Protozoos</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Sí
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Sí
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar <sup>f</sup>	Alta	Alta	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Sí
<b>Helmintos</b>					
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Moderada	Alta	No
<i>Schistosoma</i> spp.	Alta	Corta	Moderada	Alta	Sí

**Nota:** La transmisión por el agua de los agentes patógenos incluidos en el cuadro ha sido confirmada mediante estudios epidemiológicos e historias clínicas. La comprobación de la patogenicidad se basa, en parte, en la reproducción de la enfermedad en hospedadores adecuados. El valor de la información de estudios

experimentales en los que se expone a voluntarios a concentraciones conocidas de agentes patógenos es relativo; como la mayoría de los estudios se realizan con voluntarios adultos sanos, la información obtenida sólo es aplicable a una parte de la población expuesta y la extrapolación a grupos más vulnerables debe estudiarse más a fondo.

<sup>a</sup> Periodo de detección del estado infeccioso en agua a 20°C: persistencia corta: hasta 1 semana; moderada: de 1 semana a 1 mes; larga: más de 1 mes.

<sup>b</sup> Estando el estado infeccioso en suspensión libre en agua tratada con dosis y tiempos de contacto convencionales. La resistencia es «moderada» si es posible que el agente no sea destruido completamente.

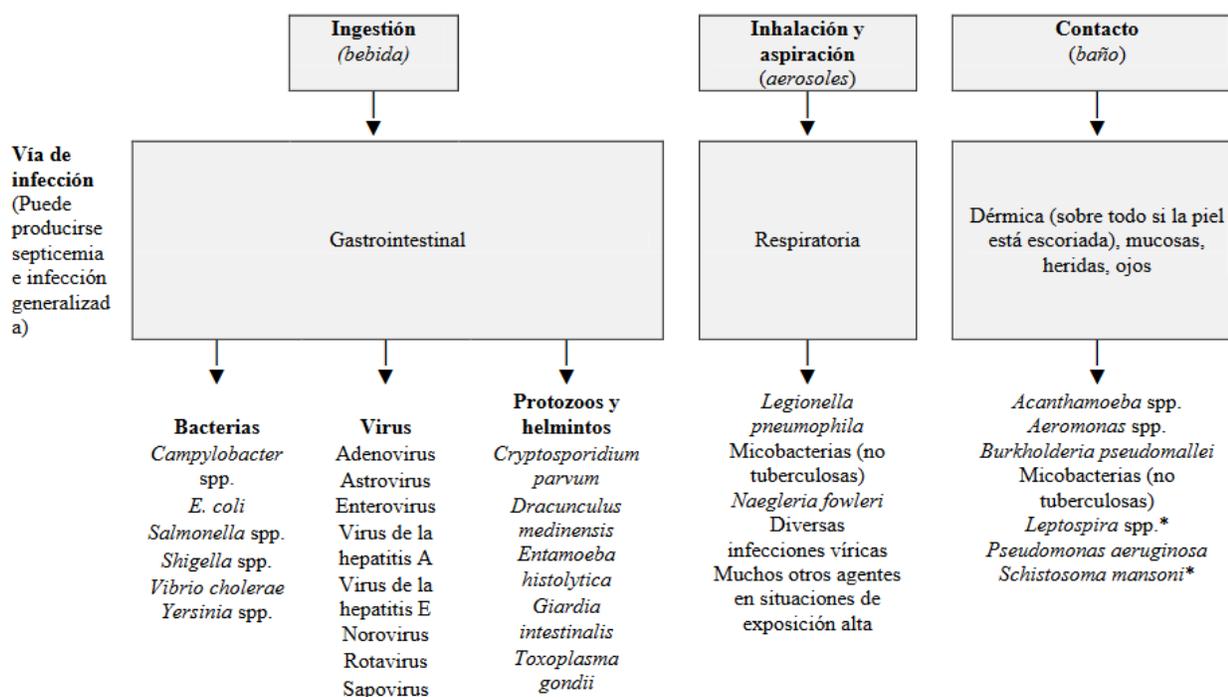
<sup>c</sup> Determinada en experimentos con voluntarios o basándose en información epidemiológica.

<sup>d</sup> Incluye los tipos enteropatógenos, enterotoxígenos y enteroinvasivos.

<sup>e</sup> La vía de infección principal es por contacto con la piel, pero puede infectar a enfermos de cáncer o personas inmunodeficientes por vía oral.

<sup>f</sup> En agua templada

Al respecto, la Figura 1, ilustra las vías de transmisión de microorganismos con los que los seres vivos (humanos y animales) están en contacto (ingesta, inhalación y contacto dérmico). Observándose que en cualquier momento puede haber infección por algún microorganismo que esté presente en el agua, siendo ésta un vehículo de transmisión de diferentes enfermedades.



\* Principalmente por contacto con aguas superficiales muy contaminadas.

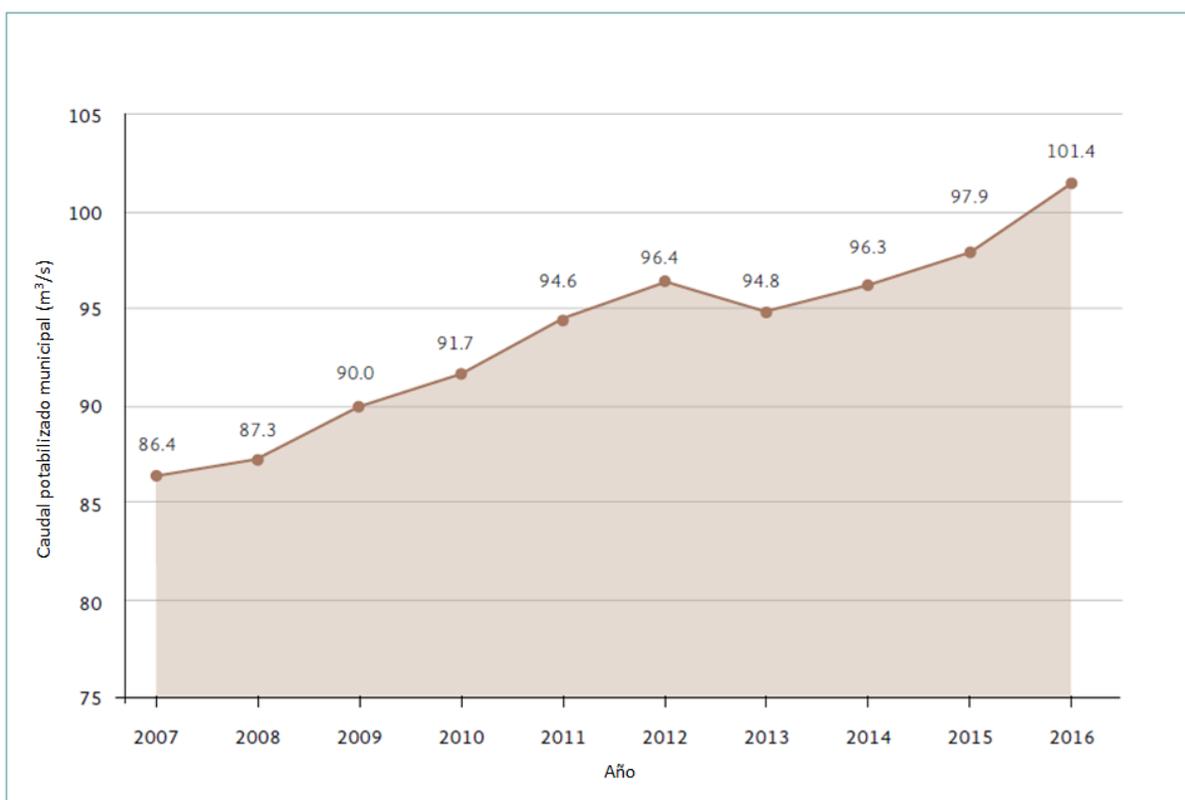
**Figura 1** Vías de transmisión y ejemplos de agentes patógenos relacionados con el agua (OMS, 2006)

En este contexto, es imperante la necesidad de que una población cuente con agua potable segura libre de patógenos para evitar la incidencia de enfermedades provocadas por la presencia de bacterias que no deberían estar presentes en un recurso básico como el agua.

### *Agua potable en México*

#### Plantas potabilizadoras

Las plantas potabilizadoras municipales acondicionan la calidad del agua de las fuentes superficiales y/o subterráneas para adecuarlas al consumo humano. En 2016 se potabilizaron 101.4 m<sup>3</sup>/s en las 908 plantas en operación del país. En la Gráfica 1 se observa la evolución en la potabilización del caudal a nivel municipal desde el año 2005 hasta el 2016.



**Gráfica 1** Caudal potabilizado municipal (CONAGUA, 2017)

## 2.2 *Vibrio*

El género *Vibrio* es un microorganismo Gram negativo, varilla corta (0.5 x 1.3 – 3 µm), no esporulado, no encapsulado, anaerobio facultativo, catalasa positiva, móvil por medio de flagelo polar. La mayoría de las especies son oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. Todas las especies de *Vibrio* son quimiorganótrofos, siendo capaces de crecer en medios minerales que contengan D-glucosa como fuente de carbono y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno. Pocas cepas requieren Na<sup>+</sup>, el cual estimula su crecimiento. Muchas cepas fermentan y utilizan la D-fructosa, maltosa y glicerol. *Vibrio* es capaz de crecer en un amplio rango de temperatura de 20 a 40°C, crecen en condiciones alcalinas, en rangos de pH de 6 a 9 (Garrity, *et. al*, 2005; Percival *et. al.*, 2004).

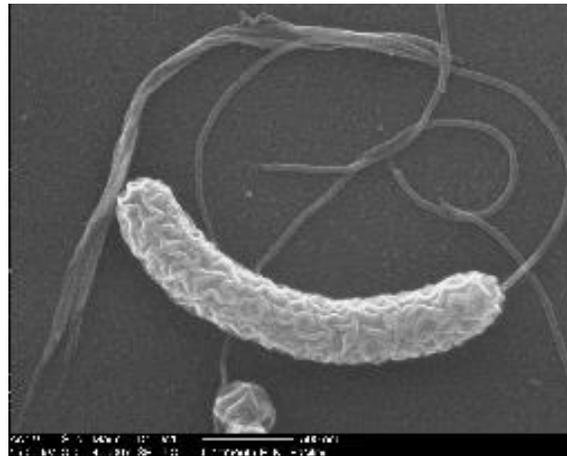
Para conocer más a fondo las características del género *Vibrio*, se recurre a la taxonomía la cual clasifica de manera jerarquizada los organismos (macro y micro). La clasificación del género *Vibrio* se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2** Taxonomía del género *Vibrio* de acuerdo con el manual de Bergey's

<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Phyllum</b>	BXII Proteobacteria
<b>Clase</b>	III Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	XI Vibronales
<b>Familia</b>	I Vibrionaceae
<b>Género</b>	<i>Vibrio</i>

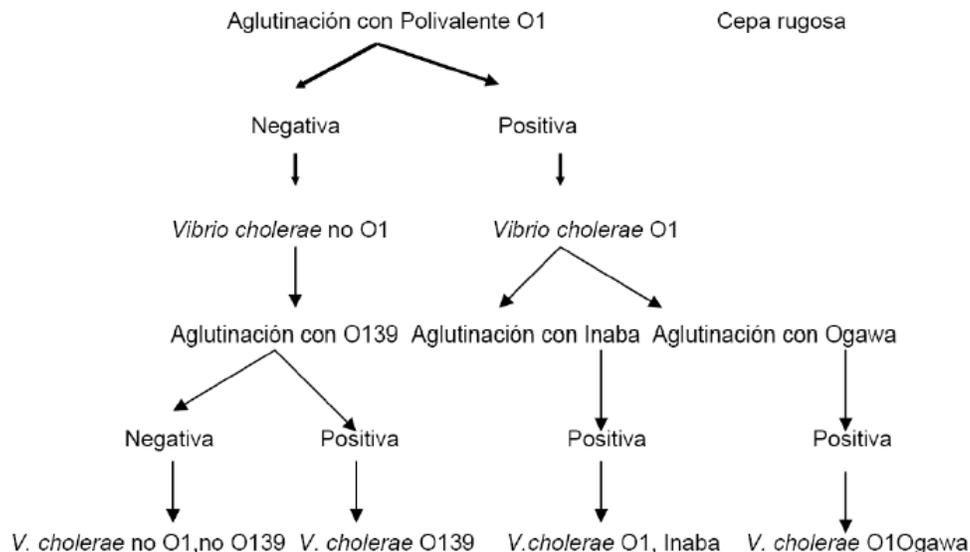
### 2.2.1 *Vibrio cholerae*

La especie *cholerae* es la más significativa del género *Vibrio*, fue descubierta en 1854 por Filippo Pacini, tiene dimensiones de 0.5 – 0.8 µm por 1.5 – 2.5 µm, es Gram negativo, curvado, flagelado. Es anaerobio facultativo, sensible a pH ácido. Los medios más usados para su aislamiento son gelatina telurito taurocolato (TTG) o agar de Monsur y el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS). Es destruido por altas temperaturas, es sensible a la desecación y puede ser viable durante cuatro a siete días (Flores, 1990). La dosis infectiva reportada es de al menos 10<sup>6</sup> unidades celulares, en condiciones normales (Percival *et. al.*, 2004; Duncan y Nigel, 2003). En la Figura 2 se observa físicamente la morfología que presenta la bacteria *V. cholerae*, descrita anteriormente.



**Figura 2** *Vibrio cholerae*  
(Fuente: [http://remf.dartmouth.edu/Cholera\\_SEM/](http://remf.dartmouth.edu/Cholera_SEM/))

*V. cholerae* se clasifica en serogrupos en función del antígeno O del lipopolisacárido (LPS). Hay cerca de 200 serogrupos, solamente dos de ellos (O1 y O139) se reconocen como los responsables del cólera. A su vez el serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos, clásico y El Tor, y en cada uno se distinguen tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima. El resto de los serotipos se les denomina como no-O1/no-O139 (Farfán 2002). La Figura 3 ilustra los serotipos asociados a la bacteria.



**Figura 3** Clasificación serológica de *V. cholerae*  
(Ulloa Flores, disponible en

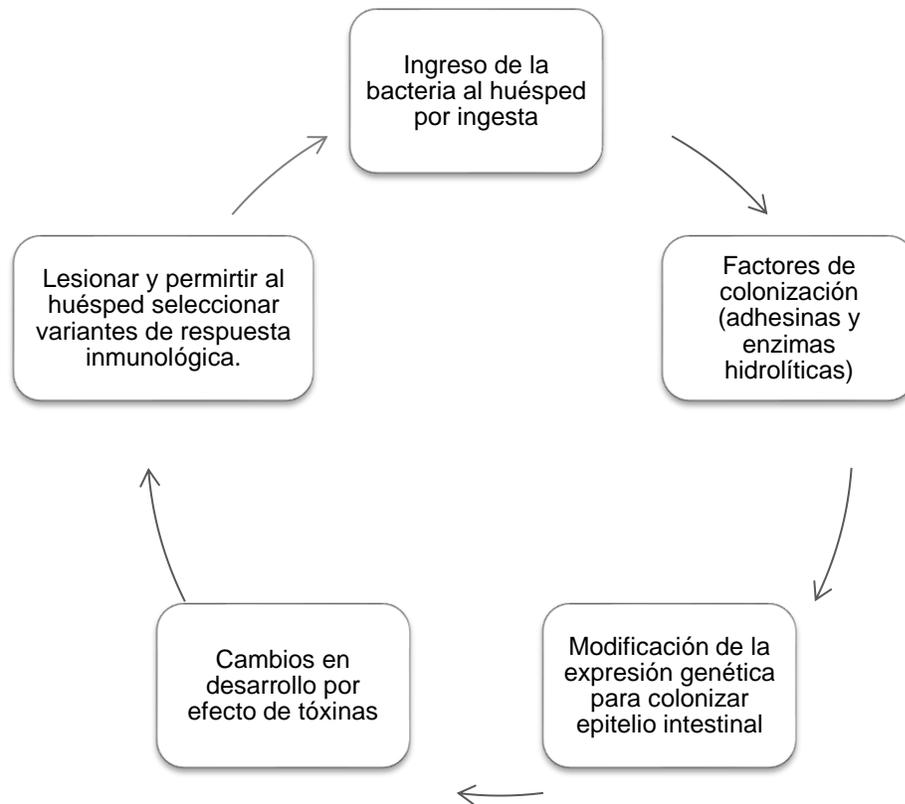
<http://www.ispch.cl/sites/default/files/Caracterizacion%20bioquimica%20y%20molecular%20de%20Vibrio%20cholerae.pdf>)

Se ha reportado la presencia de *V. cholerae* en estado viable no cultivable (VNC) en ambientes acuáticos. Durante mucho tiempo se había supuesto que una célula bacteriana estaba muerta cuando ya no podía crecer en los medios de cultivo de rutina. Ahora se sabe que esta suposición es simplista y que hay muchas situaciones en las que una célula pierde capacidad de cultivo, pero sigue siendo viable y potencialmente puede volver a crecer (Oliver, 2005), es decir se encuentra en un estado VNC. Por lo tanto, una pérdida en la capacidad de cultivo no es precisamente equivalente a la muerte celular. Es así que organismos potencialmente patógenos pueden sobrevivir en el agua respondiendo a diferentes condiciones adversas mediante cambios morfológicos y fisiológicos. Se ha podido evidenciar que células de bacterias altamente infecciosas están vivas, pero no se pueden cultivar, las cuales presentan actividad celular, como actividad respiratoria o enzimática, indicaciones de un estado energético positivo, capacidad infectiva, transcripción genética, síntesis de proteínas y producción de biomasa (Sardesai, 2005; Oliver 2010). En estado VNC la bacteria se adhiere a la superficie del fitoplancton, zooplancton, raíces macrófitas dulceacuícolas, intestino de peces, quitina, y en la superficie de sedimentos de materia orgánica e inorgánica (Fernández y Alonso, 2009; Mirande *et. al.*, 2007), propiciando su permanencia en el medio.

### **Ciclo de vida de *V. cholerae***

Forma parte de la microbiota de ecosistemas acuáticos, tanto en aguas dulces y saladas. Se puede adherir a la quitina de los caparazones de los crustáceos, coloniza la superficie de algas, fitoplancton, copépodos, y raíces de plantas acuáticas (Farfán, 2002).

En la Figura 4 se ilustra el ciclo de vida de *V. cholerae*, en el cual las enzimas hidrolíticas de *V. cholerae* (DNAsas, proteasas, quinasa y neuroaminidasas) favorecen la colonización, las DNAsas actúan sobre el epitelio intestinal. Las proteasas son múltiples, destacándose la hemaglutinina, facilita la debilitación del moco que se produce en la superficie intestinal. La toxina colérica tiene como receptor el gangliócido GM1, el cual no es abundante en la membrana epitelial, ya que la acción de esta enzima rompe los polisialogangliósidos en residuos de ácido siálico, que producen un incremento de los receptores de la toxina colérica (Robles *et. al.*, 1999).



**Figura 4** Ciclo de vida de *V. cholerae*

### 2.2.2 Cuadro clínico

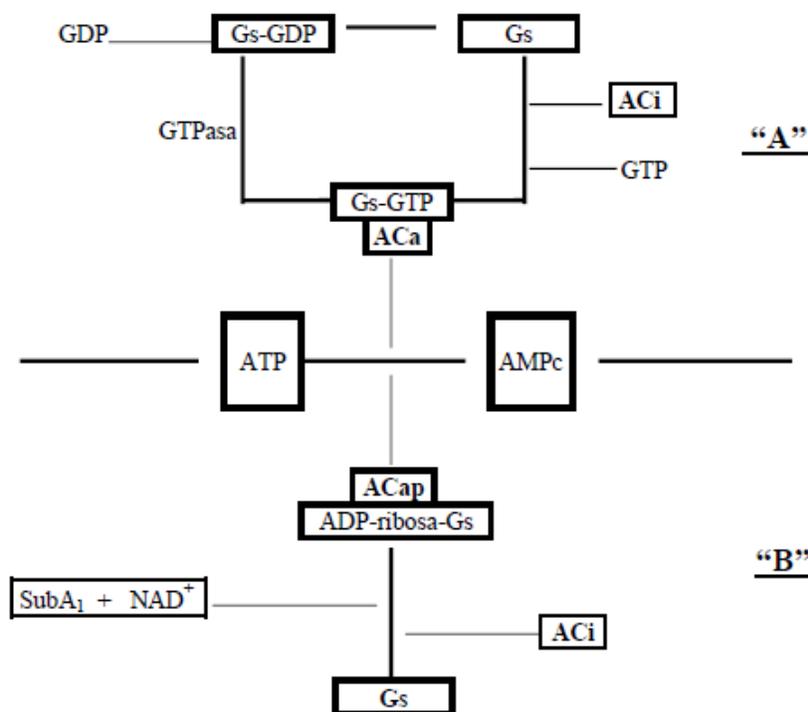
El período de incubación puede ser entre 24 horas y cinco días. La bacteria atraviesa la barrera de la acidez gástrica, se elabora la toxina perdiéndose rápidamente líquidos y electrolitos con la diarrea intensa que resulta de la infección. Hay vómitos y diarrea, en casos extremos la pérdida de líquido es aproximada de 15 a 20 litros por día (primera etapa de la enfermedad). Las heces son descritas como “agua de arroz”, no tiene olor, consisten en plasma sanguíneo menos proteína, estrías de moco, células epiteliales descamadas y un gran número de bacterias vibriones ( $10^8$  vibriones / g heces fecales). En un 75% de los pacientes se presentan calambres musculares (localizados en dedos de manos y pies, extremidades inferiores). Con la pérdida de agua sobreviene un choque hipovolémico y acidosis metabólica (Flores, 1990).

En un examen físico las características observadas son ojos y mejillas hundidas, turgencia cutánea. La segunda etapa de la enfermedad se caracteriza por tener

insuficiencia circulatoria, temperatura subnormal y anuria, los labios son cianóticos, piel fría y húmeda, temperatura corporal inferior a la normal, respiración rápida, taquicardia e hipotensión, abdomen escafoide. Los niños presentan fiebre, convulsiones generalizadas y edema pulmonar (Robles *et. al.*, 1999).

### 2.2.3 Toxina colérica

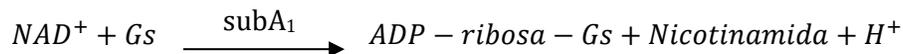
Cuando *V. cholerae* llega al intestino delgado, se adhiere a las células epiteliales en donde se reproduce liberando la toxina colérica. La toxina es una proteína termolábil de 84 kDa compuesta de dos unidades: A y B, siendo la B la que se une a ciertos receptores presentes en las células intestinales ( $G_{M1}$ , ganglósidos superficiales). La primera penetra al citoplasma en donde su subunidad  $A_2$  (sub $A_2$ ) se separa de la  $A_1$  (sub $A_1$ ). Hay una previa reducción de los enlaces disulfuro, posteriormente hay una actividad enzimática que consiste en ADP-ribosilar a la proteína reguladora Gs, la cual provoca la desactivación permanente del adenilato ciclasa de la célula hospedadora (Garza-Velasco *et. al.*, 1998), este mecanismo de acción se ilustra en la Figura 5.



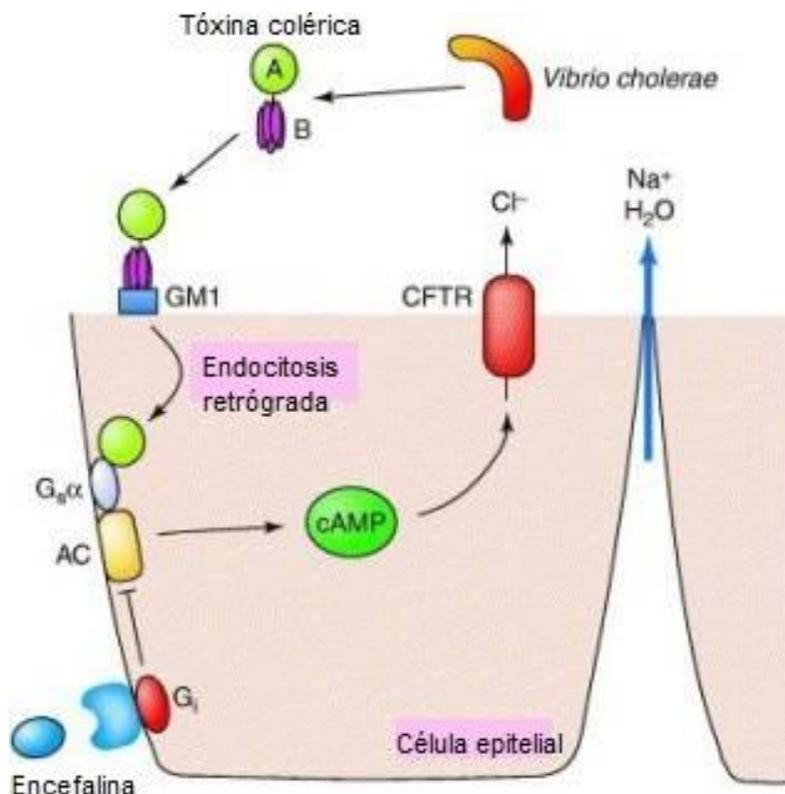
**Figura 5** Mecanismo de la toxina colérica (Garza-Velasco *et. al.*, 1998)

GDP: Guanosindifosfato; GTP: Guanosintrifosfato; ACi: Adenilato ciclasa inactiva; ACa: Adenilato ciclasa activa; ATP: Adenosintrifosfato; AMPc: Adenosinmonofosfato cíclico; ACap: Adenilato ciclasa activada permanentemente; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida-adenosin-dinucleótido.

La reacción catalizada por la subunidad A1 de la toxina colérica es:



La acción de la toxina colérica se observa gráficamente en la Figura 6.



**Figura 6** Acción de la toxina colérica

Fuente: [https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2005\\_9/Page2.htm](https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2005_9/Page2.htm)

A, B (subunidades de la toxina colérica); GM1 (GM1 receptor gangliósido); Gsa (proteína G); AC (adenilato ciclasa); Gi (proteína G); cAMP (AMP-cíclico); CFTR (fibrosis quística regulador de la conductancia transmembrana).

### 2.2.4 Riesgo biológico

*V. cholerae* es un patógeno clasificado en el nivel 2 de contención (Alonso y Constans, 2001), para su manejo en el laboratorio sólo se utiliza equipo de protección personal y recomendaciones básicas de seguridad.

## 2.3 Cólera

El cólera es una enfermedad diarreica aguda que, si no se trata, puede causar la muerte en cuestión de horas. Los investigadores calculan que cada año hay en el mundo entre 1,3 y 4 millones de casos de cólera, y entre 21 000 y 143 000 defunciones por esta causa (OMS, 2017). Lo que ha dado lugar a varias epidemias en el mundo y en México.

### 2.3.1 Cólera en el mundo

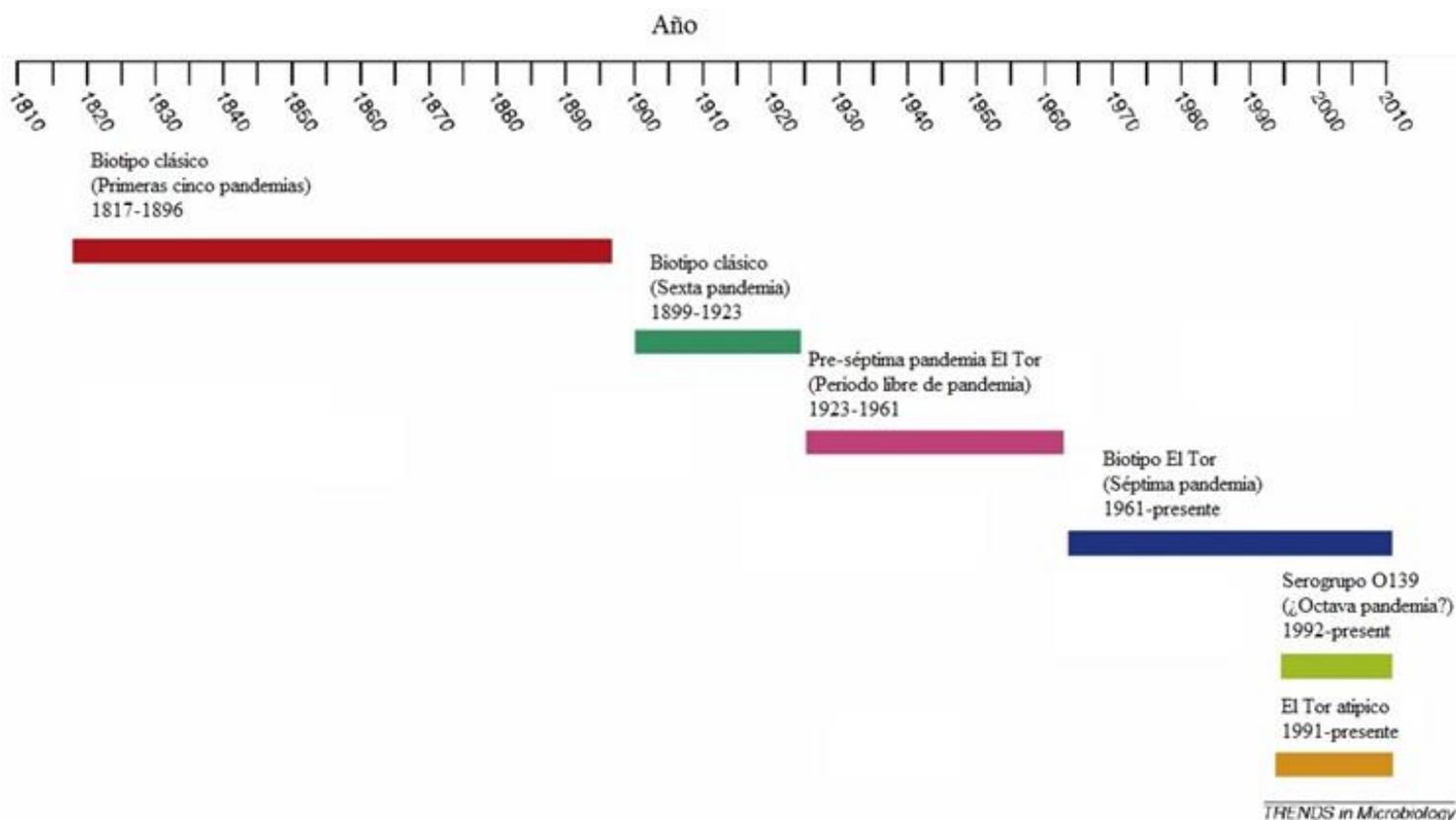
A lo largo del siglo XIX, el cólera se propagó por el mundo desde su reservorio original en el delta del Ganges, en la India. Seis pandemias en sucesión mataron a millones de personas en todos los continentes. La actual pandemia (la séptima) comenzó en el sur de Asia en 1961 y llegó a África en 1971 y a América en 1991. En la actualidad, el cólera es endémico en muchos países (OMS, 2017). Se pueden producir brotes en cualquier parte del mundo donde el abastecimiento de agua, el saneamiento, la inocuidad de los alimentos o la higiene sean inadecuados.

#### Línea temporal de las pandemias de cólera

- En el año de 1817 aconteció la primera pandemia documentada en Asia, la cual se extendió a Turquía y países árabes. Duró 6 años causando gran mortalidad en la India. La enfermedad se extendió a todos los continentes.
- La segunda pandemia inició en la India, afectando Asia, Europa, África y en 1832 afectó América del Norte, Central (Cuba, México, Guatemala, Nicaragua, Panamá, Jamaica) y América del Sur (Guyana, Brasil y Uruguay).
- La tercera pandemia, 1852 a 1859, afectó Asia, África, Europa y América
  - En Asia, el cólera llegó a Indonesia en 1852; China y Japón en 1854.
  - De 1854 a 1862 apareció en África del este, Zanzíbar, Mozambique, Madagascar, Islas Comores y Uganda. En 1853, 1855 y 1858 apareció en Etiopía.
  - Europa se liberó la enfermedad en 1859.
- La cuarta pandemia, 1863 a 1879, afectó Asia, Europa y América.
  - En el periodo de 1865 a 1870 el cólera fue una epidemia en varias islas del oeste.

- En 1868 una importación de Nueva Orleans llevó el cólera a Nicaragua y Honduras Británicas.
- En el mismo período, la enfermedad se presentó en tropas paraguayas en guerras contra Argentina y Brasil, Uruguay también se vio afectado.
- Desde Argentina llegó el cólera a Bolivia y Perú.
- La quinta pandemia, 1881 a 1896, se extendió por Europa, Asia, África y América. Esta pandemia causó menos daños que las anteriores. Inició en la India, se diseminó a La Meca, llegó a Arabia (1881 y 1882), debido a rutas de peregrinaje llegó a Egipto. En Europa solo hubo casos en Francia, Italia y España.
- La sexta pandemia, 1899 a 1923, comenzó en la India extendiéndose por África, Asia menor y Europa.
- La séptima etapa inició en 1861 en Indonesia, presentó una primera etapa (1961-1966). Hubo afectaciones en Asia, África, Europa y América Latina. Los únicos países de Latinoamérica que no se vieron afectados hasta diciembre de 1995, fueron países isleños del caribe, Uruguay y Paraguay.
- En el año de 1991 la epidemia llegó a Latinoamérica, siendo Perú el primer país donde se registró el primer caso.
- La octava pandemia se inició en 1992 en Madrás y Bangladesh, se extendió por la India, ocurriendo pandemias en China, Tailandia y Malasia (González *et. al.*, 2011).

Las primeras cinco pandemias fueron causadas por el biotipo clásico, mientras parece ser que la cepa clásica causó la sexta pandemia. Entre la sexta y séptima pandemia, hubo un periodo de 38 años en el cual el cólera solo ocurrió por la cepa El Tor (Ulloa Flores, sin año, disponible en línea). La Figura 7, muestra en una línea temporal la presencia de las epidemias del cólera y los biotipos o serotipos que causaron la enfermedad.



**Figura 7** Eventos evolutivos clave en la epidemiología del cólera desde 1817.  
(Ulloa Flores, sin año, disponible en línea)

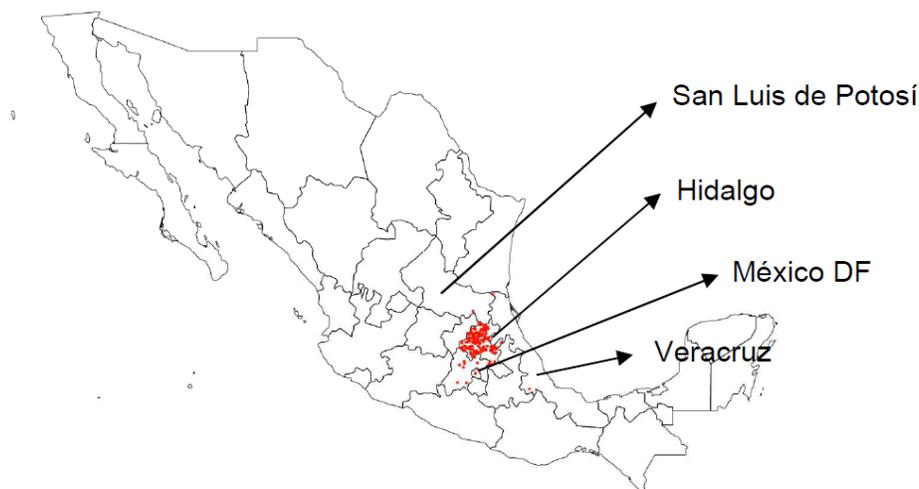
### 2.3.2 Cólera en México

En octubre de 2010, la OPS informó la ocurrencia de un brote de cólera en Haití, la cepa identificada fue el *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa, diferente a la identificada durante los brotes de Cólera de los años 90. El padecimiento se dispersó a otros países, como República Dominicana (32 064 casos y 472 defunciones), Cuba (739 casos y 3 defunciones) y México cuyos primeros casos de cólera por esta cepa se presentaron en 2013.

En el período de 1991 a 2001 se notificó la ocurrencia de 45 062 casos y 505 defunciones, siendo 1998 el año con el mayor número de casos (16 430). Las cepas identificadas correspondieron a *V. cholerae* O1 Inaba Toxigénico y *V. cholerae* O1 Ogawa Toxigénico.

De 2002 a 2009 no se reportó ningún caso, hasta 2010 se reportó un caso en Navolato, Sinaloa. Al año siguiente se detectó un caso en Badiraguato, Sinaloa, en 2012 hubo dos casos más en Culiacán y Escuinapa, Sinaloa. Las cepas aisladas correspondieron a *V. cholerae* O1 Inaba toxigénico y *V. cholerae* O1 Ogawa Toxigénico (CONAVE, 2016).

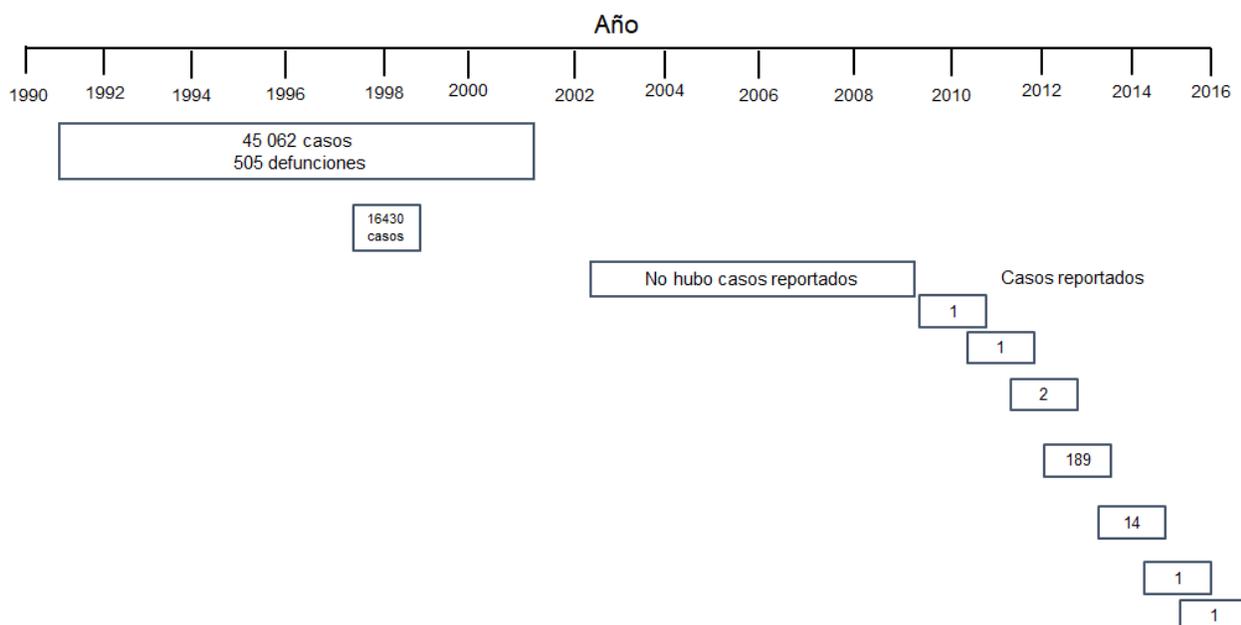
En la Figura 8 se indican los estados de la República Mexicana que en el año 2013 hubo reporte de casos de cólera. Se reportaron dos casos en la Ciudad de México, durante este año se identificaron 187 casos en otras entidades federativas, Hidalgo, Estado de México, Veracruz, San Luis Potosí (CONAVE, 2016; Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2013).



**Figura 8** Estados de México afectados por el brote de cólera, año 2013  
Tomado de Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2013

En 2014 se identificaron 14 casos, 13 en Hidalgo y uno en Querétaro, en 2015 se notificó un caso en Puebla y en 2016 se reportó un caso en Nayarit (CONAVE, 2016).

En la Figura 9, con la información de los reportes de casos de cólera en el país se construyó en el presente documento una línea del tiempo para ubicar adecuadamente las ocurrencias de la enfermedad en México.



**Figura 9** Cólera en México (elaboración propia)

Aún no se define con certeza, si los nuevos brotes de cólera tanto en México como en el mundo están asociados a la posible presencia de la bacteria *V. cholerae* en su forma VNC presente en las fuentes de agua. Sin embargo, podría ser una potencial causa del resurgimiento de casos debido a los fundamentos que se presentan a continuación.

## 2.4 Bacterias viables no cultivables (VNC)

Las bacterias VNC presentan un estado celular adaptativo de supervivencia bajo condiciones ambientales desfavorables tales como, fluctuaciones en la temperatura, cambios de pH, salinidad, estrés oxigénico, exposición a metales pesados y antibióticos. Tratamientos de desinfección como la cloración de agua o la pasteurización pueden inducir el estado VNC en determinadas subpoblaciones (Tamagnini y Paraje, 2015).

Durante la inducción a VNC, la bacteria cambia morfológicamente exhibiendo enanismo, cambios en la estructura de la membrana, composición de proteínas, contenido ribosómico y el orden o disposición del ADN. Hay cambios metabólicos, se modifica la expresión de sus

genes y el potencial de virulencia, hay reducciones en el transporte de nutrientes, la respiración, y síntesis macromolecular, los niveles de ATP disminuyen (Oliver, 2000; Oliver, 2005; Tamagnini y Paraje, 2015).

Las bacterias en este estado metabólico tienen importancia en la seguridad alimenticia y pública, ya que muchas especies sobreviven y persisten en alimentos procesados, leche pasteurizada, agua potable y en el ambiente. Algunos métodos de detección de VNC son los marcadores fluorescentes como coloración naranja de acridina y recuento de viables con anticuerpos fluorescentes (DFA-DVC), medición de ADN, ARN y ARNm, biosensores, bacteriófagos (Tamagnini y Paraje, 2015).

El número de especies que presentan el estado VNC constantemente incrementa, teniendo 60 patógenos reportados (Oliver, 2005), los cuales son enlistados en la Tabla 3.

**Tabla 3** Bacterias reportadas que presentan el estado VNC (Oliver, 2005)

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

Como se ha mencionado, el estado VNC de diferentes bacterias que pueden ser transmitidas por el agua, es un mecanismo de resistencia que la bacteria asume al verse ante condiciones ambientales adversas (Oliver, 2010).

## 2.5. Desinfección de agua

Aunque la desinfección da lugar a la reducción del número de microorganismos vivos, generalmente no elimina las esporas bacterianas. Un desinfectante eficaz reduce el número de microorganismos a un nivel que no perjudica la salud. Ningún procedimiento de desinfección puede dar resultados plenamente satisfactorios, a menos que a su aplicación le preceda una limpieza completa. Para la elección de un desinfectante se debe considerar el tipo de microorganismo a eliminar, tipo de producto que se elabora, tipo de material de contacto, tipo de agua y método de limpieza que se emplea. Deben usarse desinfectantes químicos cuando no sea viable la aplicación de calor (Flores *et. al.*, 1999).

### Factores que influyen en la desinfección

Para que el proceso de desinfección tenga una alta eficiencia de inactivación o reducción de patógenos, es necesario tomar en cuenta factores que pueden afectar la desinfección, la importancia de estos factores se describe en la Tabla 4.

**Tabla 4** Factores que influyen en la desinfección

<b>Factor</b>	<b>Importancia</b>	<b>Referencias</b>
Tiempo de contacto (t)	Para una concentración dada de desinfectante la mortalidad de los patógenos aumenta cuanto mayor sea el tiempo de contacto (ley de Chick)	Metcalfe y Eddy, 1996
Concentración y tipo de desinfectante	Según el tipo de agente químico y dentro de ciertos límites se ha podido comprobar que la efectividad está relacionada con la concentración	Metcalfe y Eddy, 1996
Temperatura	El aumento de la temperatura produce un aumento de la velocidad de las reacciones y la desinfección <sup>1</sup> Para muchos agentes desinfectantes, la subida de 10 grados supone duplicar la tasa de muerte <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Metcalfe y Eddy, 1996 <sup>2</sup> Flores <i>et. al.</i> , 1999
Número de microorganismos	En un sistema diluido como el agua residual, la concentración de los microorganismos es muy raramente objeto de especial consideración. Cuanto mayor sea la concentración de organismos mayor será el tiempo necesario para alcanzar una mortalidad determinada.	Metcalfe y Eddy, 1996
Tipo de	Las células bacterianas de crecimiento viable se destruyen	Metcalfe y Eddy, 1996

Factor	Importancia	Referencias
microorganismos	fácilmente. En cambio, las esporas bacterianas son extremadamente resistentes y muchos de los desinfectantes químicos normalmente empleados tienen escaso o ningún efecto. <sup>1</sup>	
Naturaleza del líquido	Puede haber presencia de materia orgánica extraña que reduzca la eficacia de los desinfectantes oxidantes La turbidez reduce la efectividad de los desinfectantes debido a la adsorción y a la protección de las bacterias atrapadas.	Metcalf y Eddy, 1996
pH	Este parámetro debe ser continuamente medido cuando utilizamos desinfectantes que afectan, y que también los afectan los valores del pH en el agua, como los hipocloritos y en mucha menor medida dióxido de cloro.	Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California.

### 2.5.1 Agentes químicos

Los agentes químicos usados para desinfección incluyen: cloro y sus compuestos, bromo, yodo, ozono, fenol y compuestos fenólicos, alcoholes, metales pesados y compuestos afines, colorantes, jabones, compuestos amoniacales cuaternarios, agua oxigenada, ácidos y álcalis diversos (Metcalf y Eddy, 1996).

#### 2.5.1.1 Cloro

El cloro se usó por primera vez en Londres en el año 1851, su uso en agua como método de desinfección ocurrió en Chicago en 1908. Se aplica en potabilización, incluye funciones adicionales a la desinfección como el control del sabor y olor, previene el crecimiento de algas en la infraestructura hidráulica, el mantenimiento de filtros, la remoción de hierro y manganeso, la destrucción del ácido sulfhídrico, la remoción de color por ciertos colorantes orgánicos y el mantenimiento de sistemas de distribución de agua (para controlar el limo) (CONAGUA, 2007).

#### Características

En condiciones ambientales de presión y temperatura (Cloro gas)

- Gas amarillo verdoso.
- Olor irritante característico.
- Puede licuarse fácilmente mediante compresión.
- Es no inflamable, aunque en su forma gaseosa mantiene la combustión de algunos materiales.

- Se produce en forma gaseosa por electrólisis de una solución de cloruro de sodio.
- Reacciona fácilmente con sustancias explosivas, por lo cual no debe almacenarse cerca de zonas habitadas o lugares de trabajo.
- El cloro se combina con diferentes compuestos rápidamente incluyendo los nitrogenados
- Solubilidad en agua: 10 000 mg/L, 1% de concentración (1 atm y 20°C)
- Peso molecular: 35.357 uma
- Punto de fusión: -101.4 °C
- Punto de ebullición: -34.5 °C
- Densidad relativa al aire: 2.5
- En presencia de humedad, el cloro -ya sea líquido o gaseoso- es sumamente corrosivo pues reacciona con el agua para formar ácidos hipocloroso y clorhídrico (CONAGUA, 2007).

En la Tabla 5 se definen términos comúnmente usados en la cloración, los cuales se aplican ampliamente en procesos de desinfección con cloro como desinfectante.

**Tabla 5** Vocabulario de cloración (CONAGUA, 2007)

<b>Término</b>	<b>Definición</b>
Cloro activo	Suma del cloro elemental y de todas las combinaciones oxidantes en un momento determinado. Es decir, se trata del cloro activo libre (cloro, ácido hipocloroso, ion hipoclorito y óxido de cloro) y del cloro activo combinado (cloro de acción oxidante combinado con amoníaco o aminas).
Cloro residual combinado	Cloro que permanece después de la reacción asociado con derivados de amoníaco y de materia orgánica
Cloro libre residual	Cloro que permanece después de la reacción sin formar cloro combinado. Es la suma del HOCl y del OCl <sup>-</sup> No se presenta en la cloración del agua residual.
Cloro residual total	Suma del cloro residual, el combinado y libre
Cloración simple	Adición de cloro con fines de desinfección. Puede efectuarse en las fuentes de abastecimiento, tanques de almacenamiento y/o regulación, las líneas de conducción y diferentes sitios de las redes de distribución.
Cloro Suficiente	Cantidad de cloro requerida para producir el residual deseado, ya sea combinado, libre o total, después de un tiempo de contacto definido.
Demanda de cloro	Cantidad de cloro consumida por las sustancias reductoras, la materia orgánica y los microorganismos patógenos.
Decloración	Eliminación total o parcial del cloro residual contenido en el agua. Se realiza posterior a una sobrecloración con el fin de mantener el cloro residual a un nivel deseado, o bien, eliminarlo todo el residual antes de descargar el agua a un cuerpo acuático sensible.
Poscloración	Aplicación de cloro al final del tratamiento. Es un procedimiento normal en potabilizadoras y depuradoras.

Término	Definición
Precloración	Aplicación de cloro antes de cualquier otro tratamiento, por ejemplo, en el caso de procesos de clarificación se aplica cloro a las aguas crudas para mejorar la coagulación, reducir o eliminar olores y sabores indeseables y detener el crecimiento de algas en la infraestructura.
Sobrecloración	Aplicación de cloro en cantidad superior a la requerida para desinfectar con objeto de obtener un residual.
Tiempo de contacto	Tiempo que debe transcurrir entre la dosificación del cloro y la eliminación de las bacterias patógenas. Varía en función de la calidad del agua y la dosis aplicada.

### Química del cloro

Los compuestos de cloro más comúnmente empleados en las plantas de tratamiento de aguas residuales son el cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ), hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ), hipoclorito de calcio [ $\text{Ca}(\text{OCl}_2)$ ] y dióxido de cloro (Metcalf y Eddy, 1996). En la Tabla 6 se agrupan las características de cada compuesto clorado de uso común en plantas de tratamiento de agua.

**Tabla 6** Características de algunos compuestos de cloro usados en cloración de agua (Solsona, 2002)

Nombre y fórmula	Nombre comercial o común	Características	% Cloro activo	Estabilidad en el tiempo	Seguridad	Envase usual
Cloro gas $\text{Cl}_2$	Cloro licuado Cloro gaseoso	Cloro licuado Cloro gaseoso	99.5%	Muy buena.	Gas altamente tóxico	Cilindros de 40 a 70 kg. Recipientes de 1 a 5 toneladas
Cal clorada $\text{CaO} \cdot 2\text{CaCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Cal clorada, Polvo blanqueador, hipoclorito de cal, cloruro de cal	Polvo blanco seco	15 a 35%	Media. Se deteriora rápidamente cuando se expone a temperatura alta, humedad y/o luz solar. Pérdida de 1% al mes.	Corrosivo	Latas de 1.5 kg Tambores de 45 - 135 kg Bolsas plásticas o de papel de 25 - 40 kg, otros.
Hipoclorito de sodio $\text{NaClO}$	Hipoclorito de sodio, blanqueador líquido, lejía, agua lavandina, agua sanitaria	Solución líquida amarillenta	1 a 15% como máximo. Concentraciones mayores a 10% son inestables.	Baja. Pérdida de 2 - 4% por mes; mayor si la temperatura excede los 30°C	Corrosivo	Diversos tamaños de botellas de plástico y vidrio, y garrafones
	Hipoclorito de sodio por electrólisis <i>in situ</i>	Solución líquida amarillenta	0.1 - 0.6%	Baja	Oxidante	Cualquier volumen

Nombre y fórmula	Nombre comercial o común	Características	% Cloro activo	Estabilidad en el tiempo	Seguridad	Envase usual
Hipoclorito de calcio $Ca(ClO)_2 \cdot 4H_2O$	HTH, Perclorón	Polvo, gránulos y tabletas. Sólido blanco	Polvo: 20 – 35%  Granulado: 65 - 70%  Tabletas: 65 –70%	Buena. Pérdida de 2 a 2.5% por año	Corrosivo. Inflamación posible al entrar en contacto con ciertos materiales ácidos.	Latas de 1.5 kg, tambores 45 - 135 kg, Baldes de plástico

## Reacciones en agua

### Hidrolisis

El cloro gas se hidroliza rápidamente en agua para formar ácido hipocloroso (HOCl) (CONAGUA, 2007).



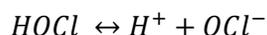
Constante de estabilidad:

$$K = \frac{[HOCl][H^+][Cl^-]}{[Cl_2]} \approx 4.5 \times 10^{-4} \text{ a } 25^\circ C$$

(Reacciones, Metcalf y Eddy, 1996)

### Ionización

El ácido hipocloroso es un ácido débil ( $pK_a = 7.5$ ), lo que significa que se disocia moderadamente, pero en cantidad suficiente para disminuir el pH del agua debido a la producción del ion hidronio (CONAGUA, 2007).



Constante de ionización:

$$K_i = \frac{[H^+][OCl^-]}{[HOCl]} = 2.9 \times 10^{-8} \text{ a } 25^\circ C$$

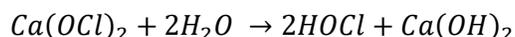
(Reacciones, Metcalf y Eddy, 1996)

La cantidad de HOCl y de  $OCl^-$  que se halla presente en el agua se denomina cloro libre disponible. La distribución de estas dos especies es muy importante, puesto que la capacidad de destrucción de organismos de HOCl es entre 40 y 80 veces superior a la del

OCl<sup>-</sup>. También es posible añadir cloro libre al agua mediante la adición de sales de hipoclorito (Metclaf y Eddy, 1996).

### **Hipoclorito de calcio**

Se forma al precipitar una solución formada de gas cloro, óxido de calcio y dióxido de sodio. La reacción entre el hipoclorito de calcio y el agua es la siguiente



El hipoclorito de calcio produce también ácido hipocloroso, al igual que el hipoclorito de sodio, pero incrementa el pH debido a la generación de iones hidroxilo.

### **Hipoclorito de sodio**

Se produce al disolver cloro gas en una solución de hidróxido de sodio. La reacción entre el hipoclorito de sodio y el agua es la siguiente



Esta reacción produce ácido hipocloroso similar al producido en la reacción de hidrólisis del cloro gas. Sin embargo, y contrario a lo que sucede con el cloro gas, la adición de hipoclorito de sodio al agua produce iones hidroxilo que incrementan el pH del agua (CONAGUA, 2007).

### **Otras reacciones**

El cloro también puede reaccionar con otras sustancias disueltas o suspendidas en el agua como, materia orgánica, ácido sulfhídrico, manganeso, hierro, nitritos y amoníaco. El cloro al entrar en contacto con el agua, una cantidad se consume por compuestos reductores que lo convierte en cloruros (cuando son inorgánicos), organoclorados (si son orgánicos) o cloraminas (reacción con amonio) (CONAGUA, 2007).

### **Hierro y manganeso**

Uno de los principales usos del cloro es la oxidación del hierro y manganeso. Las condiciones de reacción para la oxidación de estos compuestos que confieren al agua sabor y color se exponen en la Tabla 7.

**Tabla 7** Dosis y condiciones de aplicación de cloro para la oxidación de Fe y Mn (CONAGUA, 2007)

	<b>Dosis típica</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Tiempo de reacción</b>
Hierro	0.62 mg/mg Fe	7.0	Menos de 1 hora
Manganeso	0.77 mg/mg Mn	7 – 8	1-3 horas

### **Materia orgánica**

El cloro reacciona con la materia orgánica y sus derivados cambiando su estructura, formando organoclorados.



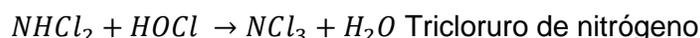
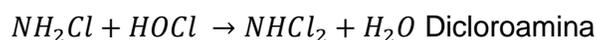
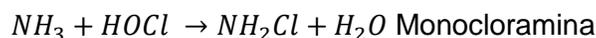
La materia orgánica se encuentra en forma natural en el agua de suministro por la presencia de ácido húmicos o en forma artificial (CONAGUA, 2007).

Algunos organoclorados:

- Etanoclorados, compuestos de uso difundido en la industria que se utilizan como solventes, ablandadores, diluyente de pintura y líquido para tintorería. De ellos, el cloruro de vinilo es reconocido como carcinógeno para seres humanos.
- Los trihalometanos (THM) son un subconjunto de los organoclorados, derivados del metano (CH<sub>4</sub>), de cuya molécula son sustituidos tres átomos de hidrógeno por igual número de halógenos (cloro, bromo y/o yodo). Los trihalometanos son regulados por la EPA para protección ecológica y de la salud humana. Los THM's no se forman exclusivamente durante el tratamiento de agua, sino aún después de realizada la cloración (CONAGUA, 2007). La concentración máxima permisible de trihalometanos totales es de 0.2 mg/L (NOM-127-SSA1-1994).

### **Amoniaco**

El ácido hipocloroso es un agente oxidante de gran actividad, reacciona rápidamente con el amoniaco presente en el agua residual para formar tres tipos de cloraminas.



Estas reacciones dependen del pH, la temperatura, tiempo de contacto y la relación inicial entre cloro y amoníaco (Metcalf y Eddy, 1996).

Las cloraminas también tienen capacidad desinfectante, pero en menor intensidad que el HOCl o OCl<sup>-</sup> (alrededor de 50 veces); no obstante, son más perdurables en agua por lo que su poder residual es más prolongado y llega incluso a inactivar virus. Debido a que las cloraminas no generan THM's, actualmente su uso se prefiere en potabilización (CONAGUA, 2007)

### **Reacción al breakpoint (punto de quiebre)**

El cloro es un agente oxidante fuerte, reacciona con la mayor parte del material en estado reducido (Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>S y amoníaco), esta materia consume el cloro antes de que éste actúe como desinfectante. La cantidad de cloro necesaria para obtener cloro residual libre es determinada experimentalmente (CONAGUA, 2007).

Conforme el cloro es añadido, reacciona con la materia oxidable y así todo se reduce a ion cloro (punto A). Después de haber cubierto esta demanda, el cloro sigue reaccionando con el amoníaco para formar cloraminas (entre el punto A y B). Entre el punto B y el punto de quiebre, algunas de las cloraminas se convierten a tricloruro de nitrógeno (NCl<sub>3</sub>), las cloraminas restantes son oxidadas a óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y nitrógeno (N<sub>2</sub>) y el cloro se reduce a ion cloro. Si se adiciona más cloro, la mayoría de las cloraminas se oxidarán. Una vez alcanzando el punto de quiebre, la adición de cloro resulta en un incremento proporcional del cloro residual libre (CONAGUA, 2007), esto se observa gráficamente en la Figura 10.

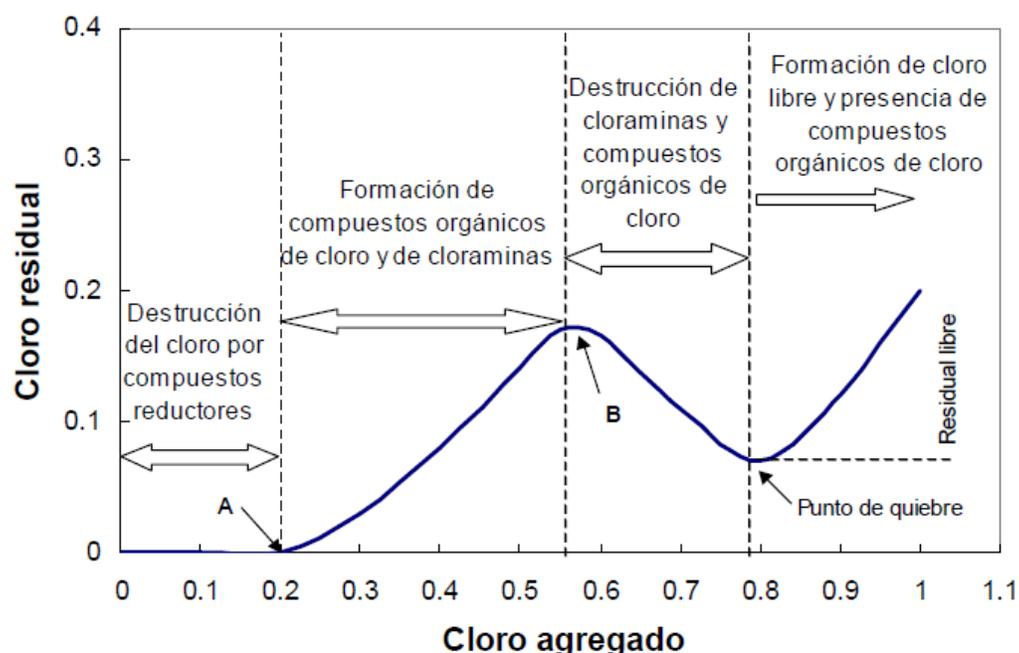


Figura 10 Curva en la cloración a punto de quiebre (CONAGUA, 2007)

Debido a que en la cloración los factores que afectan el proceso son de importancia para asegurar una desinfección eficiente; en la Tabla 8 se presentan las características e importancia de estos factores que pueden comprometer el aseguramiento microbiológico del agua tratada.

Tabla 8 Factores que afectan la eficiencia de la cloración

Factor	Características	Referencia
Tiempo de contacto	Tiempo disponible para que el cloro actúe sobre los microorganismos. Mínimo de 10 a 15 minutos en agua potable Mínimo de 15 a 30 minutos en agua residual.	CONAGUA, 2007
Temperatura	La destrucción de microorganismos con cloro es mucho más rápida a mayor temperatura. El cloro es más estable en agua fría lo que en la práctica compensa la menor velocidad de desinfección.	
pH	Afecta la acción desinfectante del cloro, particularmente la del cloro residual combinado. Mientras más alcalina sea el agua se requieren mayores dosis para una misma temperatura y tiempo de contacto	
Mezcla inicial	A mayor turbulencia (Número de Reynolds, $Re=100000$ ) conduce a índices de mortalidad de dos órdenes de magnitud mayores a los conseguidos con la adición de cloro directamente a un reactor de mezcla completa No se conoce el nivel de turbulencia óptimo	Metcalf y Eddy, 1996

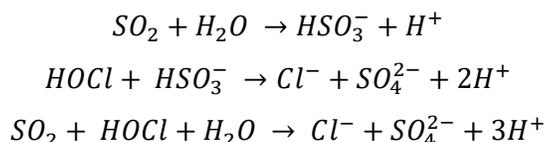
Factor	Características	Referencia
Reacción al breakpoint	Debido a la presencia de nitrógeno en el agua, una parte del cloro reaccionará y al inyectar la solución de cloro se encontrará en forma de monocloramina o dicloramina  Esto puede ser un problema debido a la ubicación del inyector, siendo que la distancia sea muy larga, en este tiempo el cloro puede reaccionar y llegar como cloramina, pero ésta también tiene un efecto germicida.	Metcalf y Eddy, 1996
Características de los microorganismos	Para un cultivo joven (1 día o menos) con una dosificación de 2 mg/L solo fue preciso un minuto para alcanzar un número reducido de bacterias. Cuando el cultivo bacteriano tiene 10 días o más, fueron precisos alrededor de 30 minutos para lograr una reducción comparable. Es probable que la causa del fenómeno observado sea la resistencia ofrecida por la envoltura de polisacárido que desarrolla el microorganismo conforme va envejeciendo.	

### Decloración

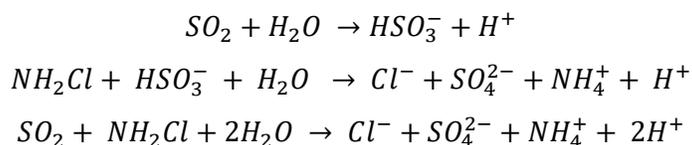
Consiste en la eliminación de la totalidad el cloro combinado residual presente después de la cloración, para reducir los efectos tóxicos. El producto químico que se utiliza para llevar a cabo la decloración es el dióxido de azufre. Otros compuestos que también se han empleado son el sulfito de sodio,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , y el metabisulfito de sodio,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ .

#### Dióxido de azufre

El gas dióxido de azufre elimina el cloro libre, la monocloramida, la dicloramida, el tricloruro de nitrógeno y los compuestos policlorados, de acuerdo con las siguientes reacciones con cloro:



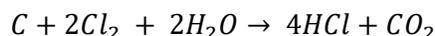
Reacciones con cloraminas:



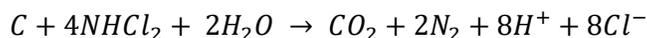
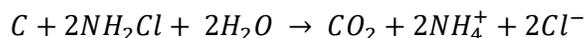
#### Carbón activado

La decloración mediante adsorción sobre carbón activado proporciona una completa eliminación tanto del cloro residual libre como del combinado.

Reacciones con el cloro:



Reacciones con las cloraminas:



El carbón activado granular se utiliza en filtros de gravedad o a presión (Metcalf y Eddy, 1996).

## Derivados del cloro

### Hipoclorito de calcio

Conocido también como cloruro de cal, es producido al adicionar monóxido de cloro al agua y neutralizar con lechada de cal para crear una solución de hipoclorito de calcio. Posteriormente, se elimina el agua de la solución para dejar el hipoclorito de calcio en forma granular. El contenido de cloro activo varía del 30% al 70% (CONAGUA, 2007).

### 2.5.1.2 Dióxido de cloro

El poder de desinfección es igual o superior al del cloro, resulta más efectivo que el cloro en la inhibición e inactivación de virus (Metcalf y Eddy, 1996). Las propiedades de este desinfectante (generación, efectividad, entre otras) se exponen en la Tabla 9, se observa que en cuanto a la formación de THM, el  $ClO_2$  no es tan reactivo comprando con el cloro, además de presentar un mayor poder desinfectante.

**Tabla 9** Dióxido de cloro (Elaboración propia, adaptado de Metcalf y Eddy, 1996)

Generación	Debe llevarse a cabo in situ, ya que es un gas inestable y explosivo $2NaOCl + Cl_2 \rightarrow 2ClO_2 + 2NaCl$ (reacción de generación)
Efectividad	Tienen un potencial de oxidación alto Los mecanismos bactericidas, probablemente tengan que ver con la inactivación de los sistemas enzimáticos críticos, o con la interrupción y destrucción del proceso de síntesis de proteínas
Formación de	Clorito y clorato Una ventaja es que no reacciona con el amoniaco, por lo tanto, no hay formación

subproductos	de cloraminas que son tóxicas No hay formación de compuestos orgánicos halogenados en cantidades apreciables
Impacto ambiental	Los efectos no son conocidos con exactitud Se considera que los efectos producidos no son tan nocivos como los derivados de del proceso de cloración No reacciona ni se disocia en agua como el cloro
Decloración	Se puede llevar a cabo con dióxido de azufre Son necesarios 2.5 mg de dióxido de azufre por cada mg de dióxido de cloro residual. En la práctica se suelen emplear 2.7 mg/mg

### Medición del cloro residual

La desinfección del agua se controla tomando como indicador el cloro residual existente en el agua ya sea libre para agua potable o combinado para agua residual. A la fecha existe una gran variedad de métodos para determinar el cloro residual, por lo que debe ponerse especial cuidado en los límites de detección y las interferencias que cada uno tiene. Los más antiguos son el yodométrico y el de la ortotolidina. Este último, a pesar de ser un método rápido de determinación de cloro residual, no es recomendable debido a su baja confiabilidad y precisión, y por su naturaleza tóxica.

En la actualidad, el método más confiable es el de DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina) que determina el cloro total sino también diferencia entre el libre y el combinado, así como el método amperométrico. En este último, una celda produce una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de cloro. La corriente es medida y transformada a un indicador y se puede determinar, en forma separada, el cloro libre y combinado (CONAGUA, 2007). Otros métodos usados para la determinación de formas activas del cloro se presentan en la Tabla 10, la cual también contiene información sobre el límite de detección del método analítico que se use y reactivos que se utilizan para la determinación.

**Tabla 10** Métodos de determinación de cloro residual (CONAGUA, 2007)

Método	Formas activas del cloro que determina el método	Reactivos	Interferencias	Procedimiento	Límite de detección (mg/L)
DPD	Cloro total Cloro libre Cloro combinado Monocloramina	N,N-dietil-pfenilendiamina (DPD) Solución tampón de fosfato	Óxidos de manganeso (puede compensarse) pH entre 6.2 y	Titulométrico	0.018
				Colorimétrico	0.01

	Dicloroamina Tricloruro de N.	Yoduro de potasio Solución de sulfato ferro	6.5		
Amperométrico	Cloro libre Cloro total Monocloramina Dicloramina	Oxido de fenilarsina Yoduro de potasio Biyodato de potasio Solución de acetato	NCl <sub>3</sub> Dióxido de cloro Halógenos libres Cobre Plata	Titulación	0.2
				Titulación bajo nivel	0.010
Yodométrico	Cloro total	Yoduro de potasio Almidón Ácido acético glacial	Fe Mn N (Nitritos)	I	0.04
				II	1
Siringaldacina (PCLD)	Cloro libre	Indicador de siringaldacina 2- propanol Hipoclorito Soluciones tampones	Concentraciones altas de monocloraminas (35 mg/L) y de manganeso oxidado	Fotométrico Colorimétrico	0.1

### 2.5.1.3 Ozono

Es un gas alótropo del oxígeno, cuya fórmula molecular es O<sub>3</sub>, a condiciones ambientales normales es un gas inestable color azul y olor picante que se descompone rápidamente a O<sub>2</sub>. No se puede almacenar o envasar, la generación debe ser *in situ* y usarse de inmediato (CONAGUA, 2007; Solsona, 2002).

#### Usos del ozono

- Desinfección
- Oxidación
- Pretratamiento, mejora la coagulación e incrementa la biodegradabilidad (CONAGUA, 2007)

Una característica de la desinfección con ozono es que no tiene efecto residual, siendo una ventaja ya que no le da sabor desagradable al agua, pero como desventaja está que no asegura la calidad del agua hasta que llegue al consumidor mediante algún efecto residual. El método de desinfección consiste en agregar ozono lo más rápidamente para satisfacer la demanda y mantenga un residual durante un tiempo suficiente para asegurar la inactivación o destrucción de microorganismos. La demanda de ozono suele ser mayor que la de cloro, debido al gran potencial de oxidación. Generalmente se trata de mantener un residual de 0.4 a 0.5 ppm después de 10 a 20 minutos (Solsona, 2012).

### Generación de ozono

El ozono puede ser producido por tres métodos:

- Fotoquímico. Se basa en la ionización del aire u oxígeno con luz UV. Es económico y aplicable para tratar cantidades pequeñas de agua. Consume mucha energía y depende de la humedad del aire y la durabilidad de la lámpara. La producción de ozono es baja (0.5% en peso), se forma a longitudes de onda de 185 nm y se destruye a 254 nm.
- Electrolisis del ácido sulfúrico. Hace uso de corriente directa de bajo voltaje, no necesita gas de alimentación, el tamaño del equipo es reducido y genera altas concentraciones de ozono, presenta corrosión, erosión e incrustaciones en los electrodos, requiere electrolitos especiales o agua de baja conductividad, si hay presencia de iones cloruro hay producción de cloro libre disminuyendo el rendimiento de la formación de ozono.
- Descarga corona. Consiste en pasar una corriente de aire u oxígeno libre de humedad a través de una descarga eléctrica producida al aplicar altos voltajes entre dos electrodos. La gran desventaja de este proceso de generación es que solo el 10% de la energía empleada es usada y el resto se pierde como luz, calor y sonido (CONAGUA, 2007).

#### *Equipos generadores de ozono por descarga corona*

Los generadores de ozono constan de 5 componentes: la unidad de preparación de gas (que puede ser tanto aire u oxígeno puro); el generador de ozono, la fuente de energía eléctrica, el contactor y la unidad para la eliminación del gas sobrante (Figura 11). En la mayoría de los casos, además de ozono se añade un desinfectante secundario para asegurar un residual duradero en el sistema de distribución.

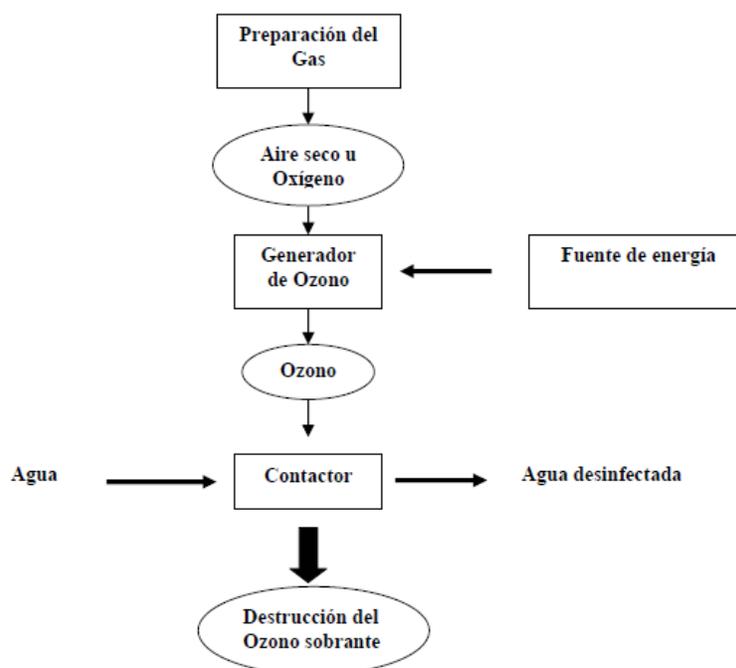


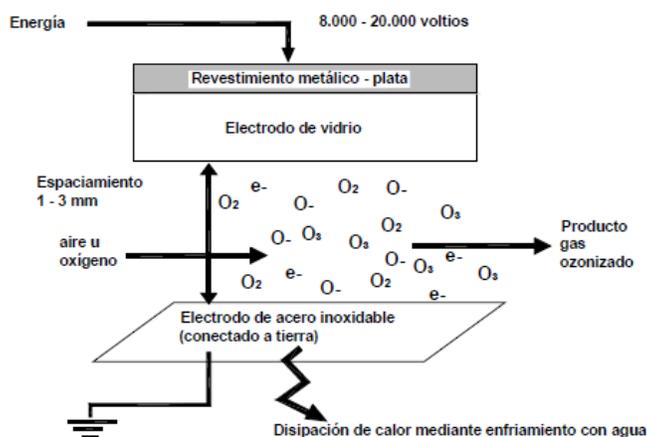
Figura 11 Esquema básico de la ozonización (Solsona, 2012)

Preparación del gas. El propósito de esta etapa es secar y enfriar el gas que contiene oxígeno. Los generadores tipo descarga corona utilizan aire seco u oxígeno puro. Al utilizar aire es importante secarlo hasta el punto de condensación ( $-65^{\circ}\text{C}$ ) para maximizar el rendimiento de ozono y reducir la formación de óxidos de nitrógeno. El aire se enfría ya que el ozono se descompone a temperaturas superiores a  $30^{\circ}\text{C}$ . Otras técnicas para secar el aire hacen uso de descantes químicos.

Generador de ozono. Los generadores patentados disponibles en el mercado son del tipo tubo, placa de Otto y placa Lowther.

- La placa de Otto es más antigua; opera a presión atmosférica o negativa y puede funcionar hasta puntos de condensación de  $-30^{\circ}\text{C}$ .
- La placa de Lowther; tiene sistema de enfriamiento con aire y puede usar aire u oxígeno puro. Requiere bajas cantidades de energía (Solsona, 2012).
- Tubo horizontal, mostrado en la Figura 12; es enfriado por agua, se emplea a nivel industrial y para plantas de tratamiento grandes. Los tubos están contruidos de vidrio, recubiertos por aluminio, están separados en el interior de tubos de acero inoxidable refrigerados por agua. Entre el vidrio y el acero inoxidable pasa el aire

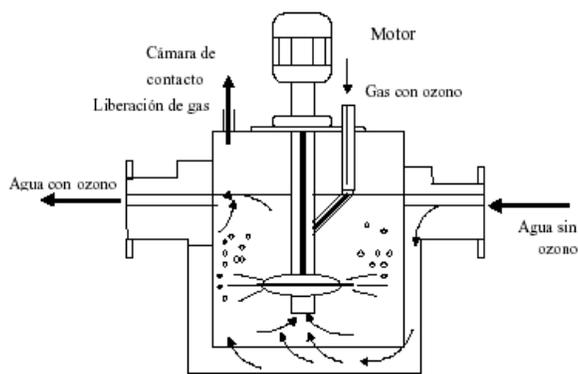
u oxígeno a presión, parte del gas se convierte en ozono al aplicar descarga eléctrica a través del espacio entre el tubo de vidrio y el de acero inoxidable. El agua circula continuamente extrayendo el calor generado (Solsona, 2012; Mantell, 1980).



**Figura 12** Diagrama de un generador de ozono de tubos dieléctrico (Solsona, 2012)

Fuente de energía. Las fuentes de baja energía de baja frecuencia (50 a 60 Hz) y alta presión (>20000 V) son más comunes.

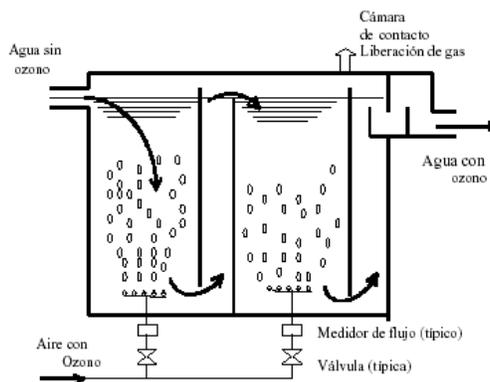
Contactores. Puede ser de burbuja fina o de agitación por turbina. El contactor de agitación con turbina mezcla el ozono con el agua. La Figura 13 es una representación gráfica de un contactor de turbina.



**Figura 13** Contactor de agitación por turbina  
Tomado de <http://www.elaguapotable.com/ozonizacion.htm>

En los contactores de burbuja fina (Figura 14), las cámaras están en serie y separadas con deflectores o mamparas. El difusor de burbuja ofrece la mayor eficiencia de

transferencia. Se hace uso de columnas o cámaras de contacto (generalmente empacadas con material plástico para aumentar el tiempo de intercambio y dispersar las burbujas. La alimentación del flujo se realiza contracorriente, esto para maximizar el tiempo de contacto.



**Figura 14** Contactor de burbuja

Tomado de <http://www.elaguapotable.com/ozonizacion.htm>

Unidad destructora de ozono. La transferencia de ozono al agua depende de la presión parcial del gas ozono en el agua. La transferencia no es 100% realizada (se alcanza un 90%), el gas sobrante con frecuencia se hace recircular a un proceso unitario anterior para mejorar operaciones como la floculación u oxidación y aprovechar el gas excedente. Algunos métodos para la destrucción de ozono son:

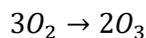
Descomposición térmica. Consiste en elevar la temperatura, 300°C

Descomposición catalítica. El ozono se pasa a través de metales u óxidos metálicos

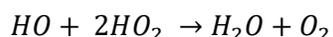
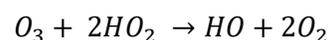
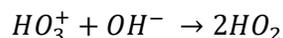
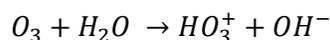
Absorción en carbón granular húmedo (Solsona, 2012).

### Química del ozono

La generación está dada por la ecuación



Las reacciones de descomposición son:



Los radicales que generan el HO<sub>2</sub> y HO<sup>•</sup> son altamente oxidantes y son los responsables de la acción desinfectante. Estos radicales también tienen suficiente capacidad oxidante para hacer reacción con otras impurezas. (Metcalf y Eddy, 1996).

### Efectos a la salud

Los síntomas reportados en humanos son los siguientes:

- Olor irritante
- Sensación quemante y ojos llorosos
- Irritación y resequead de la membrana mucosa de nariz y garganta
- Languidez, somnolencia, cansancio
- Dificultad para respirar, tos seca, asfixia
- Dolor, opresión en el pecho
- Dolor de cabeza, vómito, dolor de estómago
- Mareo, colapso
- Edema pulmonar, congestión, hemorragia, posible muerte (Water Environment Federation, 1996).

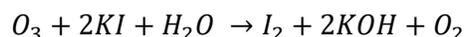
La concentración de ozono que perjudica a la salud es muy baja, la Tabla 11 muestra las concentraciones de ozono en el aire y el efecto a la salud que produce la exposición a éstas.

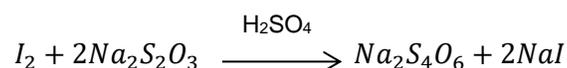
**Tabla 11** Efectos del ozono sobre la salud (Water Environment Federation, 1996)

Concentración (ppm)	Reacción
0.015 a 0.1	Olor detectable
0.1	Irritación de nariz y garganta
0.5 a 1.0	Dificultad para respirar
1.0 a 10	Edema pulmonar

### Análisis de ozono

*Ozono en fase gaseosa.* El ozono se absorbe en una solución neutra o alcalina de KI, la solución se acidifica y se titula con una solución de tiosulfato de sodio, de acuerdo con las siguientes reacciones:





*Ozono en fase líquida.* Se usa el método colorimétrico de índigo, el cual relaciona la disminución de la absorbancia con el incremento de la concentración de ozono. El ozono actúa sobre el reactivo de índigo decolorando la solución (inicial, color azul). La disminución de absorbancia se determina con espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm (Bader y Hoigné, 1981).

### **Ventajas y desventajas del uso del ozono**

#### Ventajas

- El uso de ozono para desinfectar eleva el contenido de oxígeno disuelto en el efluente, esto puede evitar reairear el efluente para cumplir con las normativas de oxígeno disuelto.
- Como el ozono se descompone rápidamente no deja subproductos en el agua como otros desinfectantes como el cloro (Metcalf y Eddy, 1996).
- Fuerte oxidante que reacciona con materia orgánica y microorganismos.
- No imparte sabor ni olor al agua.
- Mayor poder desinfectante que el cloro y sus derivados (CONAGUA, 2007).

#### Desventajas

- Costos
- Rendimiento del generador de ozono
- Calidad de los métodos de inyección del gas (CONAGUA, 2007)

#### **2.5.1.4 Otros desinfectantes químicos**

Como se mencionó al inicio del apartado, hay muchas sustancias químicas que son consideradas desinfectantes, pero debido a su naturaleza no son usados a nivel industrial ni en engrandes caudales de agua a tratar, éstos y sus características se enlistan en la Tabla 12:

**Tabla 12** Características de otros desinfectantes químicos (elaboración propia)

Agente químico	Desinfectante	Características	Acción microbiana	Referencias
Halógenos	Bromo	Actúa en forma semejante al cloro. Disuelto en agua produce HOBr. Poder de desinfección alto, pero ligeramente menor al del cloro. Más simple de manipular y dosificar que el cloro Presenta casi todas las ventajas de la cloración Su costo es mucho más elevado y la dificultad para adquirirlo en cualquier comunidad, sobre todo en aquellas alejadas y menores de los países en desarrollo	Penetra en las membranas de las células de los microorganismos. Una vez dentro de la célula, su sola presencia parece “desorganizar” la estructura de aquellos, pero atacan también reaccionando con grupos sulfhidrilos, inactivando enzimas y deteniendo el proceso metabólico, lo que lleva a la muerte del microorganismo	<a href="http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo9.pdf">http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo9.pdf</a>
	Yodo	Tiene baja solubilidad en el agua y es la sustancia menos agresiva de su familia (halógenos) Disuelto en agua forma ácido hipoyodoso	Buen bactericida, destruye inclusive esporas, quistes y virus	<a href="http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo9.pdf">http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo9.pdf</a>
Fenoles	Fenol, cresol	Alcoholes aromáticos. Carácter ácido, forma sales metálicas. Se encuentran en productos como los jabones. Poca solubilidad en agua. Conserva la acción desinfectante en presencia de materia orgánica	Son bactericidas a bajas concentraciones, causando daño a las membranas con pérdida de los constituyentes citoplasmáticos, inactivando irreversiblemente las oxidasas y deshidrogenasas de membrana y produciendo desnaturalización de las proteínas. Tiene propiedades antibacterianas frente a estreptococos, estafilococos y <i>Escherichia coli</i> , y también propiedades antifúngicas y antivirales.	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005
Alcoholes	Etanol, alcohol isopropílico	Usados como antisépticos y desinfectantes. Concentraciones entre 70% y 96% (etanol), 70% y 100% (alcohol isopropílico) Etanol más usado por ser menos irritante Acción rápida (15 segundos), sin efecto persistente Efectos permanecen por horas Rápida acción y amplio espectro de actividad Actúa sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus (hepatitis B y VIH), pero no son esporicidas <sup>2</sup>	Actúan destruyendo la membrana celular y desnaturalizando las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, ello se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias permitiendo así daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas, con la consiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular.	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005

**Tabla 12** (continuación). Características de otros desinfectantes químicos

Agente químico	Desinfectante	Características	Acción microbiana	Referencias
<b>Metales pesados</b>	Mercurio	Su espectro de acción es más pronunciado sobre las bacterias Gram positivas que sobre las bacterias Gram negativas Los compuestos inorgánicos del mercurio (mercuriocromo, mercuramina, timerosal) no son totalmente fiables como desinfectantes y presentan cierta toxicidad, pero se emplean mucho como antisépticos de la piel y de heridas. Las sales de fenilmercurio son potentes inhibidores no sólo de bacterias, sino de levaduras, hongos y algas. Se usan especialmente en el control de posibles contaminantes microbianos en productos farmacéuticos, cosméticos y oftalmológicos.	Acción bacteriostática y fungistática, de escasa potencia, que se debe a la acción precipitante de las proteínas presentes en el protoplasma bacteriano	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005
	Plata	Acción bactericida, principalmente sobre bacterias Gram positivas y menor frente a bacterias Gram negativas. Han mostrado buena actividad fungicida y virucida AgNO <sub>3</sub> es un potente germicida que destruye la mayor parte de gérmenes, en forma rápida, a una concentración del 1%	Interacción de iones plata con grupos sulfidilo, interactuando con las enzimas, proteínas y ácidos nucleicos produciendo cambios estructurales en la pared celular bacteriana, membranas y ácidos nucleicos afectando su viabilidad	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005
	Cobre	Astringente, secante y antiséptico, usándose en forma de fomentos en las epidermofitosis infectadas secundariamente por bacterias.	Actúan precipitando las proteínas bacterianas.	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005
	Zinc	Todas las sales de zinc son agentes astringentes, corrosivas y antisépticas y se pueden usar en polvo, pomadas y lociones	Actúan precipitando las proteínas bacterianas.	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005
<b>Pigmentos</b>	Colorantes de trifenilmetano	Derivados de la anilina Verde brillante, verde malaquita, violeta de genciana, cristal violeta, fucsina básica Selectivos hacia bacterias Gram positivas, sobre las que son efectivos a sólo 0,2 – 2 ppm	El efecto antibacteriano se debe a la pseudobase, que es más lipófila que el respectivo catión, y bajo esa forma accede al interior celular, donde se une a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos	láñez Pareja, 1998
	Derivados de la acridina	Acriflavina, la proflavina y la tripoflavina Son bactericidas y bacteriostáticos sobre una gran diversidad de bacterias	Interfieren en la biosíntesis de ácidos nucleicos (intercalándose en la doble hélice del ADN) y proteínas	láñez Pareja, 1998

**Tabla 12** (continuación). Características de otros desinfectantes químicos

Agente químico	Desinfectante	Características	Acción microbiana	Referencias
<b>Jabón y detergente</b>	Detergentes catiónicos	Son los detergentes más potentes en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los principales son los llamados compuestos de amonio cuaternario	Cubren y solubilizan moléculas hidrófobas	láñez Pareja, 1998
	Detergentes aniónicos	Son activos sobre todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram positivas, pero poco sobre Gram negativas, ya que éstas quedan más protegidas por la barrera del lipopolisacárido de la membrana externa	Provocan una gran disrupción de membranas, con efectos de lisis	láñez Pareja, 1998
	Detergentes no iónicos	Algunos tienen empleo en otros campos de la Microbiología: los ésteres del ácido oleico (bajo nombres comerciales como CarbowaxJ, Tween-80J) pueden adicionarse a medios de cultivo para evitar la formación de grumos y favorecer el crecimiento disperso de ciertas bacterias	No tiene actividad microbiana	láñez Pareja, 1998
<b>Aminas cuaternarias</b>	Contienen al ion amonio $\text{NH}_4^+$ , donde cada uno de los hidrógenos está sustituido generalmente por radicales de tipo alquil y aril	Incoloros, inodoros, no irritantes y desodorantes También tienen una acción detergente y son buenos desinfectantes. Son solubles en agua y alcohol. La presencia de cualquier residuo proteico anula su efectividad. Activos para eliminar bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque éstas últimas en menor grado. Son bactericidas, fungicidas y virucidas, actuando sobre virus lipofílicos, pero no sobre los hidrófilos. No tiene acción sobre las micobacterias, ni son esporicidas.	Lesionan la membrana celular debido a que desorganizan la disposición de las proteínas y fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo con el metabolismo energético y el transporte activo	Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005

**Tabla 12** (continuación). Características de otros desinfectantes químicos

Agente químico	Desinfectante	Características	Acción microbiana	Referencias
Peróxido de hidrogeno	----	<p>Efecto breve, porque el oxígeno naciente se combina rápidamente con toda materia orgánica, volviéndose inactivo.</p> <p>Su espectro de actividad es sobre bacterias vegetativas, virus, micobacterias y esporas.</p>	<p>Inactivación de proteínas enzimáticas actuando sobre los grupos (-SH) de las proteínas de estructura y de las proteínas de función de las bacterias<sup>1</sup></p> <p>El peróxido de hidrógeno tiene efectos oxidantes por producir OH<sup>•</sup> y radicales libres, los cuales atacan a los componentes esenciales de los microorganismos como lípidos, proteínas y ADN</p>	<p>Sánchez-Saldaña y SáenzAnduaga, 2005</p>
Ácidos y álcalis	----	<p>Los efectos tóxicos pueden ser notables a pH inferior a 3 y superior a 11</p> <p>La desinfección de agua y agua residual por adición deliberada de ácido o base no se usa en la práctica, más bien es inherente a otros procesos de tratamiento como el ablandamiento por cal-sosa<sup>1</sup></p> <p>En principio, su actividad es proporcional al grado de disociación, pero algunos hidróxidos son más potentes de lo sugerido por su mero grado de disociación, debido a la acción tóxica directa que puede ejercer el catión metálico<sup>2</sup></p>	<p>Un incremento de la basicidad o de la acidez, generalmente coincide con un incremento de la fuerza iónica y la presión osmótica, lo cual puede ocasionar efectos destructivos en las células<sup>1</sup></p>	<p><sup>1</sup> Weber, 1979</p> <p><sup>2</sup> Iáñez Pareja, 1998</p>

## 2.5.2 Agentes físicos

Son aquellos en los que el control de los microorganismos se hace aplicando energía en forma de calor u ondas electromagnéticas (Avilés y Montellano, s.f.).

### 2.5.2.1 Radiación UV

Es un método físico práctico para la desinfección de agua. Se empezó a usar en 1901 cuando se consiguió producir la luz artificialmente. Sin embargo, debido a la facilidad y bajo costo del cloro no se utilizó la luz UV hasta 1950, pero en 1970 las lámparas comenzaron a ser confiables y de vida prolongada (Solsona, 2002).

Su uso ha sido en las industrias farmacéuticas, cosméticas, de bebidas y electrónicas. La desinfección con luz UV está ganando terreno respecto al cloro debido a que en esta práctica no hay formación de organoclorados como en la cloración. La luz UV desinfecta el agua residual sin necesidad de almacenar o manejar reactivos químicos peligrosos y reduce el tamaño de los tanques de tratamiento debido a los tiempos de contacto cortos (CONAGUA, 2007)

#### *Características*

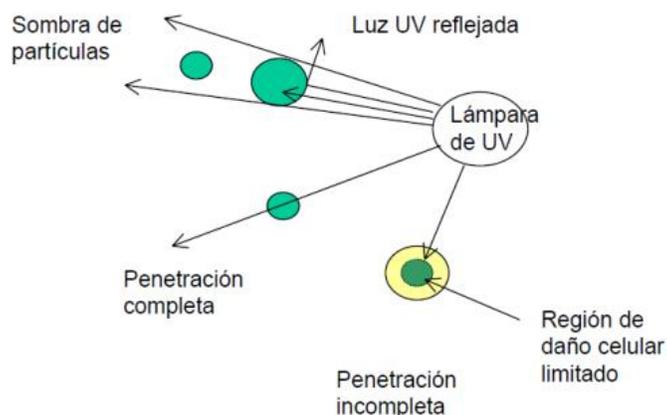
La luz ultravioleta es una radiación electromagnética que está presente en el espectro natural de la radiación solar. Tiene una longitud de onda menor a la de la luz visible (400 nm) y mayor a la de los rayos X (100 nm). Mientras menor es la longitud de onda mayor es la energía contenida, por lo que, la radiación ultravioleta tiene una energía inferior a la de los rayos X pero mayor que la de la luz visible (CONAGUA, 2007).

El espectro UV se puede dividir en tres componentes principales que provocan efectos biológicos significativamente diferentes: UV-A, longitudes de onda de 400 – 320 nm (sinónimos: RUV de onda larga, RUV próxima, luz negra); UV-B, longitudes de onda de 320 – 280 nm (sinónimos: RUV de onda media, radiación productora de “quemadura solar”); y UV-C, longitudes de onda de 200 – 280 nm (sinónimos: RUV de onda corta, RUV lejana, radiación germicida. Las longitudes de onda menores de 200 nm tienen poca importancia biológica, ya que la radiación en esta región (RUV de vacío) es absorbida en el aire en muy cortos recorridos (OPS, 1984).

### ***Efectos biológicos de la radiación UV***

El mecanismo de desinfección se basa en un fenómeno físico por el cual las ondas cortas de la radiación ultravioleta inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos y los virus, destruyéndolos en corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos notables en el agua tratada (Solsona, 2002).

La radiación con longitud de onda alrededor de 254 nm penetra la pared celular de los organismos y es absorbida por los materiales celulares incluidos el ADN y ARN, lo cual impide la reproducción o produce directamente la muerte de la célula. Debido a que solo son efectivos los rayos UV que alcanzan a las bacterias, es conveniente que el agua esté libre de turbiedad (Figura 15), que podría absorber la radiación ultravioleta y actuar como escudo de las bacterias (Metcalf y Eddy, 1996).



**Figura 15** Efecto de la turbiedad en la desinfección con radiación UV (CONAGUA, 2007)

### ***Ventajas del uso de radiación UV***

- No se requieren químicos consumibles ni tóxicos.
- No existe riesgo de sobredosis.
- Es ambientalmente amigable.
- Bajo consumo de energía.
- Mínima depreciación.
- Bajo costo de inversión y funcionamiento.

- Inactivación de patógenos en fracciones de segundo.
- No daña las instalaciones hidráulicas.
- De fácil aplicación.
- Fácilmente adaptable al caudal y condiciones variables del agua.
- Se perfila como la tecnología con mayor aplicación en el futuro (Díaz, 2002).

### 2.5.2.2 Otros agentes físicos para desinfección de agua

La luz UV es el desinfectante físico más usado a nivel industrial, sin embargo, no es el único; otras formas de desinfección física que se usan son los que requieren energía (ebullición, radiación, entre otros) y de barrera física (filtración). Sin embargo, debido a que la capacidad de cada desinfectante se usa a pequeña o gran escala, en la Tabla 13 se agrupan las características de cada uno.

**Tabla 13** Agentes físicos para desinfección de agua

Agente físico	Usos	Características	Acción microbiana	Referencias
<b>Ebullición</b>	Resulta inviable para aplicarse en un efluente en tratamiento de aguas	Destruye la mayoría de las bacterias no formadoras de esporas, aunque su efectividad disminuye cuando se trata de bacterias y microorganismos que esporulan; inactiva a virus y protozoarios Comparado con otros métodos de desinfección, la ebullición es el más costoso por el gran consumo de energía No hay un acuerdo general del tiempo mínimo de ebullición que garantice la remoción total de los patógenos, los tiempos recomendados oscilan entre 5 y 10 minutos	La ebullición coagula las proteínas de los microorganismos, lo cual provoca la muerte.	Aviles y Montellano, CNA e IMTA
<b>Luz solar</b>	No suele usarse en plantas de tratamiento de agua residual	Efectividad muy grande, tiene una aplicación muy limitada	La luz solar directa es un bactericida potente debido a los rayos ultravioleta del sol	Aviles y Montellano, CNA e IMTA
<b>Filtración</b>	Se aplica solo o combinado después de la floculación biológica o química <sup>1</sup>	Copia el proceso de purificación que se produce en la naturaleza cuando el agua de lluvia atraviesa los estratos de la corteza terrestre y forma los acuíferos o ríos subterráneos.	Las impurezas entran en contacto con la superficie de las partículas del medio filtrante y son retenidas, desarrollándose adicionalmente procesos	<sup>1</sup> CONAGUA, 2007 <sup>2</sup> Solsona, 2002

Agente físico	Usos	Características	Acción microbiana	Referencias
		El filtro lento se utiliza principalmente para eliminar la turbiedad del agua, pero si se diseña y opera convenientemente puede ser considerado como un sistema de desinfección del agua. <sup>2</sup>	de degradación química y biológica que reducen la materia retenida a formas más simples, las cuales son llevadas en solución o permanecen como material inerte hasta un subsecuente retiro o limpieza <sup>2</sup>	
<b>Radiación</b>	Desinfección de agua potable y residual	Principales tipos de radiación electromagnética, acústica y radiación de partículas	Rayos gamma de isotopos radiactivos (como el Co <sup>60</sup> ),	Metcalf y Eddy, 1996
<b>Procesos electrolíticos</b>	----	Consiste en hacer pasar el agua a través de cámaras equipadas con electrodos, a los cuales se les aplica una corriente eléctrica. El consumo energético es de aproximadamente 4.5 W/h por cada litro de agua tratada	Bajo ciertas condiciones, reduce simultáneamente sólidos suspendidos y microorganismos presentes, incluyendo virus	CONAGUA, 2007

### 2.5.3 Comparación de las características de desinfectantes

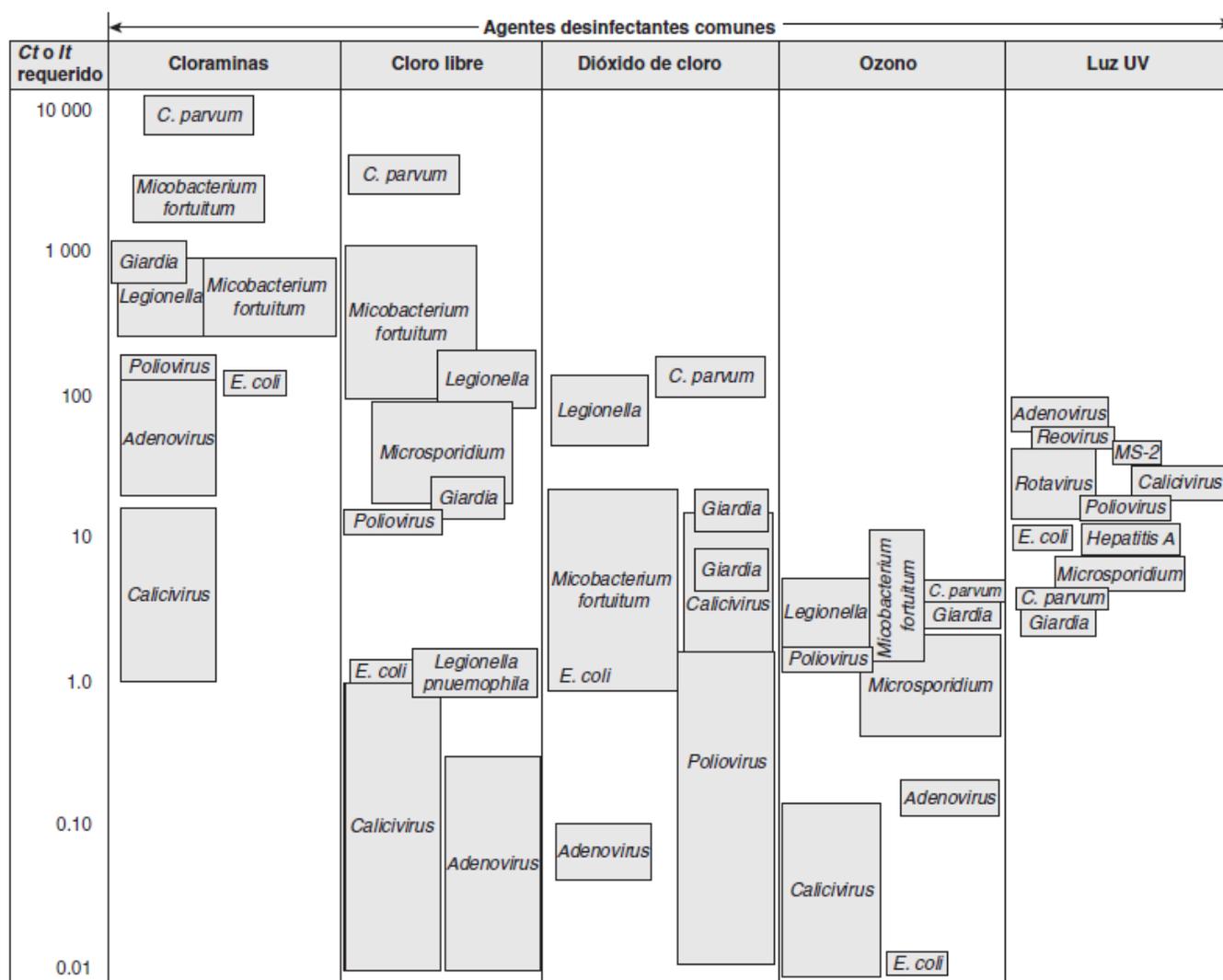
Para el diseño de un sistema de desinfección se necesita considerar el poder oxidante y desinfectante de una sustancia química, el costo-beneficio de usar cierto desinfectante, que no sea tóxico para los seres vivos (humanos y animales), estable, de fácil almacenamiento, no corrosivo (en cuanto al contacto del agua desinfectada con los sistemas de distribución), entre otras características; evaluando estas propiedades se puede definir un desinfectante ideal para un sistema de desinfección específico. Estas características se muestran en la Tabla 14, en la cual se evalúan las cualidades de los desinfectantes más comúnmente usados a nivel industrial.

**Tabla 14** Comparación de características de los desinfectantes (Metcalf y Eddy, 1996)

Característica	Propiedades/respuesta	Cloro	Hipoclorito de sodio	Hipoclorito de calcio	Dióxido de cloro	Cloruro de bromo	Ozono	Radiación UV
Toxicidad para los microorganismos	Debe ser latamente tóxico a altas concentraciones	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Solubilidad	Debe ser soluble en agua o en tejo celular	Ligera	Alta	Alta	Alta	Ligera	Alta	N/A
Estabilidad	La pérdida de acción germicida con el tiempo debe ser baja	Estable	Ligeramente estable	Relativamente estable	Inestable, debe generarse a medida que se consume	Ligeramente inestable	Inestable, debe generarse a medida que se consume	Debe generarse a medida que se consume
No toxico para formas de vida superiores	Debe ser tóxico para los microorganismos y no toxico para el hombre y otros animales	Altamente toxico para formas de vida superior	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
Homogeneidad	La disolución debe ser uniforme en su composición	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	N/A
Interacción con materias extrañas	No debe ser absorbido por otra materia orgánica que las células bacterianas	Oxida la materia orgánica	Oxidante activo	Oxidante activo	Alta	Oxida la materia orgánica	Oxida la materia orgánica	
Toxicidad a temperatura ambiente	Debe ser efectivo en el intervalo de temperaturas ambiente	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Penetración	Debe tener la capacidad de penetrar a través de las superficies	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Moderado
No corrosivo y no colorante	No debe atacar los metales ni teñir la ropa	Muy corrosivo	Corrosivo	Corrosivo	Muy corrosivo	Corrosivo	Muy corrosivo	N/A
Capacidad desodorante	Debe desodorizar a la vez que desinfectar	Alta	Moderado	Moderado	Alta	Moderado	Alta	
Disponibilidad	Debe estar disponible en grandes cantidades y aun precio razonable	Coste bajo	Coste moderadamente bajo	Coste moderadamente bajo	Coste moderadamente bajo	Coste moderadamente bajo	Coste moderadamente elevado	Coste moderadamente elevado

Anteriormente se mencionó el factor Ct (concentración de desinfectante por tiempo de contacto), el cual es un factor clave para la desinfección. En varios trabajos sobre el tema, se han reportado Ct requeridos para inactivar diversos microorganismos, en la Tabla 15 se muestran los Ct requeridos o rangos de Ct requeridos, para 5 diferentes desinfectantes (ya mencionados con anterioridad) y los microorganismos que han sido reportados.

**Tabla 15** Generalidades de los requerimientos de desinfección para una inactivación de 99% (Mihelcic y Zimmerman, 2012)



## 2.5.4 Mecanismos de desinfección

Los mecanismos de desinfección que se llevan a cabo sobre los microorganismos se basan en el daño o interrupción enzimática de éstos, permitiendo la entrada del desinfectante a las células, inactivando al patógeno, los mecanismos más importantes son:

- *Daño a la pared celular.* Da lugar a la lisis celular y a la muerte de la célula.
- *Alteración de la permeabilidad.* Destrucción de la permeabilidad selectiva de la membrana y permite el escape de nutrientes vitales, como el nitrógeno y el fósforo. El daño en la membrana resulta en la inhibición o muerte celular (Metcalf y Eddy, 1996; Montoya, 2008).
- *Alteración del protoplasma.* La alteración de la naturaleza coloidal ya sea por desnaturalización o coagulación causa daños irreparables en la bacteria (Montoya, 2008).
- *Inhibición de la actividad enzimática.* Los agentes oxidantes pueden alterar la estructura química de las enzimas dando lugar a su desactivación (Metcalf y Eddy, 1996).

### 2.5.4.1 Mecanismo de desinfección del cloro

El cloro causa dos tipos de daño en las células. Afecta la integridad de la membrana y obstruye su permeabilidad, altera funciones celulares (daña enzimas y ácidos nucleicos) (CONAGUA, 2007).

Dependiendo del pH, con un  $pK_a = 7.5$ , el ácido hipocloroso o el ion hipoclorito predominan. El ácido hipocloroso predomina a pH inferiores a 7.5, a pH mayores predomina el ion hipoclorito, debido a la disociación del ácido en el agua, esto se muestra a continuación en la siguiente escala de pH (Figura 16):

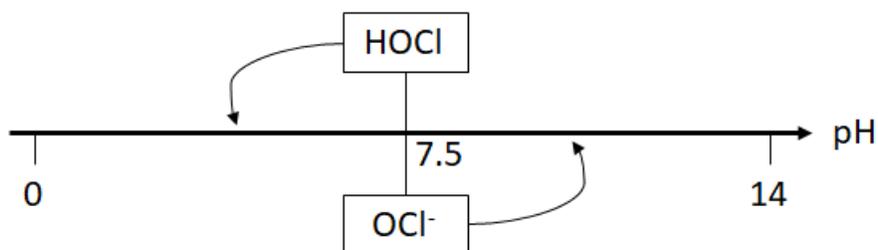


Figura 16 Escala de pH para el par HOCl/OCl<sup>-</sup> (elaboración propia)

Siendo el ácido hipocloroso un mejor oxidante y desinfectante comparado con el ion hipoclorito, es más conveniente tener presente el HOCl, debido a que las bacterias en la superficie poseen cargas negativas, las cuales son más fácilmente penetradas por el HOCl, que el ion hipoclorito el cual tienen la misma carga. El HOCl atraviesa el revestimiento de las células, la pared celular, por lo que es eficaz para la inactivación de microorganismos, esto se esquematiza en la Figura 17 (ACC, 2016).

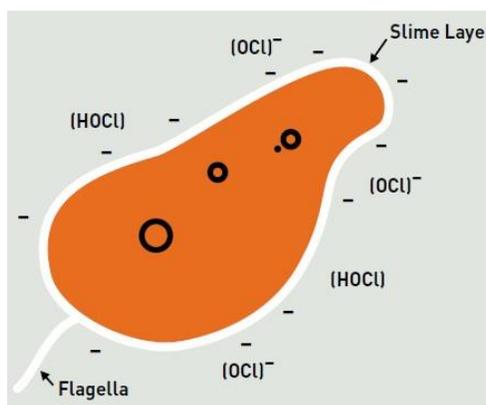


Figura 17 Mecanismo de acción del cloro (ACC, 2016)

#### 2.5.4.2 Mecanismo de desinfección del ozono

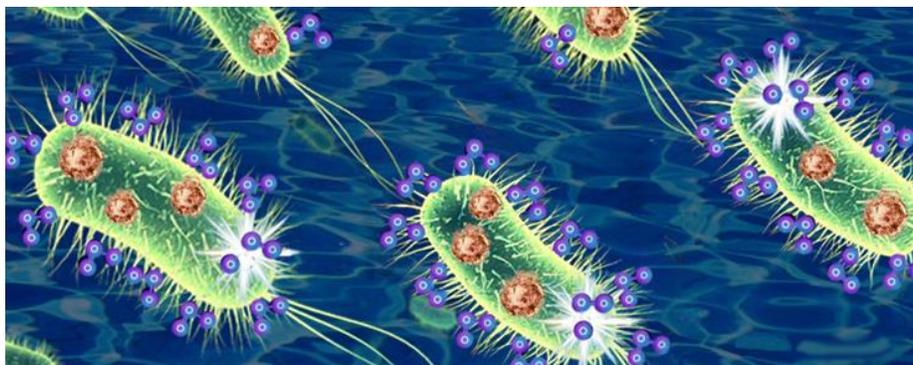
El mecanismo de desinfección se basa en el alto poder como oxidante protoplásmico, convirtiendo al ozono efectivo para destruir virus, esporas y quites resistentes de bacterias y hongos. En presencia de materia orgánica se acelera la descomposición del ozono. Tiene un potencial de oxidación de 2.07 V, teóricamente puede oxidar la mayoría de los compuestos orgánicos convirtiéndolos en CO<sub>2</sub> y agua (Solsona, 2012). En la Tabla 16, se expone la acción bactericida del ozono sobre algunos microorganismos,

Tabla 16 Espectro de acción del ozono sobre microorganismos (adaptado de CONAGUA, 2007)

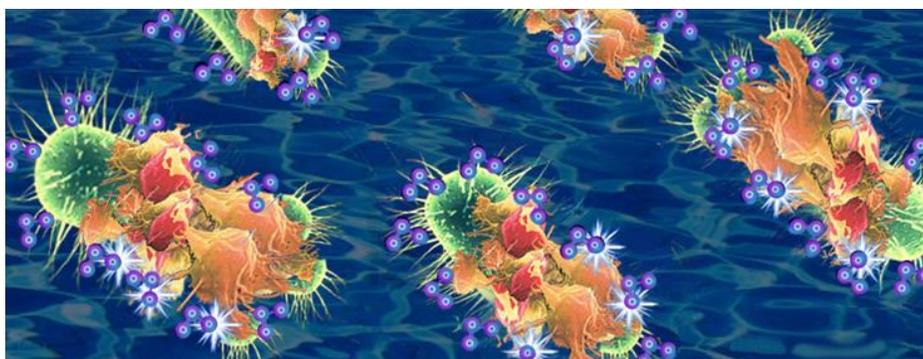
Microorganismo	Acción bactericida
Bacterias	Actúa como bactericida y bacteriostático a concentraciones bajas (0.01 ppm) y cortos periodos de exposición A 12°C y concentración de 0.6 mg/L reduce 4 logs a <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> sp. y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en menos de un minuto. Los <i>Streptococcus fecalis</i> requieren el doble del tiempo y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , seis veces más con la misma concentración.
Virus	Oxida las proteínas de la capa y modifica la estructura tridimensional

Microorganismo	Acción bactericida
	interna, por lo cual el virus no se puede anclar a ninguna célula del huésped. Se requieren 30 segundos a concentración 0.05 mg/L para la destrucción total de virus.
Hongos	Provoca daño celular irreversible.
Esporas	A concentraciones ligeramente superiores a las usadas para el resto de las bacterias, el ozono es capaz de destruir las esporas formadas por hongos y bacterias.
Quistes protozoarios	Los quistes protozoarios son más resistentes que las esporas de virus y bacterias.
Huevos de helminto	No elimina a estos microorganismos.

En las Figuras 18 y 19 se ilustra el mecanismo de acción del ozono como desinfectante. El ozono es un oxidante fuerte y viricida, el mecanismo de acción del ozono consiste en la oxidación directa y destrucción de la pared celular con escape de material celular al medio. Hay daño a los constituyentes de los ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas (EPA, 1999).



**Figura 18** Ozono atacando la pared celular  
(Fuente: <http://contaminationprevention.com/how-ozone-works/> )



**Figura 19** Lisis celular causada por la oxidación con ozono  
Fuente: (<http://contaminationprevention.com/how-ozone-works/> )

## 2.5.5 Modelos de cinéticas de desinfección

En la Figura 20 se ilustran varios tipos de cinéticas de desinfección, en una gráfica semi logarítmica de inactivación contra tiempo de contacto. La curva A representa la curva de inactivación exponencial. La curva B presenta una fase de latencia (lag) seguida de una exponencial. La curva C presenta una fase de latencia (lag) seguida de una fase de crecimiento. La curva D ilustra el decrecimiento con el cual una inactivación rápida es seguida de por una disminución en la rapidez de eliminación (Gyürék y Finch, 1998).

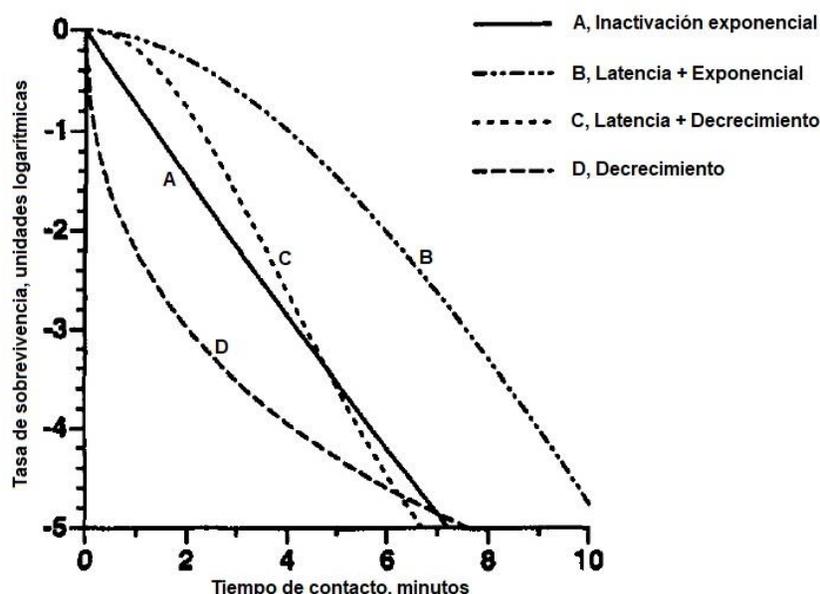


Figura 20 Curvas de sobrevivencia (adaptado de Gyürék y Finch, 1998)

Los modelos de inactivación están basados en las siguientes suposiciones: sin remezclado, dispersión uniforme de microorganismos y moléculas de desinfectante, suficiente agitación, temperatura y pH fijos, la concentración del desinfectante asegura un residual durante el tiempo de contacto. Muchos modelos se han derivado de la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dN}{dt} = -kmN^x C^n t^{m-1}$$

Dónde:

- $dN/dt$ : tasa de inactivación
- $N$ : número de microorganismos que sobreviven al tiempo de contacto  $t$
- $k$ : coeficiente de letalidad determinado experimentalmente
- $C$ : concentración del desinfectante

- $t$  es el tiempo
- $m, n$  y  $x$ : constantes empíricas (Gyürék y Finch, 1998)

En la Tabla 17 se enlistan algunos modelos de cinética de inactivación, donde se muestra la relación de sobrevivientes expresada por una función matemática y una descripción de la utilidad de los modelos.

**Tabla 17** Modelos de cinética de desinfección; (Miranda, 2005)

Modelo	Relación de sobrevivientes	Observaciones
Chick – Watson	$-kC^n t$	Cinética de primer orden cuando $n=1$ , propuesta por Chick – Watson (1998)
Hom	$-kC^n t^m$	Generalización de la ley de Chick – Watson toma en cuenta las diferentes fases de las curvas de sobrevivencia (1972). Función no lineal de C y T. Puede ajustarse a las curvas A, B, C y D. Si $m>1$ , la curva presenta una fase lag inicial, aumentando k con el tiempo. Si $m<1$ , la curva presenta un efecto de decrecimiento, disminuyendo k con el tiempo.
Racional	$-\frac{\log[1 + N_0^{x-1}(x-1)kC^n t]}{(x-1)}$	Puede describir el fenómeno de la fase lag para $x<1$ y de decrecimiento para $x>1$ (curva tipo C) (1973)
Ley de poder de Hom	$-\frac{\log[1 + N_0^{x-1}(x-1)kC^n t^m]}{(x-1)}$	Provee un mejor ajuste que los modelos anteriores para las curvas de sobrevivencia del tipo C (1996).
Selleck	$-n \log \left[ 1 + \frac{Ct}{k} \right]$	Modelo empírico, describe curvas de sobrevivencia que se observan con frecuencia durante la cloración del agua residual (curva tipo C). Los valores de $k$ y $n$ están relacionados con la razón de las dosis de cloro y nitrógeno empleados en la prueba propuesta por Selleck (1978).
Múltiples objetivos	$\log[1 - (1 - e^{-kCt})^{n_c}]$	Modelo estadístico, no adecuado para describir la cinética de inactivación microbiana. Propone que cada microorganismo tiene un total de $n_c$ objetivos críticos todos idénticos, los cuales deben ser tocados una sola vez para inactivarlo (1953)
Series de eventos	$\frac{-kCt + \ln \left[ \sum_{K=0}^{l-1} \frac{(kCt)^K}{K!} \right]}{\ln(10)}$	Modelo complicado donde se idealiza el daño que ocasiona el desinfectante a los microorganismos, suponiendo una serie de reacciones sucesivas que logran inactivar a los mismos. Aquí “ $l$ ” es el número de

Modelo	Relación de sobrevivientes	Observaciones
		reacciones letales para inactivar un microorganismo o eventos letales y $K$ es la velocidad de destrucción de algún sitio en el mismo (1975)
Múltiples series de eventos	$\log \left[ 1 - \left( 1 - e^{-kCt} \sum_{K=0}^{l-1} \frac{(kCt)^K}{K!} \right) \right]$	Basado en el modelo de serie de eventos donde supone una serie de reacciones de primer orden con respecto a la concentración por lo que se requieren “ $l$ ” eventos letales para inactivar a un organismo (1984)

La evaluación de los procesos de desinfección para inactivar bacterias en estado VNC puede llevarse a cabo de manera cuantitativa o cualitativa. Diferentes metodologías incluyendo técnicas de biología molecular (Nocker *et. al.*, 2007, Casasola *et. al.*, 2013, Orta de Velásquez *et. al.*, 2017), conteo en placa (Orta *et. al.*, 1996, Richards y Watson 2006, Nocker *et. al.*, 2007) y número más probable, NMP (Orta *et. al.*, 2008) pueden ser utilizadas para determinar cuantitativamente la eficacia de la desinfección. Así mismo, técnicas de microscopía electrónica, consiguen evidenciar cualitativamente los efectos que diferentes desinfectantes causan a nivel celular, tal y como se muestra en el estudio realizado por Orta *et. al.*, (2017).

## 2.6 Análisis de biología molecular

### 2.6.1 Tinciones

*Tinción fluorescente con DAPI.* Las células teñidas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) presentan fluorescencia azul brillante siendo fáciles de ver y enumerar. Se emplea para la enumeración de las muestras clínicas, del ambiente y de alimentos. Dependiendo de la muestra, la tinción con colorantes fluorescentes no específicos puede representar un problema, pero el DAPI, que tiñe ácidos nucleicos, no suele reaccionar con la materia inerte. Por lo tanto, para muchas muestras de suelo y agua, la tinción con DAPI proporciona una estimación razonable del número de células presente.

*Tinción de viables.* Se ha desarrollado una tinción con colorantes fluorescentes que distinguen entre células vivas y muertas. Esto proporciona información no solo del número de organismos

de una muestra sino también de su viabilidad. Esta distinción se basa en la integridad de la membrana citoplasmática celular. A la muestra se añaden dos colorantes, verde y rojo; el colorante fluorescente verde penetra en todas las células, viables o no, mientras que el rojo, que contiene yoduro de propidio, penetra solo en aquellas células cuya membrana ya no se encuentra intacta, y por tanto están muertas (Madigan *et. al.*, 2004).

### 2.6.2 Tinciones genéticas

Las sondas de ácidos nucleicos son un poderoso instrumento para identificar y cuantificar microorganismos en la naturaleza.

*Tinción filogenética FISH (fluorescent in situ hybridization).* Los colorantes filogenéticos son oligonucleótidos fluorescentes complementarios en la secuencia de base a las secuencias “signatura” en el rRNA 16S (en procariontas) o 18S (en eucariotas). Los colorantes filogenéticos penetran en la célula, donde hibridan con el rRNA directamente en los ribosomas. La FISH permite identificar o rastrear un organismo en particular (Madigan *et. al.*, 2004).

### 2.6.3 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Díaz *et. al.*, 2014).

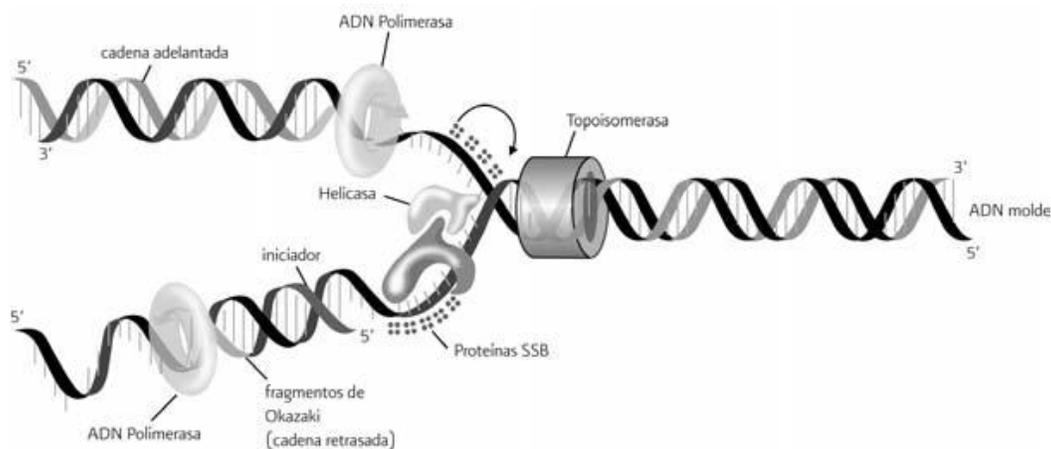
Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como:

- 1) la identificación del sitio de origen de la replicación;
- 2) el desenrollamiento de la doble hélice;
- 3) la estabilización de la estructura desenrollada;
- 4) la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora;
- 5) el avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento;
- 6) los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias;

- 7) la identificación de los sitios de terminación y
- 8) el superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN.

Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.

La PCR (Figura 21) inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96°C para romper los puentes de hidrógeno que las unen, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores (primers o cebadores) a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60°C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72°C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Las tres etapas de la PCR se repiten, las tres conforman un ciclo. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Díaz *et. al.*, 2014).



**Figura 21** Proceso de replicación de ADN  
(Díaz *et. al.*, 2014)

### 2.6.4 Electroforesis en gel

Permite separar especies químicas (ácidos nucleicos o proteínas) a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica. Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, tienen por naturaleza carga negativa. Al colocar una muestra en un gel y se aplica un campo eléctrico se produce una migración diferencial de los fragmentos a través del gel. El tamaño de los fragmentos de ADN se puede estimar al comparar con el patrón de las bandas que se obtiene de marcadores comerciales de peso molecular conocido (FIBAO, 2007).

### 2.6.5 q-PCR

El objetivo de la PCR en tiempo real es cuantificar y detectar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes. Esta técnica se refiere a la detección de productos amplificados en cada ciclo de la reacción. El producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una q-PCR (quantitative PCR); si, por lo contrario, primero obtenemos ADNc (copia derivada de un RNA) y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-q-PCR (Tamay de Dios *et. al.*, 2013).

## 2.7 Microscopía electrónica

El principio del microscopio electrónico es el mismo que un microscopio óptico sin embargo en lugar de usar luz hace uso de electrones. La resolución de un microscopio óptico es limitada por la longitud de onda de la luz comparada con la aceleración de los electrones que pueden tener longitudes de onda cortas (Alyamani y Lemine, 2012).

En un microscopio electrónico, las lentes generan campos magnéticos y no hay cambio apreciable en el índice de refracción cuando los electrones pasan a través de ellos. Además, los ángulos en los que se desvían los rayos al ser desviados por la lente son pequeños (Sorrivas *et. al.*, 2014).

Existen dos tipos de microscopio electrónico, microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM), en este tipo de microscopio el rango de voltaje de aceleración va de 10 kV a 40 kV, el espesor de la muestra no es importante, sin embargo, las muestras deben ser eléctricamente conductoras. También está el microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM), en este tipo de microscopio la transmisión de los electrones es detectada y el espesor de la muestra debe ser de 150 nm, el voltaje de aceleración es de  $\geq 100$  kV (Alyamani y Lemine, 2012).

Un microscopio electrónico (ya sea de barrido o de transmisión) está constituido, básicamente, por:

- Cañón de electrones. Responsable de la generación del haz de electrones. Debe reunir ciertos requerimientos (que produzca un alto brillo y tenga alta estabilidad).
- Lente electromagnética. Está constituida, por un cilindro anular de hierro blando (pieza polar), rodeado por una bobina de cobre. Al circular una corriente por los enrollamientos de la bobina, se genera un campo magnético en el espacio anular de la pieza polar.
- Pantalla fluorescente (Sorrivas *et. al.*, 2014).

Las fuentes de electrones pueden ser termoiónicas o de emisión de campo.

**Emisor termoiónico:** Este está constituido por un filamento (cátodo), un cilindro con una apertura central, llamado cilindro de Wehnelt que rodea al filamento y tiene un potencial ligeramente más negativo que éste. El ánodo se encuentra por debajo del cilindro de Wehnelt. Los electrones se emiten a partir de un material incandescente (termoiónica).

**Emisor de campo:** Opera mediante una reducción de la barrera de energía por un campo aplicado que permite la formación de túneles cuánticos de electrones a través de la barrera reducida hacia el vacío. Este es un proceso distinto a la emisión termoiónica. Existen dos tipos de emisores de campo: los asistidos térmicamente (también denominados Schottky) y los Emisores de campo frío, como lo implican sus nombres, los emisores asistidos térmicamente requieren calor, mientras que los de campo frío, no. Ambos necesitan la aplicación de un campo externo para extraer el haz de electrones de una punta o extremo muy pequeño (Sorrivas *et. al.*, 2014).

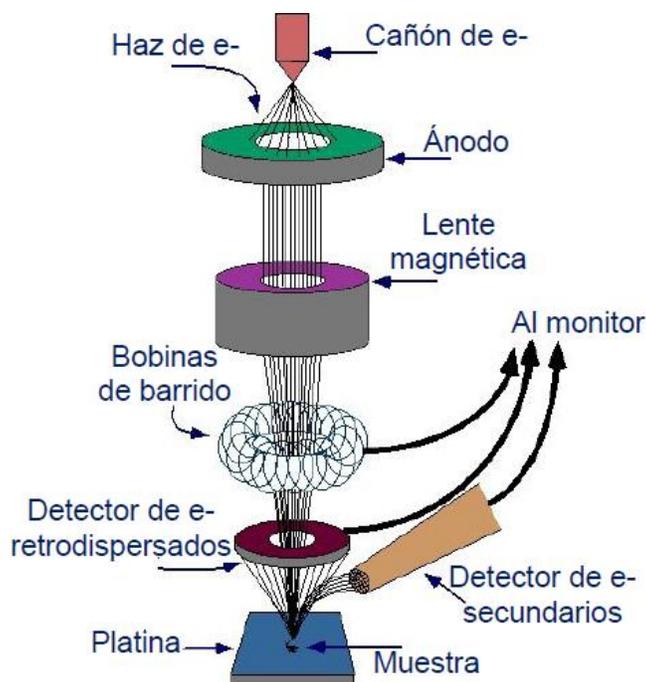
### Características principales de un microscopio electrónico

- Profundidad de campo: Rango de posiciones que puede tomar un objeto, sin que se perciban cambios en la nitidez de la imagen
- Profundidad de foco: Rango de posiciones en que puede ubicarse la imagen sin aparecer fuera de foco, para una posición fija del objeto.
- Interacción haz de electrones – muestra. El haz de electrones incide sobre un material, hay interacciones entre los electrones incidentes y los átomos que componen la muestra.
  - Dispersión (scattering). Dispersión de electrones producida por las interacciones electrón – átomos de la muestra. La probabilidad de que un electrón sufra scattering está descrita en términos de la sección transversal o bien, como el camino libre medio. Hay dos tipos de dispersión:
    - Elástica. Es un proceso en el cuál un electrón incidente, puede cambiar su dirección, sin pérdida apreciable de energía. La causa principal de este proceso es por interacciones Coulómbicas entre el electrón incidente, el núcleo y los electrones del átomo.
    - Inelástico. un electrón incidente sobre un átomo, pierde parte de su energía, pero no sufre cambios significativos en su dirección. Si la interacción inelástica tiene lugar entre el núcleo y un electrón incidente, de alta energía, éste perderá parte de su energía cinética debido al efecto de frenado que ejerce el campo coulombico del núcleo atómico. Si el electrón incidente, interactúa con un electrón del átomo las energías de ambos se distribuyen. El electrón incidente sufre una pérdida de energía, que provoca una disminución de su velocidad desviando su trayectoria en un pequeño ángulo.

Hay muchos tipos de interacciones con pérdida de energía, la cual se transfiere a los electrones o átomos de la muestra. Este tipo de scattering es el responsable del frenado de electrones observado en un sólido. Parte de la energía cinética del electrón incidente se transferirá como calor a la muestra. Una pequeña porción de la energía escapará como rayos X o como electrones secundarios (Sorrivas *et. al.*, 2014).

### 2.7.1 Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM)

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM), esquematizado en la Figura 22, tiene componentes comunes, tales como el cañón de electrones, sistema de vacío, lentes condensadora y objetivo. El haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barra la muestra punto a punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla (CRT). El barrido del haz está sincronizado con el barrido del CRT y produce una relación uno a uno entre puntos de la muestra y puntos en el CRT (Sorrivas *et. al.*, 2014). La generación de imágenes en un microscopio de barrido se realiza a partir de señales emitidas por la muestra mientras forma la imagen a medida que el haz de electrones se desplaza (barrido) sobre la superficie de la muestra (Ipohorki y Bozzano, 2013).



**Figura 22** Componentes de un microscopio SEM (Serveis Tècnics D'Investigació, 2012)

**Interacción haz de electrones – muestra en el SEM.** La interacción haz incidente-muestra produce una variedad de señales, las cuales brindan distinta información sobre la superficie de la muestra.

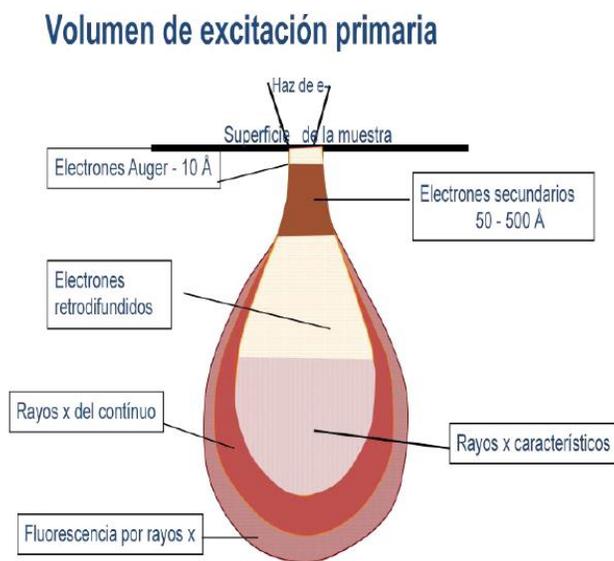
*Volumen de excitación primaria:* Cuando un haz de electrones choca contra una muestra, los electrones incidentes penetran en el material una distancia que es directamente dependiente de la energía del haz e inversamente dependiente del número atómico de los átomos que componen la muestra.

**Naturaleza de la interacción:** En el volumen de excitación primaria, ocurren interacciones que generan señales tales como: electrones secundarios, electrones retrodifundidos, rayos X característicos, electrones Auger, catodo luminiscencia.

- *Electrones secundarios:* son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas. Poseen baja energía. Brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra.
- *Electrones retrodifundidos:* provienen de las interacciones elásticas y, por lo tanto, tienen alta energía. Estos electrones tienen energías cercanas a la del haz incidente. Pueden interactuar con átomos de la muestra para generar electrones secundarios y los otros tipos de señales nombradas anteriormente. Son empleados para obtener imágenes de contraste por número atómico y contraste topográfico.
- *Rayos X característicos:* Este tipo de señal; se produce cuando un electrón de un orbital interno de un átomo es desalojado por un electrón del haz incidente. La vacancia es llenada con un electrón de un orbital más externo. En este salto el exceso de energía es liberado en forma de radiación electromagnética (rayos X).
- *Electrones Auger:* Cuando un electrón de una capa externa llena una vacancia de una capa más interna, el exceso de energía puede inducir la eyección de un electrón de una órbita externa; convirtiendo esta energía en energía cinética. Este electrón es llamado electrón Auger. Por poseer baja energía los electrones Auger pueden dar información precisa de las monocapas cercanas a la superficie. La emisión Auger es más alta en elementos de bajo número atómico debido a que los electrones están débilmente ligados al núcleo.
- *Cátodo luminiscencia:* Es la emisión de fotones en longitudes de onda en los rangos del ultravioleta, visible o infrarrojo, para disipar el exceso de energía que se genera en la

transición electrónica entre orbitales. Esta técnica permite realizar estudios de concentración de impurezas en un material (Sorrivas *et. al.*, 2014).

En la Figura 23, se observa la naturaleza de la interacción y las señales generadas, las cuales ya se explicaron anteriormente.



**Figura 23** Volumen de excitación primaria (Sorrivas *et. al.*, 2014)

Debido a la interacción que se lleve a cabo, se puede aplicar para casos específicos (Tabla 18) ya que cada señal se puede aplicar para un caso específico, dando como señal visual morfología, contrastes, composición, entre otros.

**Tabla 18** Principales señales en SEM y su aplicación (Sorrivas, *et. al.*, 2014)

<b>Interacción</b>	<b>Señal</b>	<b>Aplicación</b>
Electrón incidente / Electrón muestra	Electrones secundarios	Morfología superficial
Electrón incidente / Núcleo	Electrones retrodifundidos	Contraste por número atómico Contraste topográfico
Electrón incidente / Vacancias	Cátodo luminiscencia Rayos X característicos Electrones Auger	Concentración de impurezas Composición elemental Campos superficial
Electrón incidente o retrodifundidos / Núcleo atómico	Rayos X continuo	Señal no útil

### 2.7.2 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Se utiliza para visualizar detalles topográficos muy pequeños sobre la superficie u objetos enteros o fraccionados. Se pueden observar estructuras que pueden ser tan pequeñas como 1 nanómetro.

En un microscopio FESEM, las imágenes de la superficie de la muestra son barridas con un haz de electrones de alta energía, este tipo de electrones pueden producir 1000 veces más la emisión de un filamento de tungsteno lo que requiere condiciones de alto vacío. Los electrones se liberan de una fuente de emisión de campo y se aceleran en un gradiente de campo eléctrico elevado. Dentro de la columna de alto vacío estos llamados electrones primarios son enfocados y desviados por lentes electrónicas para producir un haz de barrido estrecho que bombardea el objeto. Como resultado, los electrones secundarios se emiten desde cada punto del objeto. El ángulo y velocidad de estos electrones secundarios se relaciona con la estructura superficial del objeto. Un detector captura los electrones secundarios y produce una señal electrónica. Esta señal se amplifica y se transforma en una imagen de exploración de vídeo que se puede ver en un monitor o en una imagen digital que se puede guardar y procesar aún más (Alyamani y Lemine, 2012, Ávalos, 2006).

#### Ventajas y desventajas

- Proporciona mayor brillo que el de filamento de tungsteno, el haz que produce es más fino por lo tanto proporciona una mayor resolución.
- Tiene un alto periodo de vida.
- Es difícil cambiar de una fuente de este tipo a otra ya que este cañón consta de dos ánodos.
- Para su operación es necesario un ultra alto vacío (por sus siglas en inglés Ultra High Vacuum, UHV) un mínimo de  $1 \times 10^{-10}$  torr, en comparación con uno de filamento de tungsteno que solo necesita  $1 \times 10^{-6}$  torr (Ávalos, 2006).

### 3 Antecedentes

La importancia de bacterias presentes en fuentes hídricas de consumo humano es un problema que ha venido adquiriendo gran interés debido a la aparición y reaparición de enfermedades transmitidas por el agua. La desinfección debe asegurar que el agua potable no presenta riesgos a la población que la consume. Sin embargo, la presencia de bacterias adaptadas o resistentes a los procesos convencionales de desinfección, como las que adquieren un estado VNC hacen más difícil la remoción de estos patógenos.

Las bacterias VNC presentan un estado celular adaptativo de supervivencia bajo condiciones ambientales desfavorables, así como tratamientos de desinfección pueden inducir el estado VNC (Tamagnini y Paraje, 2015). Las bacterias en este estado tienen importancia en la seguridad alimenticia y pública, ya que muchas especies sobreviven y persisten en alimentos procesados, leche pasteurizada, agua potable y en el ambiente (Tamagnini y Paraje, 2015). El número de especies que presentan el estado VNC constantemente incrementa, teniendo 60 patógenos reportados por (Oliver, 2005) entre los cuales se encuentra *V. cholerae*.

Existen estudios sobre la inducción a un estado VNC de la bacteria *V. cholerae* respondiendo a ciertas condiciones ambientales. Dichos estudios datan de la década de los 80, los cuales establecen un precedente de la importancia de *V. cholerae* a lo largo del tiempo. Algunos de estos estudios involucran al de Singleton *et. al.* (1982), quién probó que a salinidad estuarina de 25 g/L y temperatura de 10°C, *V. cholerae* fue cultivable por 4 días. Otro estudio de este investigador Singleton *et. al.* (1982) encontró altas tasas de crecimiento a salinidad moderada, teniendo máxima respuesta de crecimiento a concentraciones de 25 a 35 g/L. Baker, *et. al.* (1983) probó la inducción de la bacteria a un estado VNC en agua de mar artificial a una salinidad de 24 g/L, encontrando que la inducción se llevó a cabo en 75 días, y la célula mostraba regiones de transparencia de electrones, es decir la región nuclear se comprimió en el centro de la célula rodeada por el citoplasma y al usar microscopía electrónica las regiones “vacías” se mostraban transparentes con la incidencia de los electrones. Tamplin y Colwell (1986) estudiaron la toxina colérica, encontrando que a menor concentración de nutrientes orgánicos hay mayor concentración de la toxina a salinidades de 20 a 25 g/L, la concentración de toxina aumenta con la salinidad independientemente de la concentración celular y la

estabilidad de las toxinas, concluyendo que los parámetros fisicoquímicos no solo afectan el estado fisiológico de la bacteria, también su patogenicidad potencial. Hood *et. al.* (1986) inoculó la bacteria a una concentración de  $10^7$  células/mL en sales básicas a  $22^\circ\text{C}$ , observó el cambio morfológico por microscopía TEM (microscopía electrónica de transmisión). A los 30 días observó células cocoides y que alrededor del 90% habían perdido su volumen original. Hubo pérdida de la integridad distintiva de tres capas de la membrana externa, la región nuclear se comprimió en el centro de la célula rodeada por citoplasma. McCarthy (1995) probó la inducción en agua marina a una concentración de  $4 \log_{10}$  UFC/mL, a tres diferentes salinidades (8, 16 y 32 ppm), tres diferentes temperaturas (6, 18 y  $30^\circ\text{C}$ ) para tres diferentes sepas de *V. cholerae*. Encontró que la inducción se lleva a los 40 días a  $6^\circ\text{C}$  y 32 ppm de salinidad (se cita este dato por ser parecido al del presente trabajo), concluyendo que a menor temperatura y baja salinidad hay mayor sobrevivencia, es decir no hay una gran cantidad de bacterias que se inducen al VNC. Wai, *et. al.* (1996) encontró que usando una sal M9 o un búfer PBS a  $15^\circ\text{C}$  incubando por tres meses sin agitación se obtiene una reducción de la culturabilidad del  $7 \log_{10}$ .

Estudios más recientes, también han experimentado con la inducción de *V. cholerae*, por ejemplo, Chaiyanan *et. al.* (2001) probó la inducción en agua de mar artificial a  $4^\circ\text{C}$  y observó el cambio morfológico por medio de microscopía SEM (microscopía electrónica de barrido) y TEM, hasta los 6 meses se observó gran cantidad de cocos, entre las observaciones de cambio morfológico se encontró la compresión de la región nuclear rodeada de un denso citoplasma. González-Escalona, *et. al.* (2006), llevó a cabo la inducción en agua de mar artificial con una concentración de  $10^8$  células/mL a dos temperaturas;  $4$  y  $15^\circ\text{C}$ , para ambas temperaturas la inducción total se dio al día 9, entre algunas de sus observaciones destacan que en las primeras 24 horas hubo pérdida de cultivo de  $1 \log_{10}$  para la temperatura de  $4^\circ\text{C}$  y de  $2 \log_{10}$  para  $15^\circ\text{C}$ . Vital, *et. al.* (2007) estudió el efecto de la salinidad y encontró que a concentraciones de 5 g/L hay mayor conteo de células y a salinidades de 30 g/L hay menor crecimiento, es decir hay mayor pérdida en la capacidad de cultivo a altas salinidades. Chaiyanan *et. al.* (2007) monitoreó la inducción de *V. cholerae* por dos años por medio de microscopía TEM, observando que en 60 días se dio la transformación a cocoide, los cocos tenían diámetro de  $0.07 \mu\text{m}$  a  $0.4 \mu\text{m}$ , en este estudio también se experimentó con la resucitación calentando a  $45^\circ\text{C}$  por un minuto, se observó que la bacteria se hizo más grande respecto al coco original, y se observó división celular. Mishra *et. al.* (2012) probó la inducción de *V. cholerae* en agua dulce, a  $4^\circ\text{C}$  y a condiciones de inanición, se observó que en el día 16

la bacteria presentaba las morfologías cocoide, rugosa y VNC. En cuanto a la integridad de la membrana se observó que 86% y 65% de las células la retenían a los días 16 y 23 respectivamente mientras no había crecimiento en los medios de cultivo. Se observó el fenómeno de 'redondeo', ya que las células normales se sometieron a un proceso de enanismo. Las colonias disminuyeron progresivamente en tamaño, perdieron su brillo y se volvieron rugosas a partir del día 7 en adelante en agar TSA. Se obtuvieron resultados en cuanto a la disminución de culturabilidad y de viabilidad, que fue de  $8 \log_{10}$  y  $3 \log_{10}$ , respectivamente. Las células O1 de *Vibrio cholerae* se volvieron no cultivables el día 23 en nuestras muestras de agua dulce, y no se pudo demostrar ninguna célula viable después del día 30.

En cuanto a la desinfección, se han estudiado varios microorganismos, entre los que se pueden citar la desinfección para *E. coli* por cavitación mecánica (Mezule *et. al.* 2014); *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* estudio en el cual se analizó si la luz UV induce el estado VNC en las bacterias de interés (Shenghua *et. al.* 2015).

En el caso de desinfectantes químicos los más usados son el cloro y ozono, en bacterias como *Burkholderia pseudomallei*, *E. coli*, *Legionella beliardensis* se ha realizado desinfección con cloro (Howard e Inglis, 2003; LeDantec *et. al.*, 2001), y para *Salmonella enterica* se utilizó calor, acidificación y cloración (Scher, 2004), en el caso de *Legionella pneumophila* se hizo uso de cloro y técnicas moleculares para determinar la eficiencia de la desinfección (Dusserre *et. al.*, 2008), para *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* se hizo uso del cloro y como técnicas de cuantificación se utilizó cuenta en placa, PMA y PCR (Nocker *et. al.*, 2007).

Orta, *et al* (1996), llevaron a cabo pruebas de adaptación de la bacteria *V. cholerae* VC en agua clorada a las dosis letales y posterior se realizó la desinfección con cloro y ozono, el método de cuantificación se utilizó la cuenta en placa. Los resultados observados fueron: en la desinfección con ozono se encontró que a concentraciones de 50 mg/L se obtienen 3.4, 5 y 6 logaritmos de inactivación a los tiempos de 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. Mientras a 45 mg/L se obtuvieron valores menores de inactivación; 0.8, 6, 6 a los mismos tiempos. En la desinfección con cloro, a los tiempos de 25, 30 y 35 minutos se obtuvieron los siguientes logaritmos de inactivación: 30 mg/L de cloro: 0.2, 2.3 y 3.7, respectivamente y; 40 mg/L de cloro: 1.8, 4.5 y 6, respectivamente.

Chaiyanan *et. al.* (2001), realizaron la desinfección con cloro, sulfato de cobre, sulfato de zinc y formaldehído, con la bacteria *V. cholerae* O1 y O139 en estado VNC a diferentes tiempos de inducción del microcosmos en que se transformó la bacteria a VNC, que fue de células activas (se considera como blanco o control), microcosmos de 2 meses y microcosmos de 1 año. Para todos los desinfectantes usados y para todos los microcosmos, se midió la viabilidad de las células por medio de ensayos de CTC para comprobar la inhibición de la respiración. Para el caso de cloro y el microcosmos de 2 meses, se observó que a concentraciones de 1 mg/L hay una disminución del 25% de células viables e incrementa conforme la concentración de cloro aumenta, otras concentraciones usadas fueron de 5 y 10 mg/L, la disminución de células viables fue del 64 y 90% respectivamente, esto para *V. cholerae* O1; para *V. cholerae* O139, a 1, 5 y 10 mg/L la disminución de células viables fue de 30, 40 y 80% respectivamente. En cuanto al microcosmos de 1 año para *V. cholerae* O1 a 1, 5 y 10 mg/L fue de 6, 65 y 70% respectivamente y para *V. cholerae* O139 a 1, 5 y 10 mg/L fue de 8, 60 y 68% respectivamente. Se observa que a un microcosmos con mayor antigüedad las células se vuelven más resistentes al proceso de desinfección. Esta tendencia fue similar para el resto de los desinfectantes probados.

Richards y Watson (2006) realizaron desinfección con cloro sobre *V. cholerae* y como método de cuantificación se utilizó cuenta en placa debido a que se usó la bacteria en estado VC, teniendo como resultados una inactivación total después de un tiempo de contacto de 5 minutos.

Orta, *et. al.* (2008) utilizaron *V. cholerae* VC de dos fuentes: aislamiento de agua residual y cultivo puro. El desinfectante usado fue ozono y la cuantificación de la inactivación se realizó por las técnicas del número más probable (NPM) y filtro de membrana. Se observó que después de 15 minutos de tiempo de contacto hay <1 NMP/100 mL.

En 2012, Wennberg *et al*, estudiaron el efecto que tiene el agua tratada en el crecimiento potencial de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* ambas en estado VC, en agua de mar, para este estudio se realizó un tratamiento previo al agua de mar. Este tratamiento constó de una filtración seguida de una cloración u ozonización. Las bacterias se inocularon en el agua tratada y sin tratar. La cuantificación del crecimiento se realizó con q-PCR. Los resultados mostraron que no había crecimiento en el agua sin tratamiento, ya que debido a la presencia de

otros microorganismos que mantienen un balance en los niveles de nutrientes, es decir, estos microorganismos nativos del agua de mar no permiten la proliferación de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* debido a que consumen los nutrientes y las cepas de *Vibrio* no pueden aprovecharlos. En cuanto al agua con previo tratamiento se observa que las bacterias crecen en mayor cantidad en el agua tratada con ozono. Esto demuestra la efectividad de los desinfectantes en la inactivación de microorganismos, sin embargo, también evidencia la capacidad de crecimiento de patógenos en agua que ya se ha tratado y que puede llegar contaminada al consumidor.

En cuanto a trabajos realizados con la bacteria *V. cholerae* en estado VNC en procesos de desinfección con cloro y ozono, hay pocos reportes; otras bacterias que se han estudiado son *Helicobacter pylori*, la cual se ha hecho la inducción a VNC, usando técnicas moleculares y de microscopía electrónica, que están de acuerdo a lo que se pretende realizar en el presente trabajo; algunos trabajos involucran los siguientes:

Casasola, *et. al.* (2013), realizó la desinfección con *H. pylori* VNC con ozono, utilizando como técnica de cuantificación la q-PCR. Se utilizaron valores de Ct de 0.11, 0.58, 1.16, 1.75, 4.08, 4.67 y 15 mg min L<sup>-1</sup> obteniendo porcentajes de inactivación de 89, 93, 99,80, 99,94, 99.95, 99.956 y 99.988% respectivamente, observándose que al Ct mayor probado se alcanza una inactivación igual a 3.921 log<sub>10</sub>, en este trabajo se tuvo como objetivo probar que q-PCR es una técnica adecuada para cuantificar la eficiencia de la desinfección con ozono.

Orta de Velásquez, *et. al.* (2017), realizaron trabajos de desinfección con la bacteria *H. pylori* en estado VNC, utilizando como desinfectantes cloro y ozono, e hizo uso de PCR y microscopía electrónica FESEM como métodos de cuantificación. En cuanto a la desinfección en análisis de PCR para el cloro se alcanza inactivaciones de 3.27 a 5.13 log, para los Ct de 5 a 20 mg min L<sup>-1</sup>. Para ozono los logaritmos de inactivación comprenden de 4.35 a 5.38 para Ct que engloban 3 al 10 mg min L<sup>-1</sup>. Para microscopía FESEM se observó que para el cloro que un Ct de 20 mg min L<sup>-1</sup> se observan algunas células de *H. pylori* en estado VNC, y hay formación de grupos de cocoides a 1, 1.5 y 2 mg/L de cloro a tiempos de 5 y 10 minutos. Para ozono se observa que las células tienen un cambio en la morfología ya que hay presencia de vesículas de membrana externa. Esto sugiere que el ozono causa la lisis celular y la subsecuente muerte de *H. pylori*.

Casasola (2018), realizó la desinfección con cloro y ozono para la bacteria *V. cholerae* y *H. pylori* en sus estados viable cultivable (VC) y VNC. Para el caso de la desinfección de *H. pylori* VC con ozono, los valores de Ct probados fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 1.5 y 3 min mg L<sup>-1</sup>, los porcentajes de inactivación fueron de 99.10, 99.91, 99.92, 99.92 y 99.92% respectivamente, para el caso de la forma VNC los valores de Ct probados fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 1.5 y 3 min mg L<sup>-1</sup>, los porcentajes de inactivación fueron de 96.02, 99.84, 99.87, 99.90 y 99.95% respectivamente. Para *H. pylori* se observa que la bacteria en estado VNC tiene una mayor resistencia por lo que los porcentajes de inactivación son más bajos si se comparan con la forma VC. Para la misma bacteria pero con cloro se obtuvo que para la forma VNC a valores de Ct de 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 y 10 min mg L<sup>-1</sup>, se tienen porcentajes de inactivación de 97.82, 97.85, 98.43, 99.98 y 99.99% respectivamente y para la forma VC a valores de Ct de 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 y 10 min mg L<sup>-1</sup>, se tienen porcentajes de inactivación de 99.66, 99.77, 99.76, 99.99 y 99.99% respectivamente, observándose la misma tendencia que para el ozono, que la forma VNC es más resistente que la forma VC. En cuanto a la bacteria *V. cholerae* se obtuvo para el desinfectante ozono los Ct usados fueron de 0.5, 1.0, 1.5, 7.5 y 18 min mg L<sup>-1</sup>, los porcentajes de inactivación quedaron como 81.36, 98.67, 99.53, 99.84 y 99.99% respectivamente esto para la bacteria en estado VNC, para la forma VC los Ct usados fueron de 0.5, 1.0, 1.5, 7.5 y 18 min mg L<sup>-1</sup> los porcentajes de inactivación fueron de 99.48, 99.55, 99.70, 99.86 y 99.99% respectivamente. Para el cloro se usaron los valores de Ct 2, 4, 10, 15 y 30 mg min L<sup>-1</sup>, para la forma VNC los porcentajes de inactivación fueron de 93.40, 99.43, 99.41, 99.96 y 99.97% respectivamente y para la forma VC fueron de 99.81, 99.98, 100, 100 y 100% respectivamente para cada valor de Ct. Al igual que para *H. pylori* la forma VNC es más resistente que la forma VC, por lo que el estado VNC requiere dosis y tiempos de contactos más altos para lograr una alta inactivación de los microorganismos.

También se han realizado experimentos de desinfección con la variante rugosa de *V. cholerae*, como el hecho por Venczel, *et al* (2004), que usaron como desinfectante hipoclorito de sodio obteniendo una reducción de 4 logaritmos.

En estos trabajos se observa que se han usado diferentes cepas de la bacteria *V. cholerae* y de otras bacterias, bajo condiciones muy distintas, en cuanto a los métodos de análisis o cuantificación se basan en la capacidad de cultivo de la bacteria y la realización de contar por medio de placas. Para el caso de bacterias en estado VNC, se hace uso de q-PCR para poder

realizar conteo de la inactivación de las células. En cuanto a los resultados, los trabajos reportan una inactivación considerablemente alta, tanto con cloro como con ozono.

De acuerdo con los estudios citados no se observa que alguno haya trabajado con la bacteria *V. cholerae* en su estado VNC, el cual presenta mayor resistencia a la desinfección y del cual se ha reportado su presencia en ambientes acuáticos (Fernández y Alonso, 2009). Tampoco se ha encontrado que se utilice la microscopía electrónica FESEM para evaluar el daño que sufre la bacteria en el proceso de desinfección o la resistencia que pueda generar. El único trabajo que combina las pruebas moleculares con microscopía electrónica para una bacteria en un estado metabólico resistente es el caso de la desinfección de *H. pylori* con cloro y ozono (Orta *et al*, 2017), sin embargo, para la bacteria que es de interés en este trabajo no hay reporte de desinfección que indique el uso de las metodologías ya mencionadas. Por eso la importancia de este trabajo de tesis, en el cual, se probará la desinfección de la bacteria *V. cholerae* VNC – utilizando cloro y ozono como desinfectantes individuales – uso de q-PCR para determinar la eficiencia de la desinfección (logaritmos inactivados durante el proceso) y para obtención de las cinéticas de desinfección para cada desinfectante – uso de microscopía FESEM para observación del daño que los desinfectantes causan a la bacteria.

## 4 Hipótesis y objetivos

### 4.1 Hipótesis

Los desinfectantes como cloro y ozono causan daños sobre las bacterias, sin embargo, debido al alto poder oxidativo del ozono, éste causará mayores daños estructurales y mayor inactivación de la bacteria *V. cholerae* en su estado VNC.

### 4.2 Objetivo general

Inactivar mediante cloro y ozono la bacteria *Vibrio cholerae* en su estado viable no cultivable evaluando por microscopía electrónica (Field Emission Scanning Electron Microscopy FESEM por sus siglas en inglés) el daño que los desinfectantes causan a la ultraestructura de la bacteria.

#### 4.2.1 Objetivos específicos

1. Promover la inducción del estado viable al viable no cultivable de la bacteria *V. cholerae* mediante exposición en agua marina a 4°C, observando el cambio morfológico durante el proceso de transformación utilizando FESEM.
2. Establecer las dosis y tiempos de contacto (Ct) requeridos para la inactivación de *V. cholerae* en estado VNC en agua utilizando cloro y ozono como desinfectantes.
3. Evaluar la eficacia del cloro y el ozono como procesos de desinfección para inactivar *V. cholerae* en estado VNC mediante la técnica de biología molecular q-PCR-PMA obtener las constantes cinéticas de ambos procesos.
4. Evaluar el daño que el ozono y el cloro causan en la ultraestructura celular de *V. cholerae* en estado VNC mediante la observación por microscopía electrónica FESEM, antes y después del proceso de desinfección.

## 5 Metodología

Para inactivar la bacteria *V. cholerae* en estado VNC y evaluar el daño en su ultraestructura celular, dos desinfectantes, ozono y cloro, comúnmente usados para la potabilización del agua, fueron aplicados probando diferentes valores de Ct. Inicialmente se indujo el estado VNC de la bacteria, al cual se le dio seguimiento mediante microscopía óptica y electrónica FESEM. Una vez conseguido dicho estado se aplicaron los procesos de desinfección con ozono y cloro, y se evaluó su eficacia mediante el cálculo de la inactivación de las células usando la técnica de q-PCR-PMA. Para cada condición evaluada, se obtuvieron micrografías electrónicas para observar el daño ocasionado. Cada una de estas actividades se ejemplifican en el diagrama general que se presenta en la Figura 24.

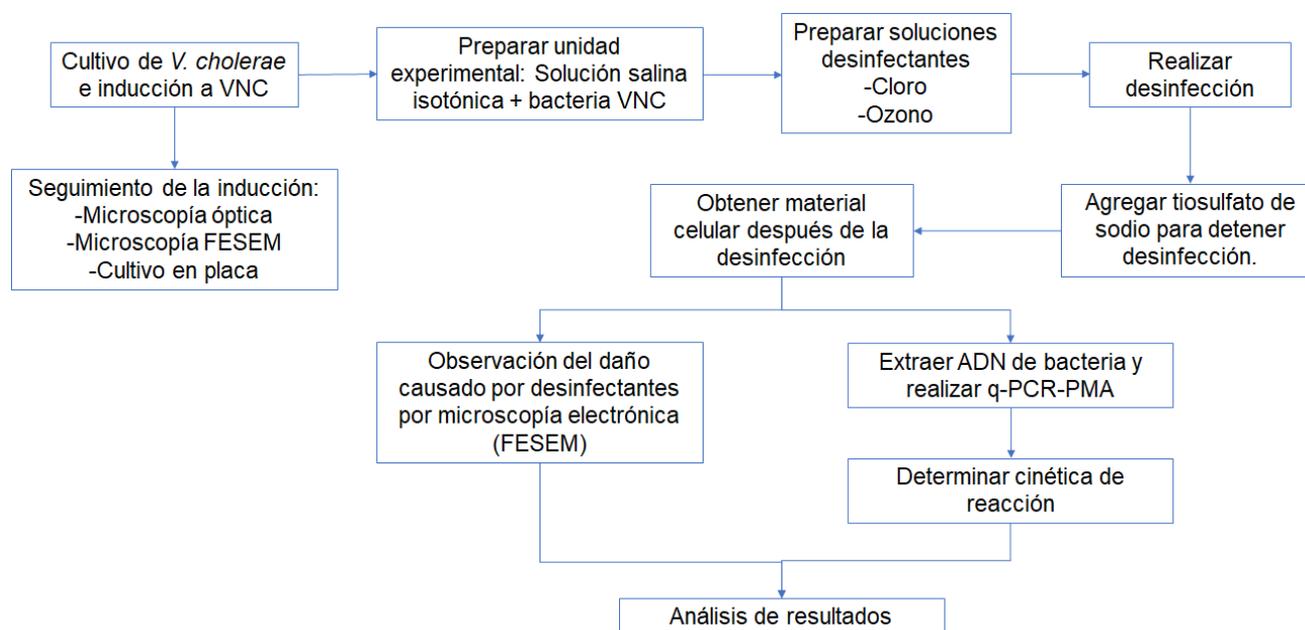


Figura 24 Diagrama general de la metodología

### 5.1 Cultivo de *V. cholerae* e inducción al estado VNC

Para la experimentación se utilizó una cepa de *V. cholerae* O1 Ogawa el Tor en estado viable cultivable, la cual fue proporcionada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

“Salvador Zubirán” (INCMNSZ) de la Ciudad de México. La cepa de *V. cholerae* fue recuperada a partir de agar tubo inclinado mediante su cultivo en placa con agar Carnero por sembrado en estría, incubándola a 37°C por 24 horas, esto con el fin de obtener colonias aisladas. Se tomó una de las colonias aisladas y se inoculó en 50 mL de caldo Luria – Bertani (LB), se dejó crecer a temperatura ambiente por 24 horas. De este cultivo se tomaron 100  $\mu$ L y se adicionaron a 50 mL de caldo LB, se incubó por tres horas, a 37°C, con agitación a 200 rpm, en una incubadora Innova™ 40000 incubator shaker. Durante esta incubación se dio seguimiento al crecimiento exponencial de la bacteria, para ello se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro BIO-RAD Smart Spect™ 3000 (Figura 25), a 600 nm, en intervalos de tiempo de 0, 120, 150, 165 y 175 minutos, hasta obtener una absorbancia aproximada de 0.6. El blanco utilizado para este seguimiento fue el caldo LB sin inóculo.



**Figura 25** Espectrofotómetro BIO-RAD Smart Spect™ 3000

La bacteria cosechada en el caldo LB se colocó en un tubo Corning de 50 mL y se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadió agua de mar artificial (artificial sea water, ASW) estéril (ver preparación en el anexo A1), se homogenizó con un vórtex y se realizó una nueva centrifugación bajo las condiciones ya descritas anteriormente; siendo este el primer lavado. En total se realizaron dos lavados con ASW.

Posterior a los dos lavados se adicionaron 6 mL de ASW, se homogenizó y se tomaron 1000  $\mu$ L, los cuales se depositaron en una botella de incubación de vidrio; y se adicionó ASW hasta completar un volumen de 50 mL. A esta solución bacteriana se le midió la densidad óptica, usando como blanco la solución ASW sin inóculo. A partir de esta solución bacteriana se dio

inicio a la inducción del estado VNC, conservándola a 4°C. La supervisión y verificación de la inducción de *V. cholerae* a su estado VNC se realizó mediante tres medidas de control: pérdida de cultivo por siembra en placa con agar soya tripticasa (TSA), cambios morfológicos por microscopía óptica aplicando tinción de Gram y su observación detallada a nivel celular por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

En la Figura 26 se muestra un diagrama de flujo con el resumen de la metodología seguida para el cultivo y la inducción a un estado VNC de *V. cholerae*.

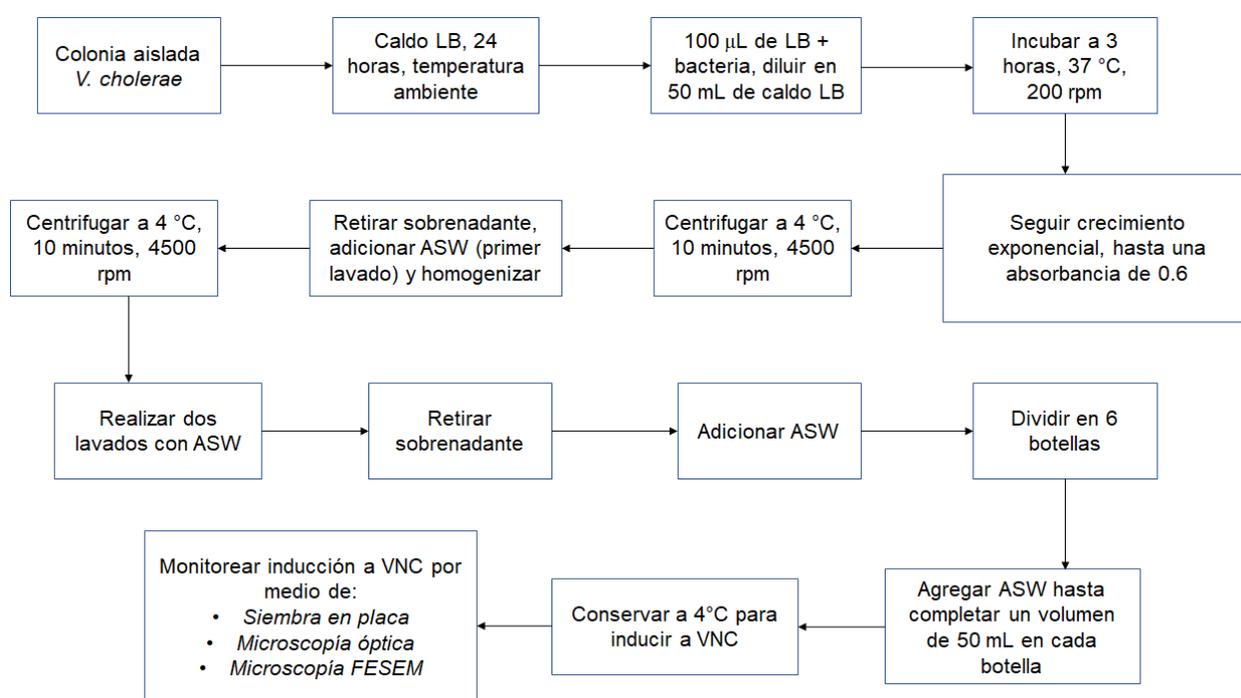


Figura 26 Cultivo de *V. cholerae*

### 5.2.1 Supervisión de la pérdida de cultivo por siembra en placa

La siembra se realizó para verificar la pérdida de cultivo que tiene la bacteria cuando se somete a condiciones de estrés. De la solución bacteriana se tomaron 250 µL y se depositaron en una placa de agar TSA, con el asa de siembra se extendió por toda la superficie de la placa (spread plate method). Las placas de TSA sembradas con *V. cholerae* se incubaron a 37°C por 24 horas. La siembra se realizó cada tres días, hasta que se confirmó la pérdida en la capacidad de cultivo.

Para verificar la pureza del cultivo en la solución bacteriana y comprobar que las colonias formadas en el agar TSA correspondían a *V. cholerae*, se realizó la resiembra de las colonias de agar TSA a agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) el cual es un medio selectivo que permite el crecimiento de *V. cholerae*. en este medio, las colonias características de la bacteria son color amarillo, pequeñas aproximadamente de 2 a 3 mm de diámetro, viscosas y convexas, y teniendo un cambio de color del agar TCBS de verde a amarillo. Las placas de agar TCBS se incubaron a 37°C por 24 horas, este control se realizó cada semana.

### 5.2.2 Microscopía óptica

El objetivo de realizar tinción de Gram fue la observación del cambio morfológico de bacilo a cocoide al que se somete la bacteria *V. cholerae* al estar en el ASW conservado a 4°C, para posteriormente observar en el microscopio óptico (Carl Zeiss Microscopie Axio Lab.A1), esto como un método rápido de verificación del cambio que la bacteria experimenta. El cambio morfológico fue verificado diariamente por tinción Gram, también se realizó la observación del cambio morfológico por medio de microscopía electrónica FESEM (explicada más adelante).

### 5.3 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos determinados fueron sólidos disueltos totales (SDT), pH, conductividad y salinidad (ésta determinada a partir de la medición del contenido en peso de las sales usadas en la preparación del ASW). Esto se midió con un potenciómetro TermoScientific Orion Star A211 (Figura 27), y un Kit multiparámetros Oakton PCD650 (Figura 28). Estos parámetros fisicoquímicos se determinaron para el ASW ya que, debido a las características del medio acuoso, *V. cholerae* se puede adaptar a VNC.



**Figura 27** Potenciómetro ThermoScientific Orion Star A211



**Figura 28** Kit multiparámetros Oakton PCD650

En cuanto a las soluciones desinfectantes, se midió el pH para poder determinar qué tipo de radical predominaba en cada solución desinfectante. En el caso de cloro las especies ácido – base que pueden presentarse son HClO (pH ácido) o OCl<sup>-</sup> (pH básico). En el caso de ozono a pH básico predomina el radical libre OH<sup>•</sup>. Esto para verificar cuál es el mecanismo de acción de cada desinfectante por medio del radical libre que actúa.

## 5.4 Desinfección

### ***Preparación de la muestra***

La preparación de la muestra para la desinfección consistió en centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos la solución bacteriana contenida en el ASW y confirmada en estado VNC (por los controles ya descritos); el pellet formado se suspendió en solución salina isotónica, SSI (preparación de esta solución ver anexo A2). Para q-PCR-PMA la solución bacteriana quedó en una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> células/mL (dosis infectiva reportada por Percival *et. al.*, 2004; Duncan y Nigel, 2003). Para las pruebas de FESEM, la solución bacteriana quedó más concentrada, aproximadamente 9x10<sup>8</sup> células/mL (tres en escala de McFarland), esto

debido a que, para microscopía electrónica se necesita la formación de un pellet con volumen adecuado para su manipulación.

#### 5.4.1 Desinfección con cloro y ozono

Las actividades realizadas para la desinfección con cloro y ozono son: preparación de las soluciones desinfectantes, determinación de la demanda inmediata y proceso de desinfección.

##### *Preparación soluciones desinfectantes*

##### **5.4.1.1 Cloro**

Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{NaClO}$  (J.T. Baker, lote K32C28) y se agregó a un matraz aforado de 100 mL, aforando con agua destilada. Para conocer la cantidad de cloro residual en la solución madre (1.36 mg/L), la determinación se realizó con un equipo colorimétrico, que utiliza el reactivo DPD (dietil-p-fenilendiamina) el cual da una coloración rosada en presencia de cloro residual. Esta determinación se realizó en un equipo Hach Pocket Colorimeter™ II (Figura 29).



**Figura 29** Equipo medición cloro Hach

##### **Determinación de la demanda inmediata de cloro**

La demanda inmediata de cloro para el proceso de desinfección se determinó como sigue: en un vaso de precipitados se colocó una alícuota de la solución bacteriana (concentración de  $10^6$  células/mL), y se agregó la solución desinfectante, se dejó el tiempo de contacto necesario, como se indica en la Tabla 19. Terminado el tiempo de contacto, el contenido del vaso de precipitados se vertió en la celda para medición de cloro residual y se añadió el contenido de la

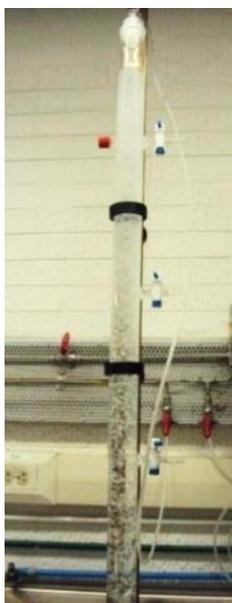
almohadilla de reactivo DPD para determinación de cloro libre, se midió el cloro residual en el equipo Hach.

**Tabla 19** Tiempos de contacto para el desinfectante cloro

	Desinfectante
	Cloro
<b>Tiempo de contacto (min)</b>	0
	3
	3.5
	15
	20
	30

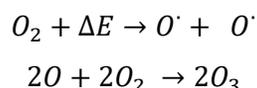
#### 5.4.1.2 Ozono

La solución saturada de ozono se preparó burbujeando ozono gas en una columna de vidrio con capacidad de 2 L, con dimensiones de 110 cm de altura por 5.5 cm de diámetro interno (Figura 30). Las condiciones experimentales del gas ozono utilizado fueron: flujo de 0.7 L/min, amperaje de 0.625 A, y concentración de ozono en la corriente gaseosa de 21.69 mg/L (determinado por el método yodométrico que se explica más adelante).



**Figura 30** Columna de vidrio

El gas de alimentación se compone de una corriente de oxígeno enriquecido, el cual se obtiene al pasar aire del medio ambiente a través de un separador que concentra el oxígeno hasta en un 80% (v/v). El ozono se produce haciendo pasar el gas de alimentación a través de un sistema de corona de descarga en donde se aplica corriente eléctrica y las moléculas de oxígeno son disociadas para producir ozono, de acuerdo con la siguiente reacción:

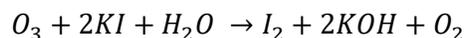


Debido a que el ozono se descompone al aumentar la temperatura, el equipo cuenta con un sistema de enfriamiento que usa agua como refrigerante, además de que el generador de ozono cuenta con controladores de voltaje, flujo de gas y presión.

El ozono gas se transfiere al agua con un disco difusor con diámetro de poro de 10 – 15  $\mu\text{m}$ , el difusor se encuentra dentro de la columna en la parte inferior. Debido a que no hay una transferencia de ozono al agua 100% eficiente, el ozono que no se transfiera al agua se destruye en una unidad catalítica (PCI OZONE & CONTROL SYSTEMS INC, 1Fairfield Crescent, West alwell NJ 07006) que libera a la atmósfera el  $O_3$  excedente como oxígeno.

Para la determinación de la concentración de ozono en la corriente gaseosa, se utilizó el método yodométrico (Birsall *et. al.*, 1952). En un lavador de gases (Figura 31) se colocaron 200 mL de yoduro de potasio (ver preparación de esta solución en el anexo A3), y se burbujeó la corriente de ozono en fase gas por dos minutos. Pasado el tiempo de burbujeo, se retiró el lavador de gases y se adicionaron 10 mL de  $H_2SO_4$  1N (ver anexo A4 para preparación de esta solución). Posteriormente se titula con tiosulfato de sodio 0.1N (este reactivo ya está valorado y estandarizado), esta titulación se muestra en la Figura 32. Las reacciones de redox son las siguientes:

Reacción del ozono con el yoduro de potasio



Titulación del yodo con el tiosulfato de sodio

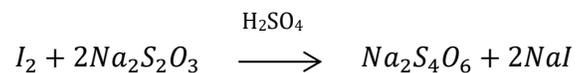


Figura 31 Lavador de gases

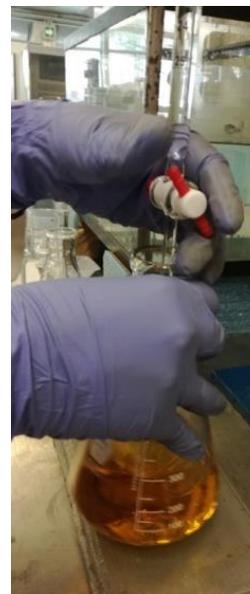


Figura 32 Titulación de yoduro de potasio

La ecuación para calcular la concentración de ozono en fase gas es:

$$C_g = \frac{TN24}{V_{gas}}$$

Dónde:

- $C_g$ . Es la concentración de ozono en la fase gas
- T. Los mililitros de tiosulfato de sodio utilizados en la titulación
- N. Es la normalidad del tiosulfato de sodio (0.1 N)
- 24. Factor de corrección (1mL de tiosulfato de sodio equivale a 24 mg de ozono)
- $V_{gas}$ . Volumen de gas burbujeado al yoduro de potasio y capturado en el lavador de gases.

En la Figura 33 se muestra el diagrama de flujo de proceso que sigue se sigue para saturar el agua con gas ozono.

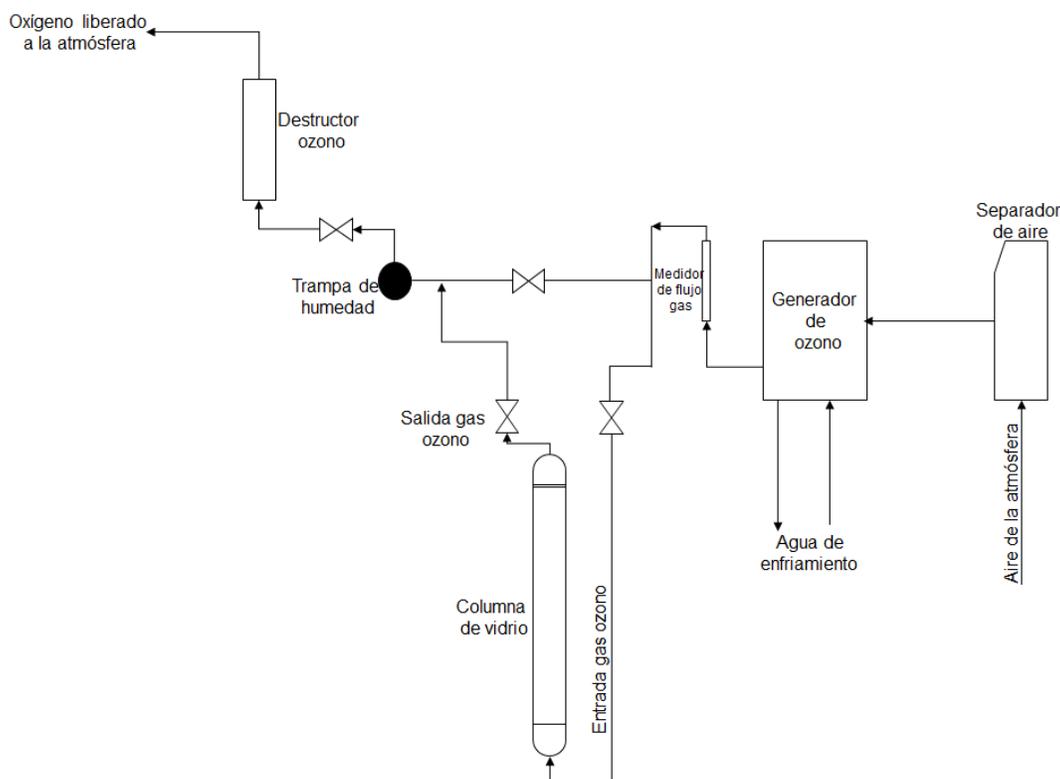


Figura 33 Diagrama de proceso de ozonización

### Estabilidad y vida media del ozono

El fin de determinar la vida media del ozono en agua es la de conocer la capacidad de retención del ozono en el agua, ya que el ozono con el aumento del tiempo y la temperatura se transforma en oxígeno, por ende, la concentración de ozono en fase líquida disminuirá conforme aumente el tiempo de contacto en el proceso de desinfección.

Para determinar la concentración de ozono, se burbujeó por 20 minutos el ozono en fase gas al agua destilada (refrigerada previamente a una temperatura entre 5 y 7°C) contenida en la columna de vidrio, pasado el tiempo se tomaron 200 mL en un vaso de precipitados y de esta muestra se tomaron alícuotas de 10 mL, a los tiempos 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20, 25 y 30 minutos. Cada alícuota se agregó a un matraz aforado de 100 mL. A este matraz se añadieron también 10 mL de solución de índigo II (ver anexo A5 para ver preparación de esta solución) y se aforó con agua destilada. De esta solución aforada se tomaron 10 mL para llenar las celdas

de vidrio y se colocó en un espectrofotómetro marca Hach (Figura 34), el parámetro a medir es la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Para conocer la concentración de ozono residual en el agua se utiliza la siguiente ecuación:

$$Cr = \frac{(A_b - A_m)100}{0.42(V_m)C}$$

Dónde:

- Cr Concentración residual del ozono (mg/L)
- $A_b$  Absorbancia del blanco
- $A_m$  Absorbancia de la muestra
- 0.42 Factor de sensibilidad de 20000/cm para el cambio de absorbancia (600 nm) por mol de ozono añadido
- $V_m$  Volumen de la muestra (mL)
- C Recorrido de la celda, 2.54 cm



Figura 34 Espectrofotómetro Hach

### **Demanda inmediata de ozono**

La demanda inmediata de ozono para el proceso de desinfección se determinó como sigue: en un vaso de precipitados se colocó una alícuota de la solución bacteriana (concentración  $10^6$  células/mL), y se agregó la solución desinfectante, se dejó el tiempo de contacto necesario, como se indica en la Tabla 20.

**Tabla 20** Tiempos de contacto para el desinfectante ozono

	Desinfectante
	Ozono
<b>Tiempo de contacto (min)</b>	0
	1
	1
	3
	7.5
	18

Terminado el tiempo de contacto, se tomaron 10 mL de la mezcla de desinfección y se agregaron 10 mL de índigo II y se procedió a leer en el espectrofotómetro Hach a una longitud de onda de 600 nm.

#### ***Proceso de desinfección con cloro y ozono***

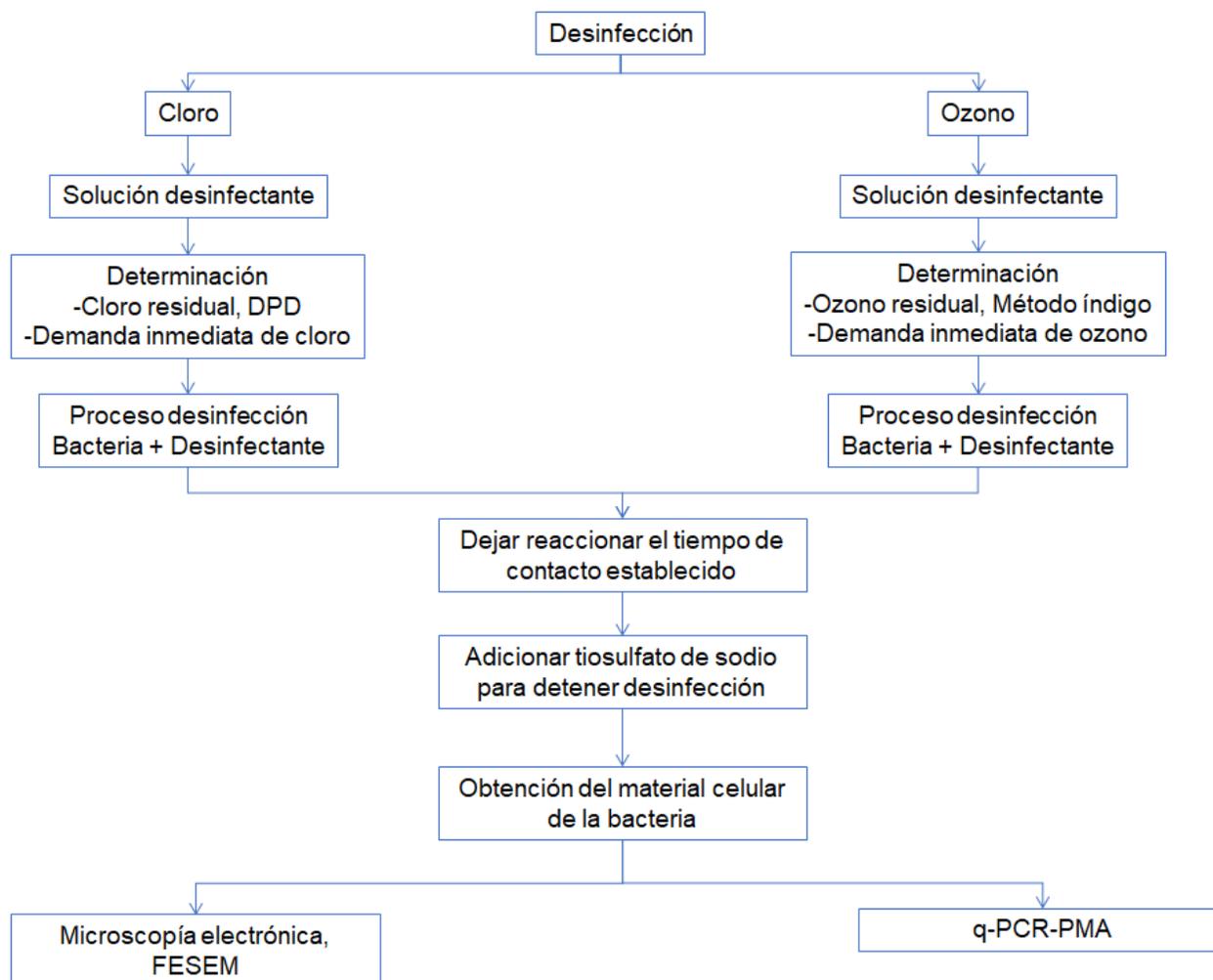
Para las muestras de desinfección para q-PCR-PMA y microscopía electrónica, con cloro y ozono como desinfectantes, se siguió la misma metodología, lo único que cambia es la solución desinfectante utilizada, y la cantidad y concentración de la suspensión bacteriana.

Para q-PCR-PMA, se utilizaron 100 µL de suspensión bacteriana ( $10^6$  células/mL) y 900 µL de solución desinfectante. Para microscopía FESEM se utilizaron 500 µL de suspensión bacteriana ( $9 \times 10^8$  células/mL) y 500 µL de solución desinfectante. El proceso de desinfección se realizó como sigue:

En tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, se añadió la suspensión bacteriana y se añadió la solución desinfectante (cloro u ozono), y se dejó reaccionar el tiempo necesario de acuerdo con los tiempos de contacto. Cada CT se realizó por triplicado. Una vez transcurrido el tiempo de contacto establecido, se adicionaron 200 µL de tiosulfato de sodio 0.1 N estéril para detener la reacción de desinfección. La función del tiosulfato de sodio es que reaccione con el desinfectante residual y lo consuma para detener la desinfección.

Una vez terminado el proceso de desinfección, se hizo extracción de ADN para realizar pruebas moleculares (q-PCR-PMA), y para microscopía electrónica FESEM la muestra se trató como se explica más adelante.

La metodología para realizar la desinfección con cloro y ozono se esquematiza en la Figura 35.



**Figura 35** Desinfección con cloro y ozono

## 5.5 Microscopía FESEM

La microscopía FESEM se utilizó para dar seguimiento a la inducción Al estado VNC de *V. cholerae* y observar los daños estructurales a la bacteria después de los procesos de la desinfección.

- ✓ Para dar seguimiento al cambio morfológico, se tomó 1 mL de la solución bacteriana.
- ✓ Para observar los daños a la bacteria, de la prueba de desinfección se toma la mezcla después de la adición de tiosulfato de sodio.

Ambas muestras se trataron como sigue:

La muestra se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos en una minicentrífuga Spectrafuge 24D Labnet (Figura 36), formándose un pellet. Después de centrifugar, se retiró el sobrenadante y se agregaron 1 mL de glutaraldehído al 3% p/v (ver anexo A6 para la preparación de esta solución). Se dejó reposar por 120 minutos, terminado el tiempo de reposo, se centrifugó de nuevo a 5000 rpm por 10 minutos (etapa de fijación).



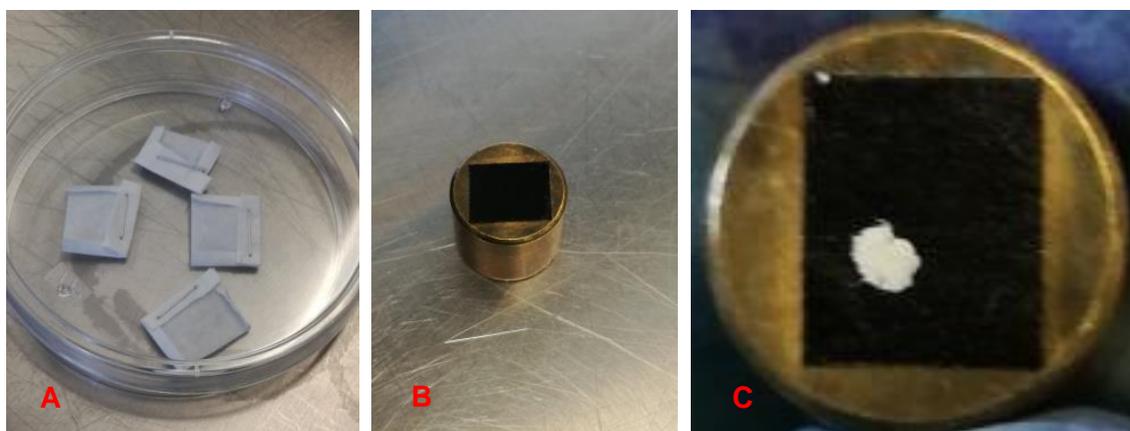
**Figura 36** Minicentrífuga Spectrafuge 24D Labnet

La siguiente etapa es la deshidratación, la cual se llevó a cabo con mezclas de etanol – agua en concentraciones crecientes desde 10% a 100% v/v, en incrementos del 10% de alcohol absoluto. El pellet formado en la centrifugación se mantuvo en contacto 10 minutos para cada concentración de etanol – agua. Para cada deshidratación se realizó una centrifugación con las mismas condiciones establecidas en la etapa de fijación con glutaraldehído. Al final se retira

toda la mezcla deshidratante, conservándose en etanol absoluto hasta el momento de realizar el secado en punto crítico.

Después de la deshidratación, se realizó el punto de secado crítico que consiste en que los pellets formados y deshidratados se colocan en papel arroz, la muestra se mantiene en etanol absoluto. Se colocó en la cámara de punto crítico enfriando con CO<sub>2</sub> hasta 0°C, posteriormente se realizaron lavados con CO<sub>2</sub> hasta la desaparición de las burbujas. Se calentó a una temperatura de 40°C y presión entre 1000 psi a 1200 psi, alcanzadas las condiciones se dejó reposar 10 minutos. Este proceso de secado a punto crítico se realizó en el Instituto de Biología de la UNAM.

Posterior al secado a punto crítico de las muestras, se montaron en un porta muestra cilíndrico, se usó cinta de carbono de doble vista para fijar la muestra (Figura 37). La observación por microscopía FESEM se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales, en el Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME). Debido a que las muestras biológicas no conducen los electrones en el LUME se realiza un recubrimiento por medio de la técnica sputtering, que consiste en colocar una película fina de oro sobre la muestra por ionización. En la Figura 38 se observa el microscopio electrónico JEOL JSM-7600F, en el que se observaron las muestras y en la Figura 39 se observa el equipo de sputtering.



**Figura 37** Preparación de muestras para microscopía electrónica FESEM

A. Muestras en papel arroz después del secado a punto crítico; B. Portamuestras con cinta de carbono; C. Muestra en cinta de carbono

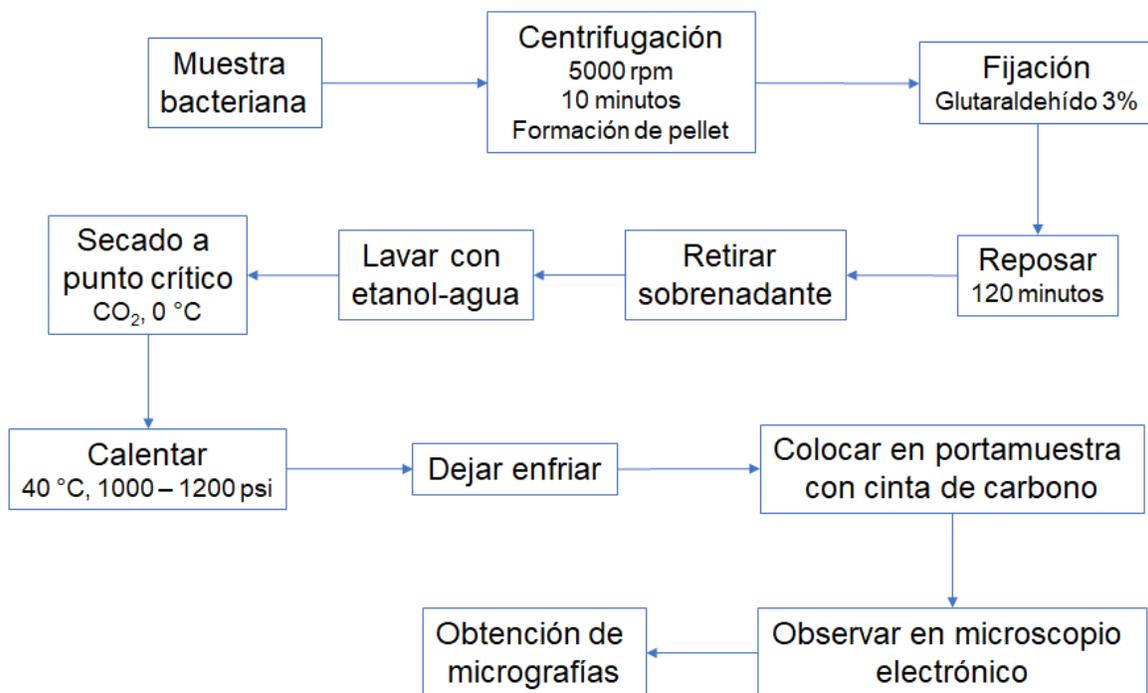


**Figura 38** Microscopio electrónico FESEM JEOL JSM-7600F



**Figura 39** Equipo de sputtering

En la Figura 40, se muestra un diagrama sobre el procedimiento de tratamiento de la muestra para su observación por microscopía FESEM.



**Figura 40.** Diagrama de tratamiento de muestras para microscopía FESEM

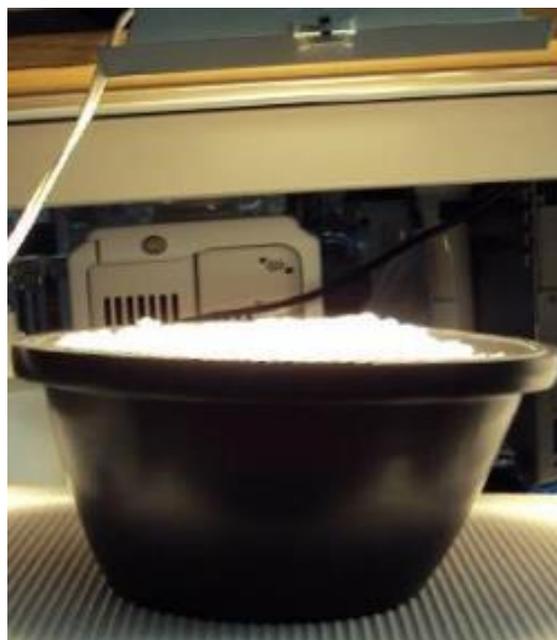
## 5.6 Análisis de q-PCR-PMA

Terminado el tiempo de contacto de la desinfección (para cloro y ozono) se detiene la reacción con la adición de tiosulfato de sodio. Para realizar el análisis de q-PCR-PMA, se realizó lo siguiente:

### 5.6.1 Propidio de monoazida (PMA)

El fin de utilizar el colorante PMA es que los microorganismos con membranas celulares intactas pueden resistir su penetración, mientras que los microorganismos no viables y los microorganismos con membranas dañadas permiten su penetración. Por lo que, al momento realizar q-PCR el ADN de las bacterias con daño celular no es amplificado y solo se hace cuantificación de las células que quedan con la membrana celular intacta (Biotum, 2017)

De la mezcla de reacción de desinfección se tomaron 200  $\mu\text{L}$ , se agregó 1  $\mu\text{L}$  de PMA. Esta preparación se dejó reaccionar durante 15 minutos protegida de la luz. Pasados los 15 minutos, se colocó en hielo y se expuso a una luz halógena de 650 W durante 5 minutos (Figura 41).



**Figura 41** Exposición de la mezcla de reacción a luz halógena

### 5.6.2 Extracción de ADN

Después de que las muestras se dejaron reaccionar con el PMA, se transfirió todo el volumen a tubos con buffer de lisis. Esta nueva mezcla se colocó en tiras de recipiente de muestra y se adicionaron 100  $\mu$ L de sílice magnética. La extracción del ADN se realizó en un extractor de ácidos nucleicos Biomériux easyMAG™ (Figura 42).

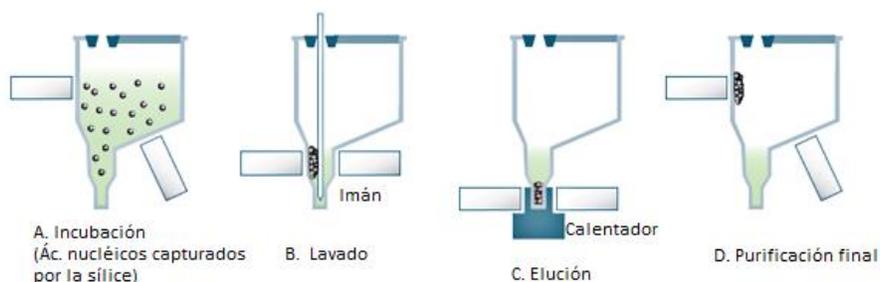


**Figura 42** Extractor de ácidos nucleicos Biomériux easyMAG™

La extracción de ácidos nucleicos se basa en extracción por partículas de sílice magnéticas, que permiten la captura dinámica de ácidos nucleicos. Este proceso consta de cuatro etapas:

- A. Incubación. El ácido nucleico es capturado por las partículas de sílice magnéticas.
- B. Lavado. Un dispositivo magnético del equipo atrae las partículas magnéticas permitiendo la purificación de ácidos nucleicos.
- C. Elución. Hay liberación de ácidos nucleicos por medio de calentamiento de la sílice.
- D. Purificación. Las partículas magnéticas se separan con el dispositivo magnético.

Estas cuatro etapas se ilustran en la Figura 43:



**Figura 43** Etapas de extracción de ácido nucleicos

(Fuente: <http://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/nuclisensr-easymag>)

Este proceso se realiza en 40 minutos, al término de la extracción de ADN, el contenido final se colocó en tubos eppendorf y se mantuvo en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.6.3 q-PCR

#### Curva de calibración

Para poder realizar la cuantificación de la densidad bacteriana, se realiza una curva de calibración que consta de 5 puntos. Esta curva se realiza con base en la calidad y cantidad de ADN presente en la muestra. Cada punto de la curva de calibración se analiza por triplicado en el ensayo de q-PCR.

#### Preparación de las muestras para q-PCR

Posterior a la extracción del ADN se preparó la mezcla de reacción para q-PCR, esta consiste en los siguientes componentes (Tabla 21) los primers usados amplificaron el gen Ctx de *V. cholerae*.

**Tabla 21** Mezcla de reacción para q-PCR

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Taq man universal master Mix	12.5
Primer Forward, concentración 25 pmol/L	1
Primer Reverse, concentración 25 pmol/L	1
Agua libre de AND y ARN-asa	3.5
Sonda P, concentración 10 pmol/L	1
ROX (Pigmento de referencia)	1
ADN	5
Total	25

De la mezcla de reacción descrita en la Tabla 21, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se colocaron en placas de 96 pocillos para PCR. Para cada muestra se hizo un triplicado. Aquí también se añaden 25  $\mu\text{L}$  de cada punto de la curva de calibración. Para el caso de la curva de calibración no se utilizó el colorante PMA, debido a que son bacterias intactas y por ende el colorante no penetra en la pared celular de éstas. En el caso del blanco, es decir el  $\text{Ct} = 0 \text{ mg min L}^{-1}$ , se utiliza el colorante PMA para homogenizar las muestras amplificadas ya que a las muestras tratadas con desinfectante se añade el colorante y para todas tengan el mismo tratamiento para la reacción de PCR se utiliza el colorante. La placa se introduce en el termociclador y se programa para realizar q-PCR. La cuantificación de bacterias se realiza por medio del software 7500 Fast Real-System, que teniendo la relación de bacterias en la curva de calibración hace el cálculo de las bacterias amplificadas en cada muestra.

En la Figura 44, se esquematiza el proceso del análisis molecular por medio de q-PCR-PMA.

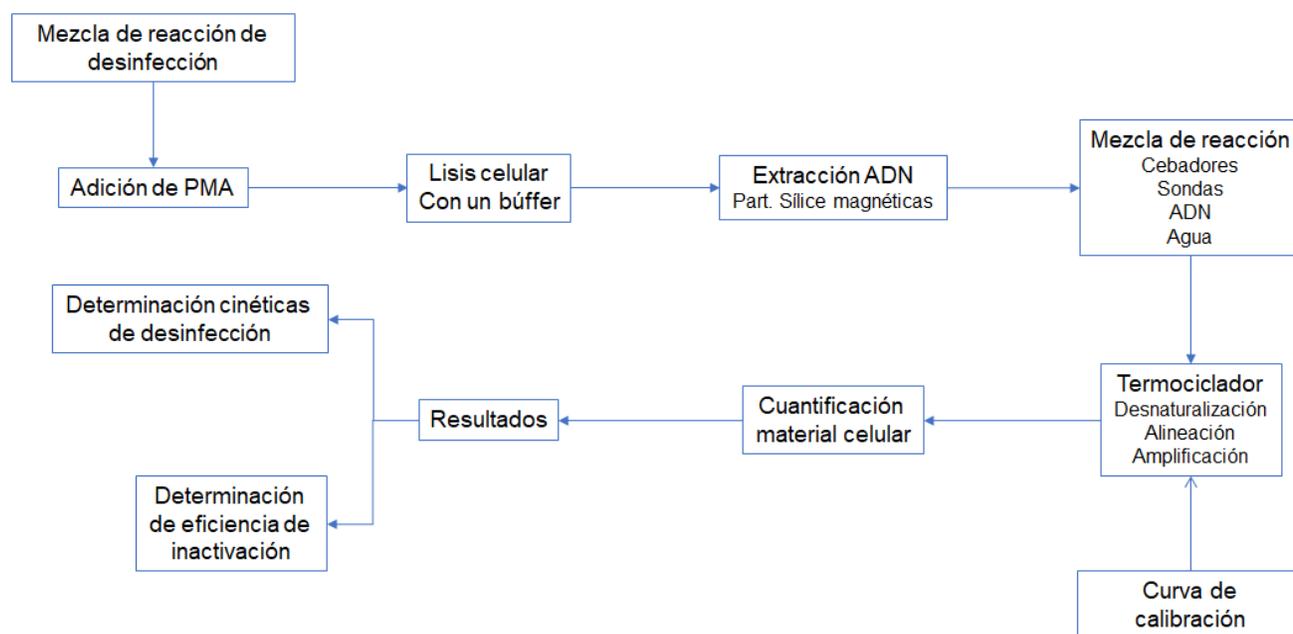


Figura 44 Análisis q-PCR-PMA

## 6 Diseño experimental

Un diseño experimental es un proceso que permite planear un experimento para analizarlo posteriormente con herramientas estadísticas, reconociendo que los resultados y conclusiones que se obtengan tengan validez y objetividad.

Para poder diseñar un experimento se debe:

- Reconocer y establecer el problema a investigar
- Definir los factores (variable a controlar cuyo efecto se quiere estudiar) y niveles (categoría del factor), la combinación de estos dos se llama tratamiento.
- Definir la unidad experimental, que es la subdivisión menor que recibirá un tratamiento.
- Definir variable de respuesta, esta es la que se va a medir en cada unidad experimental.
- Elegir el diseño experimental, el cual consiste en la forma de asignar los tratamientos a las unidades experimentales (aleatorio, bloques, factorial, entre otros).
- Determinación del número de repeticiones, son el número de unidades experimentales a las que se aplicará un tratamiento. Generalmente se realizan tres.

Tomando en cuenta lo anterior, se puede realizar el experimento, efectuar el análisis estadístico y concluir.

### Factores por considerar:

- Concentración de los desinfectantes.
- Tiempo de contacto.

### Niveles

- Concentración de los desinfectantes.
  - Ozono
    - ✓ 0.5 mg/L
    - ✓ 1 mg/L
  - Cloro
    - ✓ 0.5 mg/L
    - ✓ 1 mg/L

Dos niveles para cada desinfectante

- Tiempo de contacto (Tabla 22).

**Tabla 22** Tiempos de contacto para cada desinfectante

	Desinfectante	
	Ozono	Cloro
<b>Tiempo de contacto (min)</b>	0	0
	1	3
	1	3.5
	3	15
	7.5	20
	18	30

Estos tiempos, van en combinación con la concentración de 0.5 y 1 mg/L para cada desinfectante, el tiempo  $t=0$  es el control.

#### **Unidad experimental.**

La unidad experimental se compone de una solución bacteriana, la cual está formada por solución salina isotónica (SSI) y un inóculo de la bacteria *V. cholerae* en estado VNC. Esta solución bacteriana se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad.

A esta unidad experimental se le aplica una combinación de concentración de desinfectante y tiempo de contacto, siendo esta combinación el tratamiento, esta cuestión de los tratamientos se esquematiza mejor en las Tablas 23 y 24.

#### **Variable de respuesta**

Se tienen dos variables de respuestas que son de interés: *cantidad de bacterias inactivadas*, la cual proporcionará información de la eficiencia de la desinfección y *daño de la ultraestructura de la bacteria después de la desinfección*, la cual proporcionará información de los efectos físicos que tienen los desinfectantes en la célula bacteriana.

#### **Número de repeticiones**

Tres para cada tratamiento, es decir se aplicará un tratamiento a 3 unidades experimentales.

### Diseño experimental

Factorial (dos factores, concentración de desinfectante y tiempo de contacto)

Balanceado (3 repeticiones en cada tratamiento)

2x6 (niveles del factor concentración desinfectante x niveles del factor tiempo de contacto)

Las Tablas 23 y 24, muestran la combinación de los tratamientos, tiempo de contacto y concentración de la solución desinfectante para cloro y ozono.

**Tabla 23** Factor CT para el desinfectante ozono

Tiempo de contacto (min)	Concentración	
	0.5 mg/L	1 mg/L
0	Rep 1 Rep 2 Rep 3	Rep 1 Rep 2 Rep 3
1	Rep 1 Rep 2 Rep 3	Rep 1 Rep 2 Rep 3
3	Rep 1 Rep 2 Rep 3	NA
7.5	NA	Rep 1 Rep 2 Rep 3
18	NA	Rep 1 Rep 2 Rep 3

**Tabla 24** Factor Ct para el desinfectante cloro

Tiempo de contacto (min)	Concentración	
	0.5 mg/L	1 mg/L
0	Rep 1 Rep 2 Rep 3	Rep 1 Rep 2 Rep 3
3	Rep 1 Rep 2 Rep 3	NA
3.5	NA	Rep 1 Rep 2 Rep 3
15	NA	Rep 1 Rep 2 Rep 3
20	Rep 1 Rep 2 Rep 3	
30	NA	Rep 1 Rep 2 Rep 3

La elección de estos Ct (concentración de desinfectante x tiempo de contacto), está en función de lo indicado en la norma oficial mexicana, NOM-127-SSA1-1994 (2000) sobre la concentración residual de cloro, cuyo límite máximo permisible es de 0.2 a 1.5 mg/L. En cuanto a la elección de los Ct para ozono, está en función de lo indicado en la norma europea, EN-1278-2010 sobre la concentración residual de ozono, cuyo límite máximo permisible es de 0.4 mg/L por 4 o 6 minutos para desinfección. Con las dosis de cloro y ozono propuestas se cubre lo recomendado por las normas anteriormente citadas y se excede esta recomendación para poder observar los daños que los desinfectantes, cloro y ozono, causan a la bacteria.

El modelo matemático para un diseño Factorial, balanceado, 2x6

$$y_{ij} = \mu + \alpha_k + \gamma_j + \xi_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, \dots, 6$$

$$j = 1, 2$$

$$k = 1, 2, 3$$

Dónde:

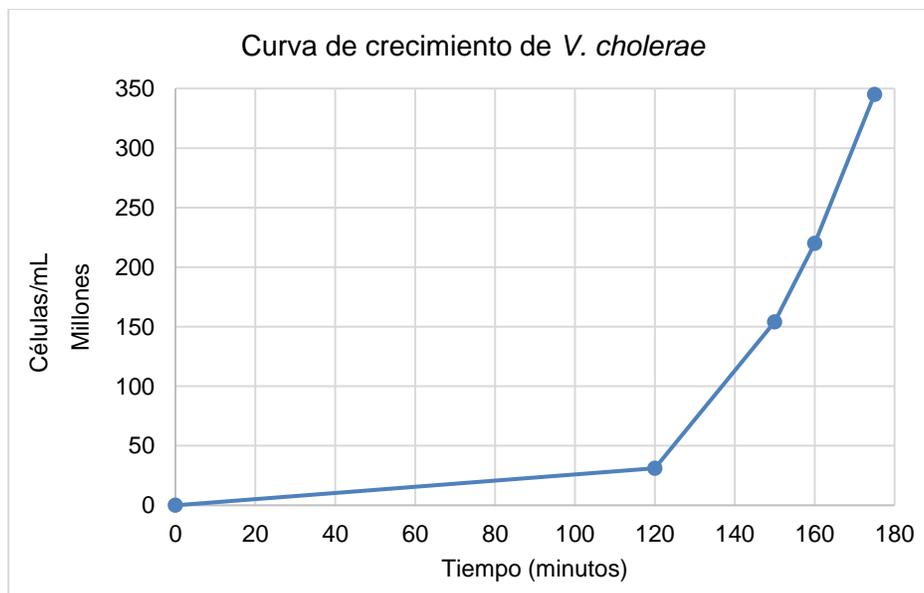
- $\mu$  Media general
- $\alpha_k$  Efecto del factor concentración del desinfectante
- $\gamma_j$  Efecto del factor tiempo de contacto
- $\xi_{jk}$  Efecto de la interacción de los factores concentración de desinfectante y tiempo de contacto
- $\varepsilon_{ij}$  Error experimental de la unidad experimental

## 7 Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados obtenidos a partir de la experimentación realizada. se presentan las fotografías ópticas y micrografías electrónicas FESEM del seguimiento al cambio morfológico de *V. cholerae* al adquirir un estado VNC. Para evaluar la eficacia de los procesos de desinfección, a partir de los resultados obtenidos mediante q-PCR-PMA, se calculó el porcentaje de inactivación de la bacteria. así mismo, se presentan las micrografías de microscopía electrónica para determinar el daño en la ultraestructura celular de la bacteria.

### ***Crecimiento exponencial de V. cholerae.***

Para verificar que se trabajó con la bacteria en su máximo crecimiento y en su máxima viabilidad, se siguió el crecimiento exponencial, el cual se muestra en la Gráfica 2. La razón por la que no se completó la curva de crecimiento fue que se necesitaba tener la bacteria a una densidad bacteriana acorde al tubo no. 3 de McFarland, para seguir con la inducción a VNC. Si se excediera la densidad bacteriana acorde al tubo no. 3 de McFarland se tendría que diluir la bacteria, pero no quedaría ajustada a la densidad deseada. Si se usara a una densidad bacteriana mayor la inducción necesitaría más tiempo, razón por la que el crecimiento de *V. cholerae* se detuvo a los 170 minutos de incubación.



**Gráfica 2** Curva de crecimiento de *V. cholerae*

El crecimiento bacteriano se puede explicar con ecuaciones diferenciales, el modelo simple es el más usado y está descrito por la ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = rN$$

Si se establecen las condiciones iniciales, es decir N a tiempo cero,  $N(0)=N_0$ . El parámetro  $r>0$  es la tasa de crecimiento, la solución a esta ecuación es:

$$N(t) = N_0 e^{rt}$$

### **Inducción de *V. cholerae* es estado VNC**

En los siguientes apartados se observa el seguimiento del cambio de morfología bacilar a cocoide que experimenta la bacteria *V. cholerae* al ser expuesta a agua de mar artificial (ASW) a una temperatura de 4°C. Como ya se mencionó en la metodología este seguimiento se realizó por siembra en placa (comprobar pérdida de cultivo), microscopía óptica (tinción de Gram, una forma rápida de observar el cambio morfológico) y microscopía electrónica (observación a mayor nitidez del cambio morfológico).

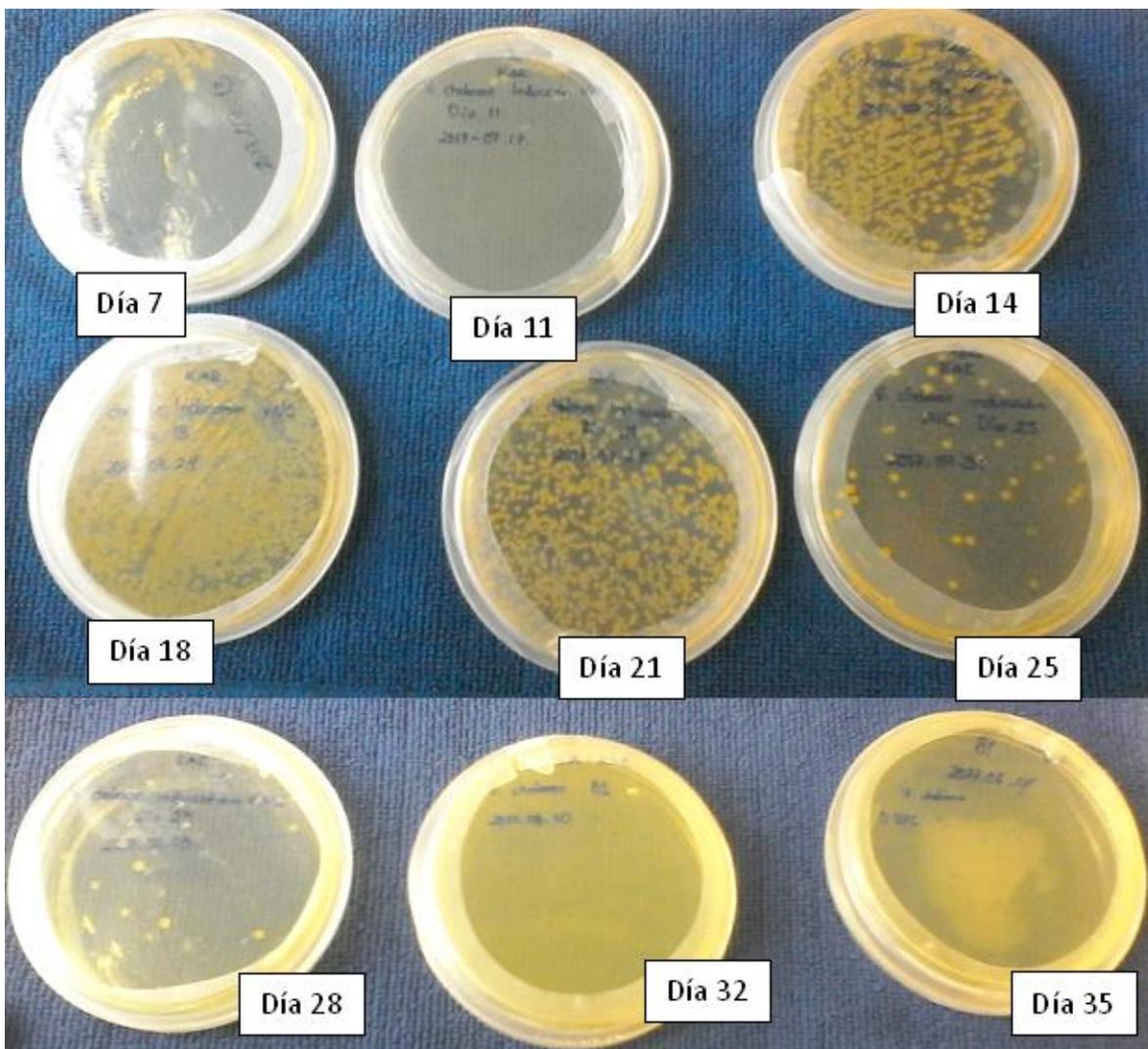
- **Siembra en placa**

La siembra en placas de agar TSA (soya tripticasa) se realizó cada tres días, con el fin de verificar la pérdida de cultivo de la bacteria. La siembra se realizó por extensión en placa, en este tipo de siembra la pérdida de cultivo es más visible, ya que la alícuota se extiende para cubrir toda la superficie del agar. La pérdida de cultivo fue visible a partir del día 25 de inducción, en este día ya era posible cuantificar las colonias formadas (49 unidades formadoras de colonias, UFC), en el día 32 de inducción se tiene la pérdida total de la capacidad de cultivo de la bacteria, sin embargo, se sembró tres días después (día 35) para confirmar la pérdida de cultivo y que no hubiera contaminación. Las colonias que crecieron en las placas de agar TSA fueron redondas, de consistencia viscosa color gris – crema.

En las placas de agar TCBS, se observó el crecimiento de colonias con forma circular y borde regular, éstas fueron de color amarillo, en algunas se observó que alrededor del crecimiento de las colonias de *V. cholerae* un cambio de color de verde a amarillo, esto

debido a que la composición de este medio selectivo incluye citrato de sodio, tiosulfato de sodio, bilis de buey y colato son agentes que proporcionan un ambiente alcalino que inhibe organismos Gram positivos, dado que *V. cholerae* es un organismo sensible a entornos ácidos. Este medio también tiene indicadores ácido-base como el azul de bromotimol y azul de timol que viran a color amarillo a pH mayor a 8.

En la Figura 45, se muestran las placas utilizadas para dar seguimiento a la pérdida de cultivo. Y en la Figura 46, se observan las siembras de comprobación de pureza del cultivo realizadas en agar TCBS.



**Figura 45** Pérdida de cultivo de *V. cholerae* en placas de TSA

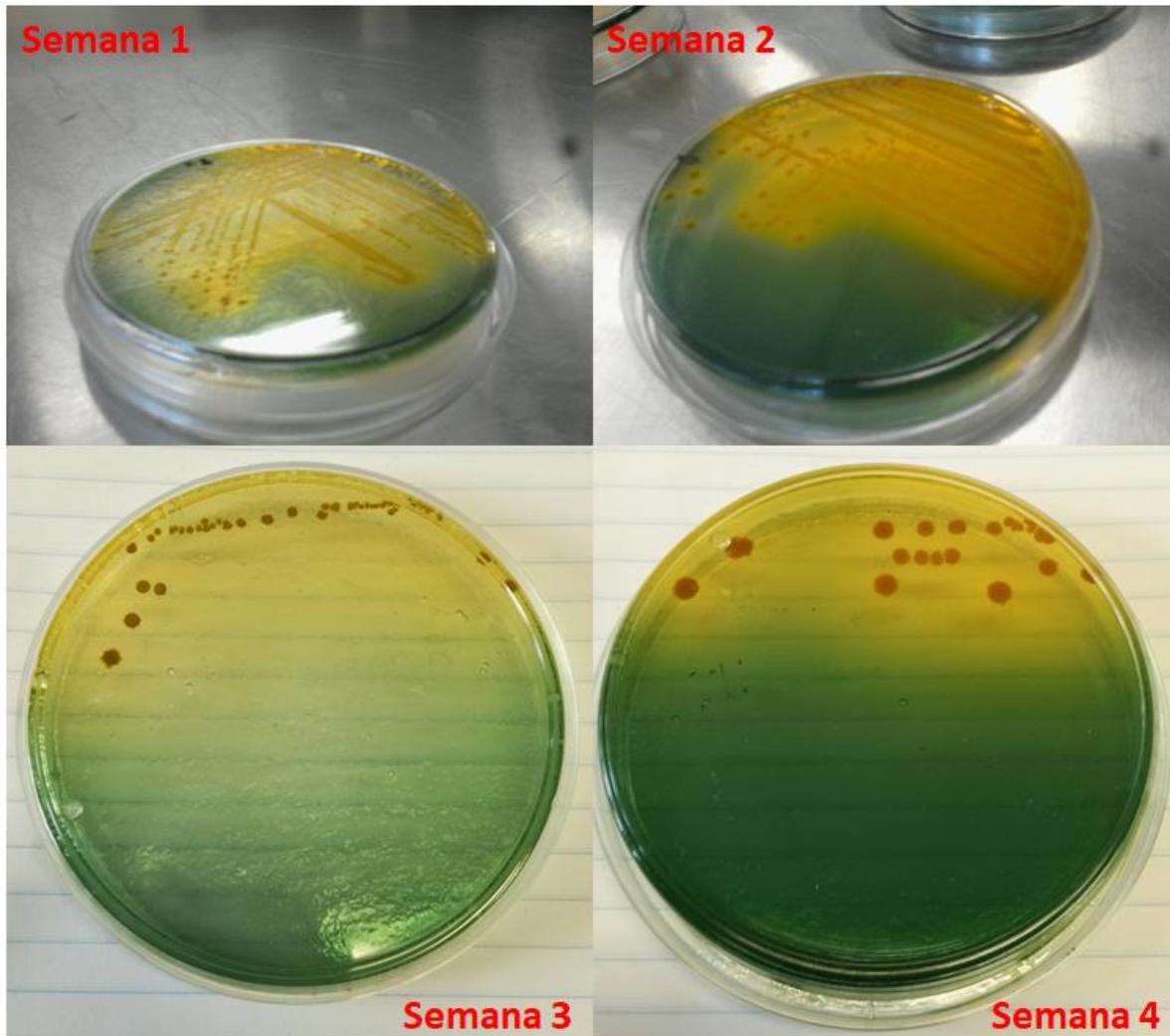
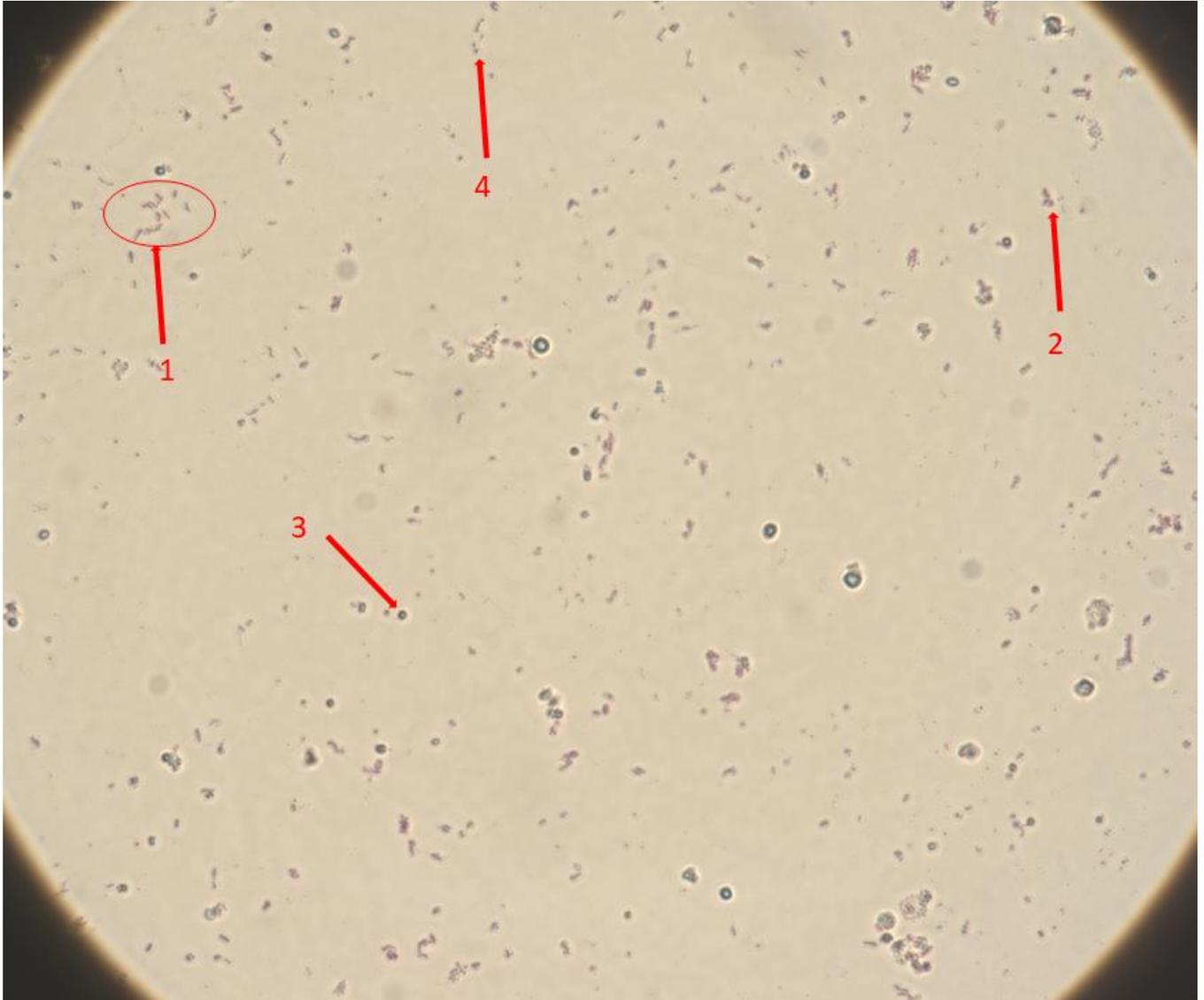


Figura 46 Siembra en agar TCBS para confirmación de *V. cholerae*

- **Microscopía óptica**

Durante el seguimiento de la inducción de *V. cholerae* se observaron la forma bacilar, la forma de “U” o herradura, forma anillada y cocoide. En el día uno, se observan solo bacilos, en el día siete, se observan muy pocas bacterias que empiezan a tomar la forma de “U” (aproximadamente 10%), entre el día 14 y 21 se observa que poco más del 50% de las bacterias observadas están en forma de “U” y anillada; en el día 28 hay un aproximado del 80% de cocoides, siendo el día 32 en el que se observan un 100% de cocoides. Las formas morfológicas ya mencionadas se observan en la Figura 47.



**Figura 47** Morfología *V. cholerae*, día 21 de inducción (Tinción de Gram), aumento a 100x con aceite de inmersión en microscopio óptico.

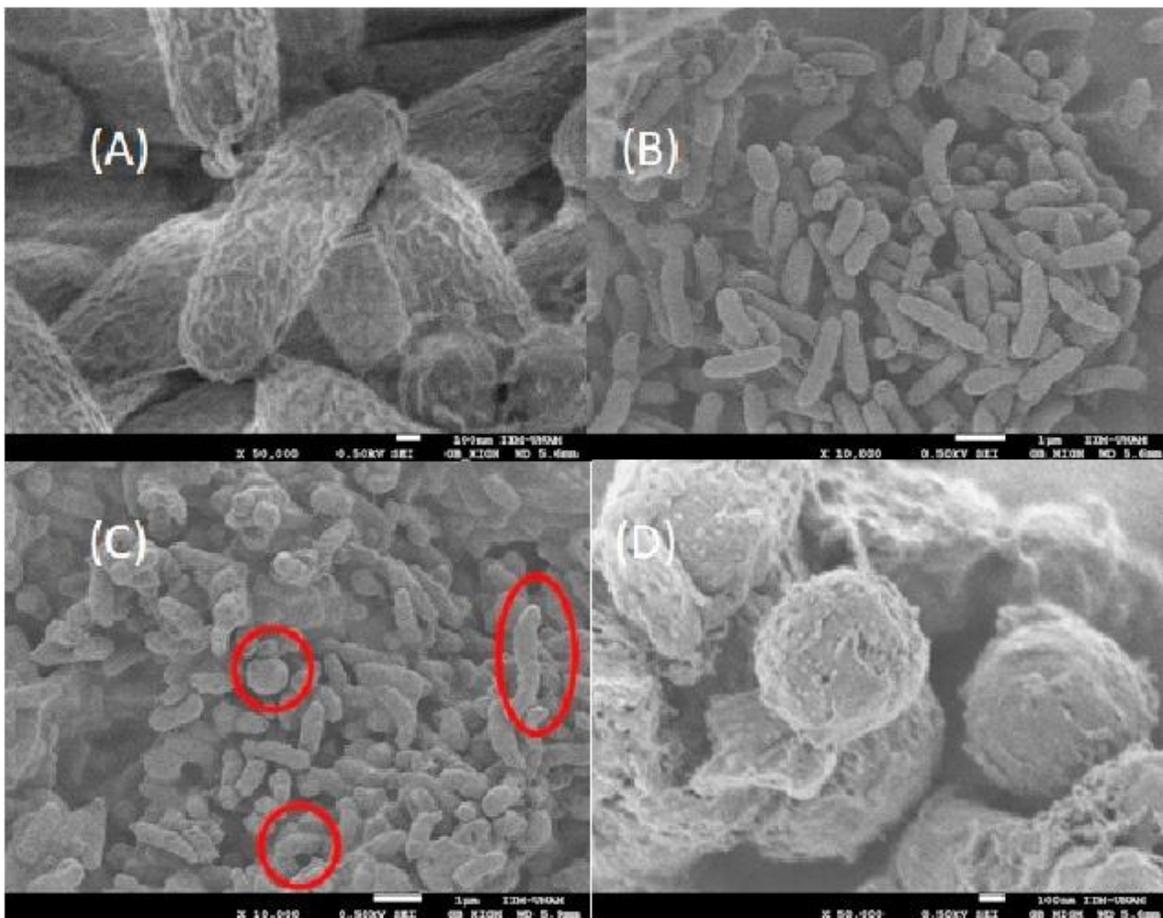
1) Bacilo, 2) Forma de "U", 3) Forma anillada, 4) Coccoide

En el anexo B1, se muestran las fotografías más representativas de la inducción desde el día uno al día 35.

- **Microscopía FESEM**

El objetivo de obtener las micrografías FESEM es la de observar a mayor detalle los rasgos morfológicos que presenta la bacteria *V. cholerae* en estado VNC, ya que este tipo de microscopía (electrónica) tiene una mejor resolución y es posible observar con más detalle a los microorganismos.

En la Figura 48 se tienen las micrografías relacionadas a la inducción de la bacteria *V. cholerae* en estado VNC, se observa que la morfología de ésta cambia conforme se encuentra en un microcosmo acuático a base de ASW a una temperatura de 4°C. En la imagen A se observan bacilos, esto es en el día uno de inducción (100% bacilos); la imagen B, se observan bacterias que empiezan a tomar una curvatura, sin embargo, el cambio en la morfología no es mayoritario. En la imagen C se observan las morfologías bacilo, herradura y cocoide. La imagen D muestra la morfología cocoide, este cambio se dio al día 32 de inducción a VNC.



**Figura 48** Micrografías de la inducción de *V. cholerae* a VNC.

En la Tabla 25 se presentan los datos obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del agua de mar artificial (ASW). En estos se observa que el pH del medio está cercano a la neutralidad, debido al alto contenido de sales se tiene una gran conductividad eléctrica y un alto contenido de sólidos disueltos totales. En cuanto al porcentaje de salinidad, está acorde con lo reportado para agua de mar, que oscila entre 35 ‰ (partes por mil).

**Tabla 25** Parámetros fisicoquímicos del ASW

Parámetro	Valor	Unidades
pH	6.71	---
Salinidad	36.37	g/L (‰)
Conductividad eléctrica	50.01	mS/cm
Sólidos disueltos totales	55.7	g/L

Diversos estudios se han realizado para observar los cambios de *V. cholerae* en la inducción a estado VNC, en algunos de estos trabajos se reporta que *V. cholerae* se puede inducir a VNC en 9 días o hasta 60, en diversos medios acuosos (agua de mar, agua dulce, buffer de fosfatos), a porcentajes de salinidad variados (5 g/L de hasta 35 g/L) y diversas temperaturas (4°C hasta 30°C) y con seguimiento por medio de microscopía electrónica TEM y SEM, teniendo cambios fisiológicos como su transformación en cocoide (Singleton *et. al.*, 1982, Baker *et. al.*, 1983, Tamplin y Colwell, 1986, Hood *et. al.*, 1986, McCarthy, 1995, Chaiyanan *et. al.*, 2001, González-Escalona *et. al.*, 2006, Chaiyanan *et. al.*, 2007, Vital *et. al.*, 2007, Mishra *et. al.*, 2012).

En el presente trabajo se observó el cambio de morfología desde bacilo, forma de “U” o herradura, forma anillada y finalmente cocoide, además de que la inducción se dio en 32 días, lo cual está dentro de los rangos de tiempo reportados por otros investigadores. En los trabajos citados se habla del efecto de la salinidad como factor para inducir a VNC, se explicó que a salinidades de 25 a 35 g/L de sal hay un crecimiento óptimo de la bacteria,

es decir, hay proliferación de la forma bacilar, sin embargo, a salinidades mayores la bacteria lo toma como un factor adverso en su ambiente y empieza la inducción como mecanismo de supervivencia.

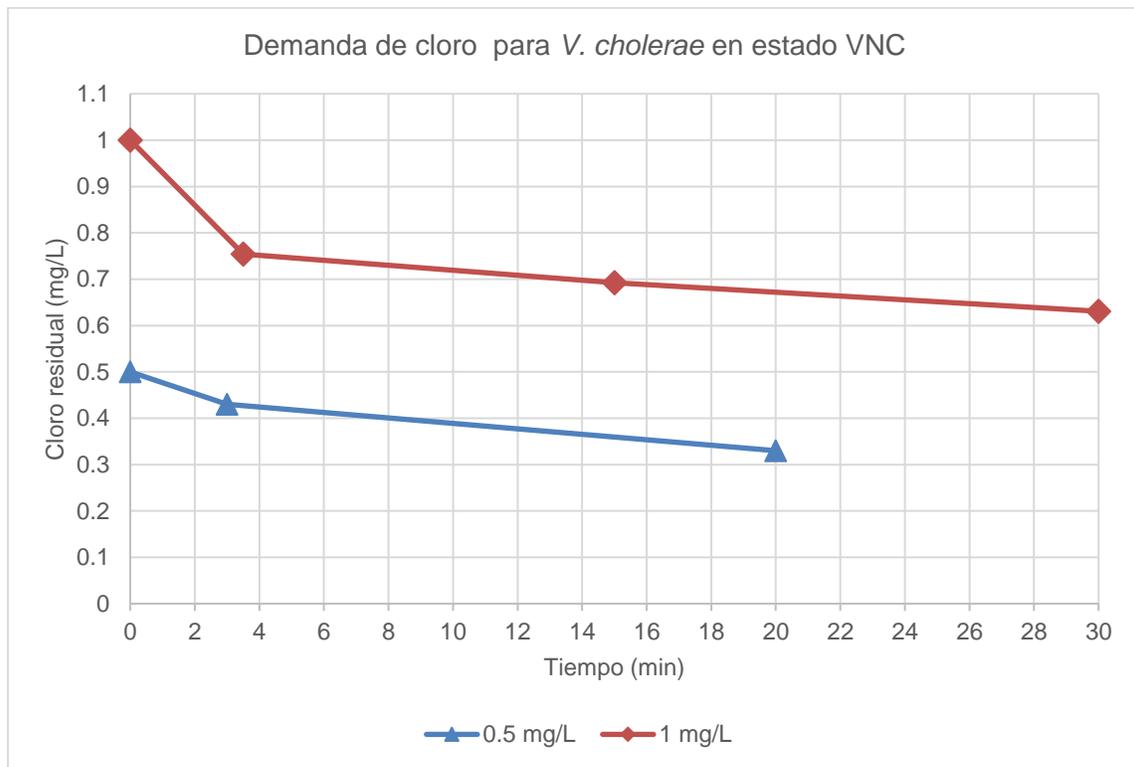
### **Desinfección de *V. cholerae* cocoide**

A continuación, se muestran los resultados del análisis q-PCR-PMA y las micrografías obtenidas para la desinfección con cloro y ozono, tratamientos aplicados a la bacteria *V. cholerae* VNC.

- **Desinfección con cloro**

En la Gráfica 3, se observa la demanda o consumo de cloro al tiempo establecido. Para una dosis de 0.5 mg/L se observan consumos iniciales de cloro en el rango de 0.1 a 0.2 mg/L, dejando una concentración residual de cloro arriba de 0.3 mg/L. En el caso de una dosis de 1 mg/L, se observan demandas iniciales de cloro en el rango de 0.3 a 0.4 mg/L, quedando como concentración residual a esta dosis arriba de 0.6 mg/L. Estas cantidades de cloro residual están dentro de lo estipulado por la NOM-127-SSA1-1994 (2000) que establece un rango de cloro residual de 0.2 a 2 mg/L.

Se observa que a mayor tiempo de contacto el consumo de cloro aumenta, es decir se agota con el tiempo y entre mayor concentración de cloro, el residual se mantiene a mayor tiempo de contacto, por lo que se infiere que si se hubiera usado 0.5 mg/L para un tiempo de contacto de 30 minutos, la concentración residual hubiera sido cercana a 0 mg/L, por lo tanto, para tiempos de contacto grandes se necesitan altas concentraciones de desinfectante para asegurar un residual.



**Gráfica 3.** Demanda inicial de cloro para la bacteria *V. cholerae* VNC

La cuantificación de las bacterias inactivadas después del proceso de desinfección se contabilizó con un análisis q-PCR en conjunción con el pigmento PMA, el cual realiza la cuantificación de las bacterias que quedan intactas después del proceso de desinfección, con estos datos se calcula la cinética de desinfección y los logaritmos de inactivación que se alcanzaron.

En la Tabla 26, para el desinfectante cloro se muestra el Ct utilizado, el tiempo de contacto, la cantidad de bacterias que quedan después de la desinfección (unidades bacterianas), el promedio de la cuantificación para cada Ct, el logaritmo del cociente del número de bacterias iniciales entre el número de bacterias después de la desinfección y el porcentaje de inactivación.

**Tabla 26** Resultados de q-PCR-PMA para *V. cholerae* VNC, desinfectante: Cloro

Ct (mg min L <sup>-1</sup> )	Tiempo (min)	Unidades bacterianas	Promedio unidades bacterianas	Desv std.	Log (N <sub>0</sub> /N)	% Inactivación
0	0	109410.00	109413.6	6.11E+00	0	0
		109415.00				
		109420.00				
		109405.00				
		109418.00				
1.5	3	7222.00	7216.6	8.05E+00	1.18	93.40
		7213.00				
		7210.00				
		7228.00				
		7210.00				
3.5	3.5	627.00	626.6	3.85E+00	2.24	99.43
		620.00				
		628.00				
		630.00				
		628.00				
10	20	644.00	645.4	3.85E+00	2.23	99.41
		640.00				
		648.00				
		645.00				
		650.00				
15	15	49.00	48.6	1.14E+00	3.35	99.96
		48.00				
		50.00				
		49.00				
		47.00				
30	30	28.00	27.4	1.52E+00	3.60	99.97
		27.00				
		29.00				
		28.00				
		25.00				

El modelo cinético de la ley de Chick está representado por la ecuación:

$$\ln \frac{N_0}{N} = kt$$

En dónde  $k$  es la constante de velocidad expresada en  $\text{min}^{-1}$  y  $t$  es el tiempo de contacto. Esta es una cinética de primer orden con forma de ecuación lineal.

El modelo cinético de Chick – Watson obedece a la ecuación:

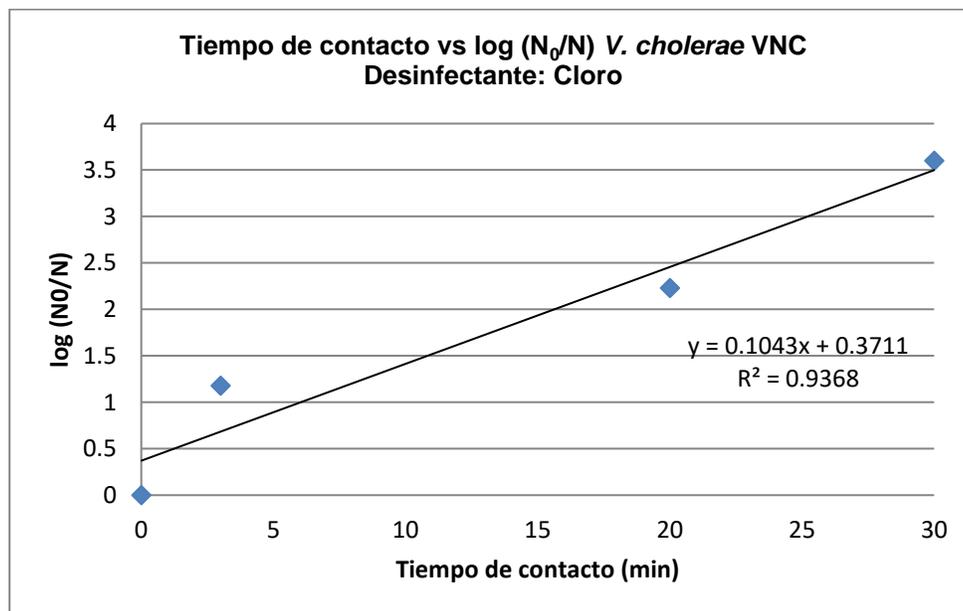
$$\ln \frac{N_0}{N} = -k' C^n t$$

Donde  $k'$  es el coeficiente de letalidad con unidades de  $\text{min mg L}^{-1}$ ,  $n= 1$ ,  $C$  es la concentración del desinfectante y  $t$  el tiempo de contacto.

Con los datos de la Tabla 26 se graficó en las Gráficas 4 y 5 el  $Ct$  vs  $\log (N_0/N)$  y el tiempo vs  $\log (N_0/N)$ ; se realizó una regresión lineal, obteniendo la pendiente (que es la constante de velocidad en la ley de Chick y también es el coeficiente de letalidad en la ley de Chick–Watson), ambas ecuaciones quedan de la siguiente manera:

Ley de Chick:

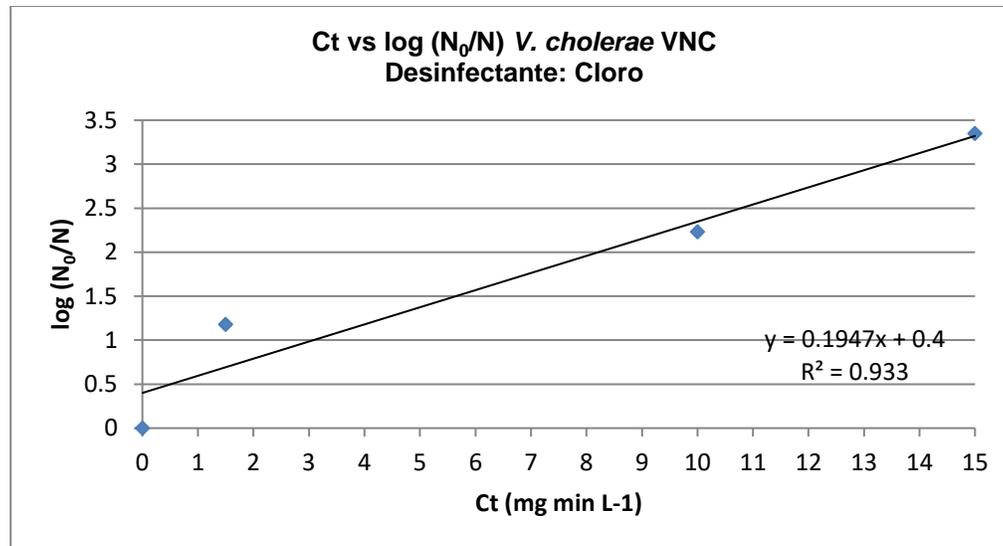
$$\ln \frac{N_0}{N} = (0.1043 \text{ min}^{-1} \times t) + 0.3711$$



**Gráfica 4** Ley de Chick para el desinfectante cloro

Ley de Chick – Watson:

$$\ln \frac{N_0}{N} = (-0.1947 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ L} \times Ct) + 0.4$$



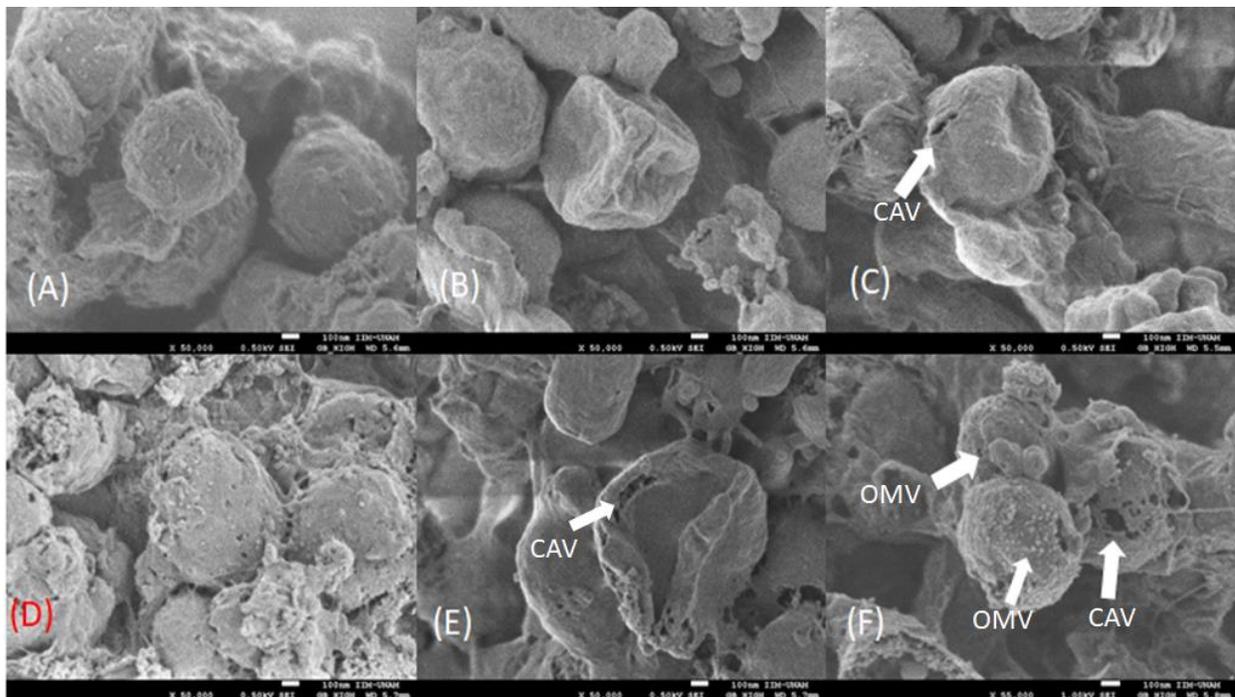
**Gráfica 5** Ley de Chick – Watson para el desinfectante cloro

Para cada una de las condiciones estudiadas se evaluó el daño celular, en la Figura 49 se observan las micrografías obtenidas de la desinfección con cloro sobre la bacteria *V. cholerae* cocoide. La micrografía A, muestra el  $Ct = 0 \text{ mg min L}^{-1}$ , es decir la bacteria al inicio de la desinfección, se observa la morfología cocoide resultado de la inducción de la bacteria en agua de mar artificial (ASW). Las fotografías B a la F se muestran daños a la bacteria, principalmente deformación y ligeras cavidades (CAV), se observa también la presencia de material celular expulsado al exterior como las vesículas de membrana externa (OMV, outer membrane vesicles, por sus siglas en inglés); en estas imágenes solo se observan daños a la membrana, sin embargo, no hay evidencia de destrucción de la bacteria. La presencia de OMV ha ido reportada por Thanomsub *et. al.*, (2002), Diao *et. al.*, (2004), y Zhang *et. al.*, (2011) para *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las cavidades observadas ya han sido reportadas por Román, (2013) para la desinfección de *H. pylori* VNC con ozono.

A un valor de  $Ct$  de  $1.5 \text{ mg min L}^{-1}$ , sólo se observa deformación de la célula, al aumentar la concentración y tiempo de exposición se observa daño estructural mínimo, una pequeña cavidad,  $CT = 3.5 \text{ mg in L}^{-1}$ . Otros daños observados en la bacteria indican hundimiento

total de la célula (CT= 15 mg min L<sup>-1</sup>), mientras que al mayor valor de CT probado (30 mg min L<sup>-1</sup>) se observa material celular (OMV).

Los daños observados por medio de las micrografías FESEM, están de acuerdo con el mecanismo de acción del cloro, éste altera la permeabilidad de la membrana. De acuerdo con la medición del pH de la solución cloro, que fue de 6.4 para la solución de 1 mg/L y de 6.19 para la solución de 0.5 mg/L, la especie química que está presente en la desinfección es el HClO, siendo este más eficaz para la desinfección debido a que tiene carga negativa, siendo a fin a la membrana celular, alterando la permeabilidad de ésta.



**Figura 49** Micrografías de la desinfección con cloro sobre *V. cholerae* VNC.

(A) Ct=0 (B) Ct=1.5 (C) Ct=3.5 (D) Ct= 10 (E) Ct= 15 (F) Ct= 30. Ct en unidades de mg min L<sup>-1</sup>.

En la Tabla 27, se muestra un resumen con los porcentajes de inactivación y la concentración residual de cloro para cada Ct probado; en dicha tabla de se observa que el residual de cloro después del tiempo de desinfección se mantiene dentro de los límites establecidos por la NOM-127-SSA1-1994 (2000), que indica valores de 0.2 a 1.5 mg/L para cloro residual libre. Esto quiere decir que a la concentración de dosis infectiva (10<sup>6</sup> células/mL) la aplicación de cloro es adecuada, ya que se mantienen un residual, así como

la inactivación del patógeno en cuestión. En esta tabla se observa que para la menor concentración de desinfectante 0.5 mg/L y el menor tiempo de contacto se obtiene una reducción del 93.4% y se asegura un residual que está de acuerdo con lo establecido en la norma. A valores de Ct mayores a 3.5 mg min<sup>-1</sup>, se observa una reducción bacteriana superior al 99%, sin embargo, se puede ver que a valores de Ct de 15 y 30 mg min<sup>-1</sup>, la reducción de bacterias es muy parecida, siendo que a un Ct= 15 mg min<sup>-1</sup>, el cloro llega al límite de desinfección.

**Tabla 27** Desinfección con cloro sobre *V. cholerae* VNC

Ct	[Cl] <sub>inicial</sub>	Tiempo de contacto	Unidades bacterianas	log <sub>10</sub> (N <sub>0</sub> /N)	Porcentaje de inactivación	[Cl] <sub>residual</sub>
mg min L <sup>-1</sup>	mg/L	min	N	----	%	mg/L
0	0	0	109413.6	0.00	0	----
1.5	0.5	3	7216.6	1.18	93.40	0.43
3.5	1.0	3.5	626.6	2.24	99.43	0.754
10	0.5	20	645.4	2.23	99.41	0.33
15	1.0	15	48.6	3.35	99.96	0.692
30	1.0	30	27.4	3.60	99.97	0.631

De los datos resumidos en la Tabla 27 referida a la desinfección con cloro, se observa que de los Ct probados el que tiene la mayor concentración residual es el Ct= 3.5 mg min<sup>-1</sup>, con una concentración residual de 0.754 mg/L; por lo que, a un nivel práctico es el que aseguraría la calidad microbiológica del agua al ponerla en la red de suministro. Además de que inactiva un 99.43 % de las bacterias iniciales.

En la Tabla 28, se muestran las dosis típicas de diversos compuestos de cloro usados por plantas potabilizadoras, con esto se muestra que las usadas en este trabajo están dentro de lo que a nivel industrial se realiza.

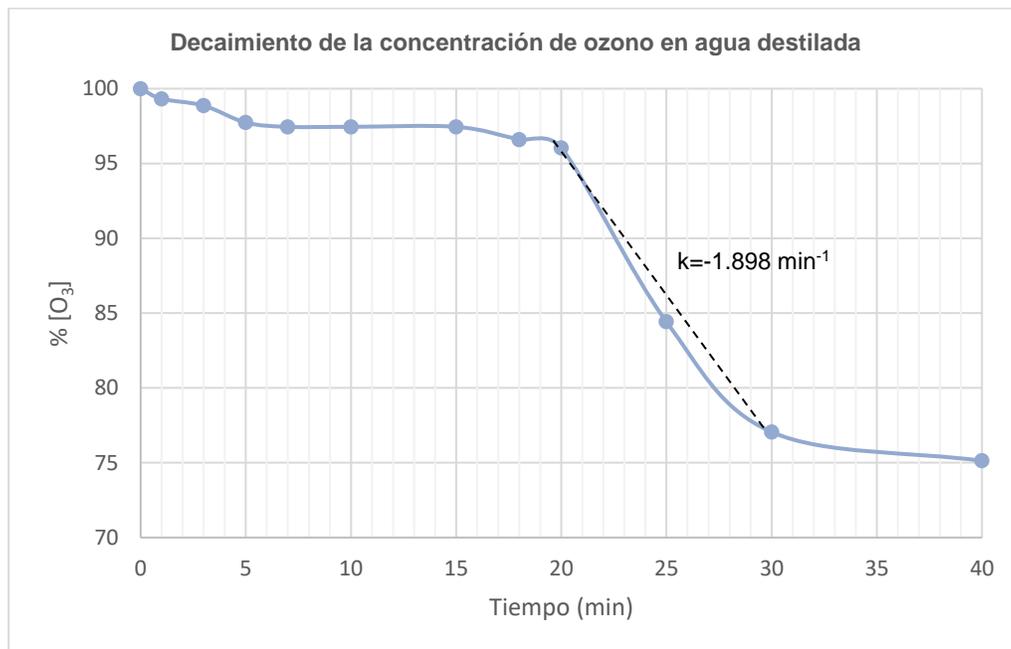
**Tabla 28** Dosis aplicadas de cloro en plantas potabilizadoras (CONAGUA; 2007)

Compuesto de cloro	Dosis (mg/L)
Cloro gas	1 – 16
Hipoclorito de sodio	0.2 – 2
Hipoclorito de calcio	0.5 – 5

- **Desinfección con ozono**

La estabilidad del ozono en agua se muestra en la Gráfica 6, en ésta se observa que la cantidad de ozono disuelta en agua se mantiene en un nivel constante desde el minuto cero en que se midió la concentración inicial de ozono, 3.53 mg/L, hasta el minuto 20, pasando de 20 minutos, la cantidad de ozono disminuye notablemente, hasta el minuto 30, en el que se observa una ligera tendencia constante, por lo tanto, se calculó la constante de decaimiento igual a  $k = -1.898 \text{ min}^{-1}$ , que indica la velocidad de desorción del ozono en agua. Los tiempos de contacto utilizados en la experimentación van de 1 minuto a 18 minutos, consultando la Gráfica 6 y leyendo la cantidad de ozono disuelta al mayor tiempo de contacto utilizado en el proceso de desinfección se observa que la cantidad de ozono disuelto es mayor al 95%, por lo que el tiempo de contacto empleado no afecta la cantidad de ozono aplicada. El agua usada para preparar la solución saturada de ozono estaba previamente enfriada a 6°C, por lo que la retención del gas ozono es más alta.

La vida media del ozono en agua se ha reportado a un pH= 7 y a una temperatura de 20°C, siendo de 20 a 30 minutos, siendo más inestable a valores de pH básicos (Orozco *et. al.*, 2003). El pH de la solución de ozono está comprendido en 6.66, por lo que el ozono retenido es más estable a pH ácidos y bajas temperaturas, lo que explica que la concentración de ozono esté constante desde el minuto cero hasta 20 minutos, y a partir de los 20 minutos hasta 30, se observa un descenso en la retención del gas en agua, como se muestra en la gráfica 6.



**Gráfica 6** Decaimiento de ozono en agua

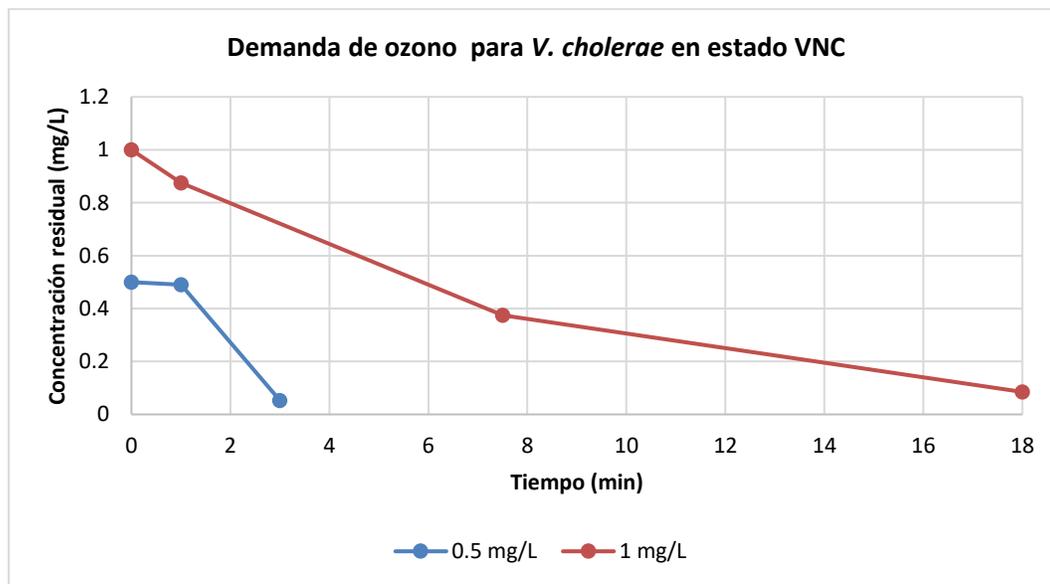
En la Gráfica 7, se observa la demanda o consumo de ozono al tiempo establecido. Para una dosis de 0.5 mg/L se observan consumos iniciales de ozono en el rango de 0.1 a 0.45 mg/L, dejando una concentración residual de 0.49 mg/L para un tiempo de 1min, sin embargo, se observa que, a un tiempo de 3 minutos, esta concentración residual de ozono está muy cercana a cero, esto tal vez debido a la rápida desorción del ozono e agua, ya que en la Gráfica 6 se muestra que a un minuto no hay una desorción muy alta, sin embargo, en el tratamiento de las muestras para desinfección se calculó la cantidad de agua saturada de ozono necesaria para aplicar una dosis de 0.5 mg/L, por lo que la saturación del gas en el agua es muy baja lo que promueve una rápida desorción.

En el tiempo de contacto de 3 minutos el residual calculado no está de acuerdo con la norma EN-1278:2010, que para ozono residual establece un valor de 0.4 mg/L, sin embargo, en los análisis de q-PCR-PMA y micrografías FESEM se puede ver y cuantificar el daño que el ozono causa a la bacteria en este tratamiento.

En el caso de la dosis aplicada de 1 mg/L se observa la misma tendencia a disminuir conforme pasa el tiempo, sin embargo, como ya se mencionó, para poder tener la

concentración de ozono establecida, 1 mg/L, se calculó la cantidad de agua saturada para aplicar a la bacteria.

Además de que los experimentos de demanda se realizaron con una concentración de  $10^6$  células/mL de la bacteria, ya que esta es la dosis infectiva reportada (Percival *et. al.*, 2004; Duncan y Nigel, 2003) y en la lisis celular, que es el mecanismo de acción del desinfectante; la cantidad de ozono consumida es muy grande, y los tiempos de contacto a esta concentración de ozono son altos (7.5 y 18 minutos). A los 7.5 minutos el residual es cercano a lo establecido en la norma, a los 18 minutos, esto no se cumple, por lo tanto, la eficacia de la desinfección en este punto se evaluará con más precisión en los experimentos de q-PCR-PMA y micrografías FESEM.



**Gráfica 7** Demanda inicial de ozono para la bacteria *V. cholerae* VNC

En la Tabla 29 para el desinfectante ozono se muestra el CT utilizado, el tiempo de contacto, la cantidad de bacterias que quedan después de la desinfección (unidades bacterianas), el promedio de la cuantificación para cada CT, el logaritmo del cociente del número de bacterias iniciales entre el número de bacterias después de la desinfección y el porcentaje de inactivación.

**Tabla 29.** Resultados de q-PCR-PMA para *V. cholerae* VNC, desinfectante: Ozono

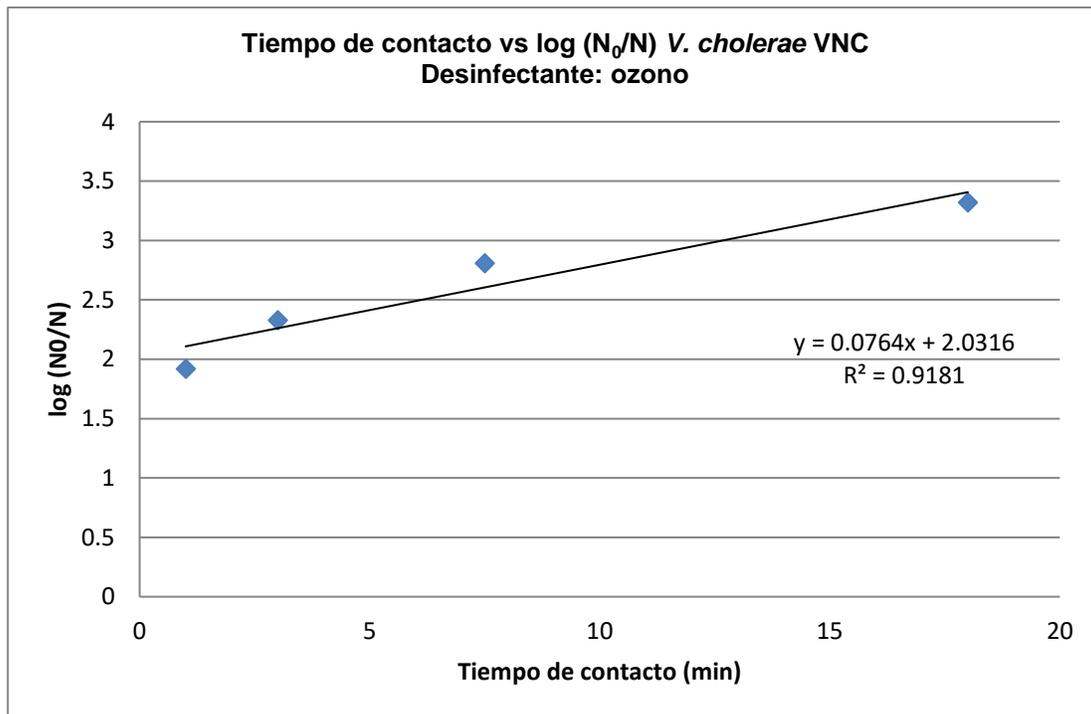
CT (mg min L <sup>-1</sup> )	Tiempo (min)	Unidades bacterianas	Promedio unidades bacterianas	Desv std.	Log (N <sub>0</sub> /N)	% Inactivación
0	0	73500	73326	4.63E+02	0	0
		72500				
		73500				
		73550				
		73580				
0.5	1	13700	13727.8	2.41E+01	0.73	81.28
		13760				
		13740				
		13730				
		13709				
1	1	878	873.8	3.90E+00	1.92	98.81
		868				
		875				
		872				
		876				
1.5	3	342	342.6	2.30E+00	2.33	99.53
		345				
		345				
		341				
		340				
7.5	7.5	114	112.8	1.30E+00	2.81	99.85
		112				
		113				
		111				
		114				
18	18	35	34	1.00E+00	3.33	99.95
		33				
		33				
		35				
		34				

Con los datos de la Tabla 29 se realizaron las Gráficas 8 y 9 el Ct vs log (N<sub>0</sub>/N) y el tiempo vs log (N<sub>0</sub>/N); se realizó una regresión lineal, obteniendo la pendiente (que es la constante

de velocidad en la ley de Chick y también es el coeficiente de letalidad en la ley de Chick–Watson), ambas ecuaciones quedan de la siguiente manera:

Ley de Chick:

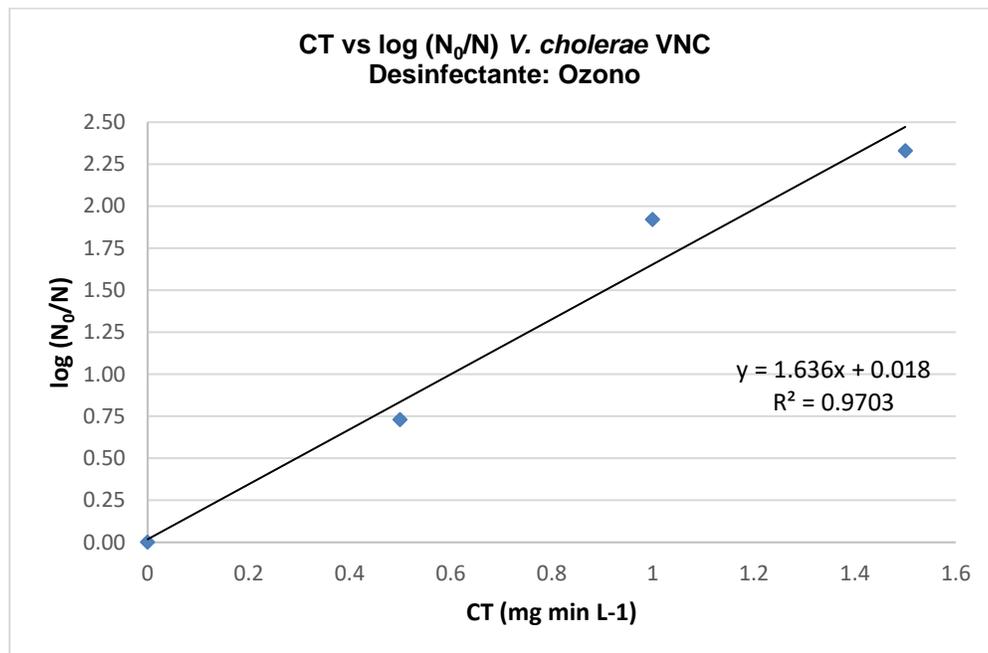
$$\ln \frac{N_0}{N} = (0.0764 \times t) + 2.0316$$



**Gráfica 8** Ley de Chick para el desinfectante ozono

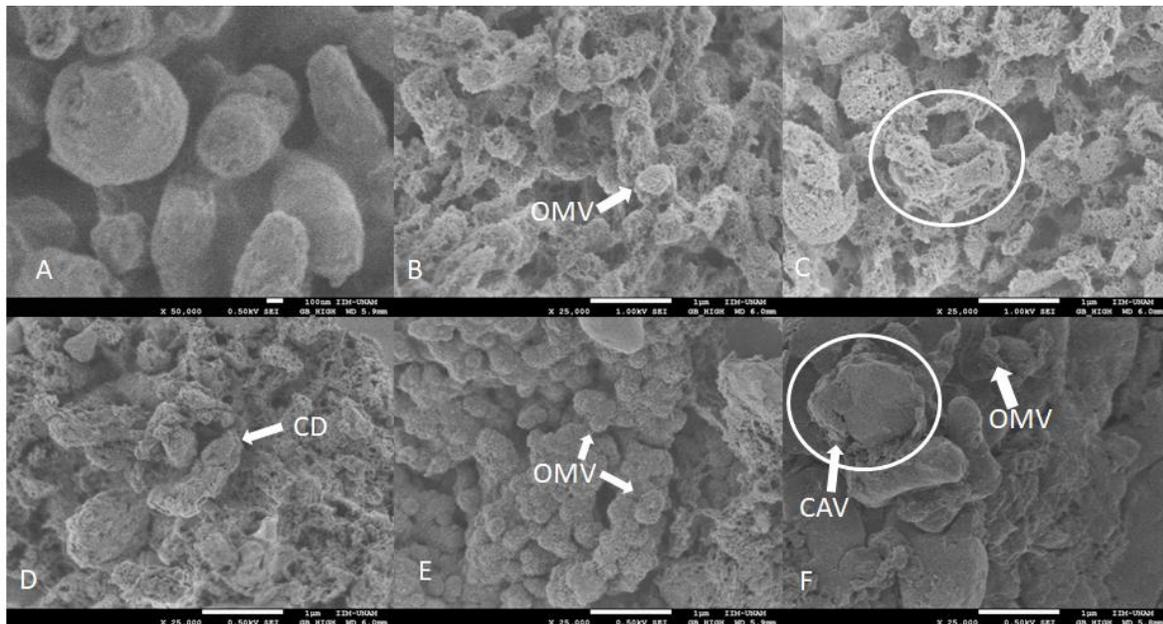
Ley de Chick – Watson:

$$\ln \frac{N_0}{N} = (-1.636 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{L} \times CT) + 0.018$$



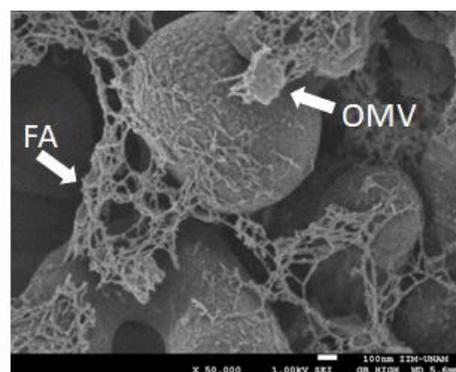
**Gráfica 9** Ley de Chick – Watson para el desinfectante ozono

En la Figura 50 se observan las microfotografías obtenidas de la desinfección con ozono sobre la bacteria *V. cholerae* cocoide. La fotografía A, muestra el Ct= 0 mg min L<sup>-1</sup>, la bacteria al inicio de la desinfección, se observa la morfología cocoide resultado de la inducción de la bacteria en agua de mar artificial (ASW). Las fotografías B a la F se muestran daños a la bacteria, principalmente destrucción del material celular, cavidades (CAV) en algunos casos, fibrillas de adhesión, presencia de material celular expulsado al exterior como las vesículas de membrana externa (OMV, outer membrane vesicles, por sus siglas en inglés). Como ya se ha mencionado, estos daños se han reportado por Thanomsub *et. al.*, (2002), Diao *et. al.*, (2004), Zhang *et. al.*, (2011) (OMV) y Román, (2013) (cavidades). A un valor de CT de 0.5 m min L<sup>-1</sup> se observa la destrucción total de la bacteria, siendo el valor de CT más bajo que se probó. En los CT siguientes (1.0, 1.5, 7.5 y 18) se observan restos de bacterias.



**Figura 50** Micrografías de la desinfección con ozono sobre *V. cholerae* VNC.  
(A) Ct=0 (B) Ct=0.5 (C) Ct=1.0 (D) Ct= 1.5 (E) Ct= 7.5 (F) Ct= 18.  
Ct en unidades de mg min L<sup>-1</sup>.

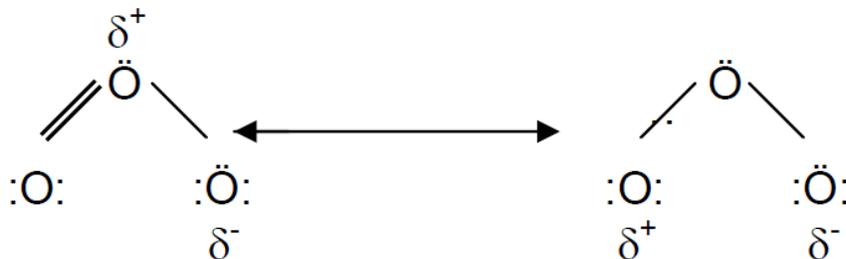
En la Figura 51 se observa un cocoide intacto, a un valor de Ct= 18 mg min L<sup>-1</sup>, este cocoide es una de las bacterias sobrevivientes a esta condición; se puede apreciar la presencia de fibrillas de adhesión (FA), éstas son la respuesta bacteriana al estrés oxidativo en este caso al tratamiento con ozono, este tipo de mecanismo ya ha sido reportado por Orta *et. al.* (2017) para *H. pylori* VNC expuesto a cloro y ozono y por Bridier *et. al.* (2013) observó material extracelular compuesto de estructuras fibrilares no eran aleatorias sino una red paralela orientada hacia la matriz, esta observación fue hecha para *Bacillus subtilis* por medio de microscopía FESEM.



**Figura 51** Cocoide a Ct= 18 mg min L<sup>-1</sup> para el desinfectante ozono

El daño mostrado en las imágenes indica destrucción en la mayoría de los casos, ya que el ozono es un desinfectante altamente oxidante y al primer contacto con la membrana provoca lisis celular, permitiendo la expulsión del material celular al medio exterior. Al observar las micrografías lo más evidente es la lisis total de las células, con esto se puede constatar la manera en que el ozono trabaja sobre los microorganismos, es decir el principal mecanismo del ozono es la lisis celular.

Para conocer qué especie está provocando la lisis celular en el proceso de desinfección con ozono, se midió el pH de la solución desinfectante obteniéndose un valor de 6.66 para la solución de 1 mg/L y de 6.55 para la solución de 0.5 mg/L, lo que indica que el ozono actúa por medio de la especie química  $O_3$ . Es decir, el ozono actúa de forma directa, como ozono molecular, en esta forma el ozono tiene dos formas de resonancia (Figura 52), lo cual hace que actúe como dipolo, agente electrofílico o nucleofílico. En este caso, actúa como agente nucleofílico, ya que, por este mecanismo de oxidación ataca a doble ligaduras entre carbono y nitrógeno (CONAGUA, 2007).



**Figura 52** Resonancia del ozono, CONAGUA, 2007

Siendo el efecto primario del ozono sobre los microorganismos el aumento de la permeabilidad citoplásmica de la membrana provocando la liberación de compuestos citoplásmicos como ATP, proteína y ácido nucleico (Hinze *et. al.*, 1987; Komanapalli y Lau 1996; Thanomsub *et. al.*, 2002).

En la Tabla 30, se muestra un resumen con los porcentajes de inactivación y la concentración residual de ozono para cada Ct probado; en la tabla de se observa que la concentración residual de ozono después del tiempo de desinfección en algunos puntos probados no cumple con el residual, sin embargo, se observa que la inactivación es muy alta y el daño que causa a la bacteria es muy alto.

Esto quiere decir que a la concentración de dosis infectiva ( $10^6$  células/mL) la aplicación de ozono es adecuada, ya que se mantienen un residual, así como la inactivación del patógeno en cuestión. En esta tabla se observa que para la menor concentración de desinfectante 0.5 mg/L y el menor tiempo de contacto se obtiene una reducción del 93.4% y se asegura un residual que está de acuerdo con lo establecido en la norma.

A valores de Ct mayores a  $1.5 \text{ mg min L}^{-1}$ , se observa una reducción bacteriana superior al 99%, sin embargo, debido a la baja saturación de ozono en el agua para tiempos mayores a  $7.5 \text{ mg min L}^{-1}$ , el residual de ozono no cumple con la norma. En sistemas de desinfección que usan el ozono como desinfectante, usualmente se añade cloro para mantener el residual y poder asegurar la calidad microbiológica del agua en el sistema de distribución de agua potable.

**Tabla 30** Desinfección con ozono sobre *V. cholerae* VNC

Ct	[O <sub>3</sub> ] <sub>inicial</sub>	Tiempo de contacto	Unidades bacterianas	log <sub>10</sub> (N <sub>0</sub> /N)	Porcentaje de inactivación	[O <sub>3</sub> ] <sub>residual</sub>
mgmin L <sup>-1</sup>	mg/L	min	N	----	%	mg/L
0	0	0	73500	0.0	0.0	----
0.5	0.5	1	13700	0.73	81.36	0.49
1	1	1	878	1.92	98.81	0.875
1.5	0.5	3	345	2.33	99.53	0.053
7.5	1	7.5	114	2.81	99.84	0.375
18	1	18	35	3.32	99.95	0.089

En la Tabla 31, se muestran dosis de ozono aplicadas a diferentes contaminantes de agua, se considera que 1 ppm = 1 mg/L. Comparando las dosis usadas de ozono en este trabajo con lo reportado, el microorganismo más usado como control para monitorear la calidad microbiológica del agua. Las dosis usadas van de 0.239 mg/L y 0.53 mg/L, por lo que las usadas en este estudio (0.5 mg/L y 1 mg/L) están por encima de lo calculado teóricamente.

**Tabla 31** Dosis de ozono para diversos contaminantes en agua (CONAGUA; 2007)

Aplicación	Dosis teórica de ozono (ppm)	Dosis real de ozono (ppm)
Fe <sup>2+</sup>	0.43	0.14 – 0.5

Mn <sup>2+</sup>	0.88	0.5 – 1
S <sup>2-</sup>	0.6	0.6 – 1.5
Bacteriófagos f2	0.033	
Carbón orgánico total	0.3 – 0.4	
Carbón orgánico disuelto	1 – 2 mg/L O <sub>3</sub> / mg/L carbón orgánico disuelto	
Coliformes fecales		3 – 5
Color	1 – 3	
<i>Escherichia coli</i>	0.53	
<i>Escherichia coli</i>	0.239	
Virus Coxsade	0.51	
Virus polio	0.012	
Virus polio	0.015	
Virus Porcine Pigina	0.024	

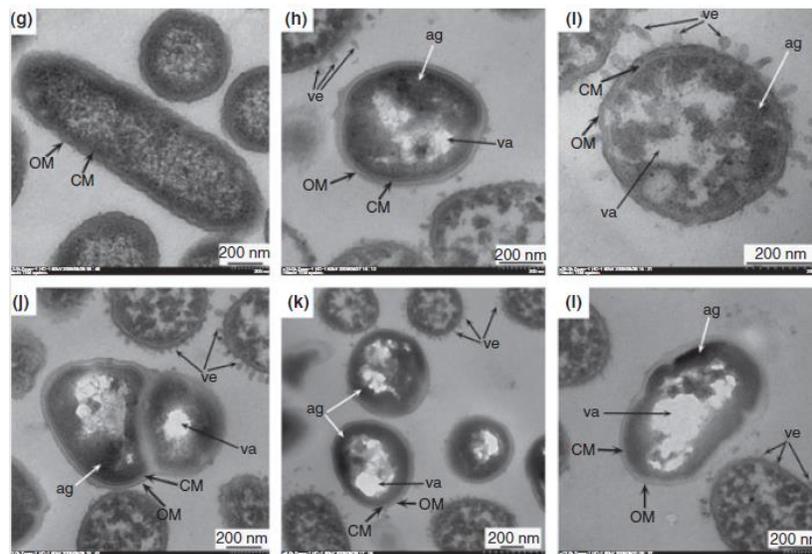
De acuerdo con las cinéticas de desinfección para cloro y ozono determinadas a partir de los valores de q-PCR-PMA, se observa que en la ecuación de la línea recta de la ley de Chick y Chick – Watsn alcanza mayores unidades logarítmicas inactivadas para el ozono. por ejemplo, a un CT de 1.5 min mg L<sup>-1</sup> para ambos desinfectantes, a este punto se usó una concentración de 0.5 mg/L y un tiempo de contacto de 3 minutos, se tiene una mayor inactivación por parte del ozono de 2.33 log (99.53%) y del cloro es de 1.18 log (93.4%), siendo el ozono un desinfectante más eficaz que el cloro.

En la desinfección con cloro las pruebas de viabilidad usando q-PCR-PMA mostraron que para lograr una reducción de 3.35 log (N<sub>0</sub>/N) se requiere un valor Ct de 15 mg min L<sup>-1</sup>, este valor es muy similar al obtenido con ozono que requiere un Ct= 18 mg min L<sup>-1</sup>. Chaiyanan *et. al.* (2001) encontró que células de *V. cholerae* en estado VNC expuestas a cloro, conservan viabilidad hasta un año, además de que persisten los genes asociados con la patogenicidad junto con la integridad cromosómica.

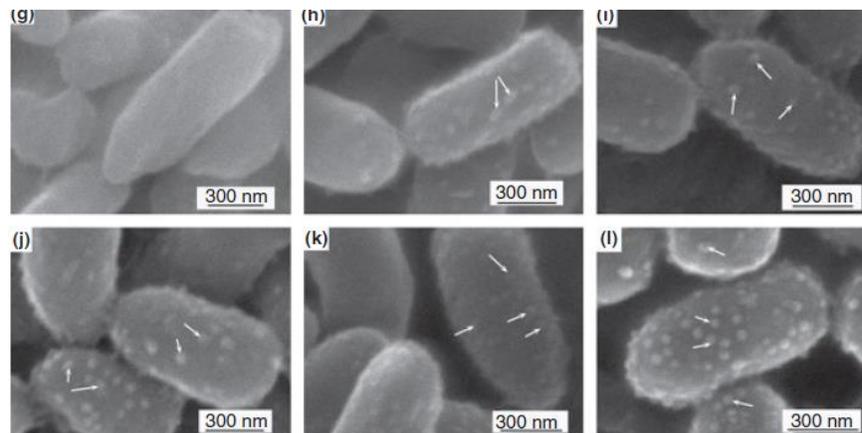
Existen reportes de que la cloración puede inducir el estado VNC de algunas bacterias, tal es el caso de *E. coli* para la cual se ha reportado que 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cloro puede reducir efectivamente el desarrollo de la bacteria en medios de cultivo, es decir en estado viable cultivable pero que se induce un estado VNC. Otras bacterias como *Listeria*

*monocytogenes* y *Salmonella enterica* sometidas a lavado con cloro (hasta 50 y 100 mg/L) adquirieron el estado VNC (Highmorea *et. al.*, 2018). Al respecto, algunos autores concuerdan en que *H. pylori* puede formar biopelícula como respuesta a la exposición al cloro (Moreno *et. al.*, 2007; Gião *et. al.*, 2010; Casasola *et. al.*, 2013; Santiago *et. al.*, 2015 y Orta *et. al.*, 2017).

En el caso de ambos desinfectantes se observa la presencia de OMV, en 2011, Zhang *et. al.*, realizó desinfección con ozono sobre *Pseudomonas aeruginosa*, observó la desinfección mediante microscopía SEM y TEM. En las figuras 53 y 54, se percibe aglutinación del citoplasma y permeabilidad de la membrana, además de que la estructura de la membrana es más lisa y delgada. También se observan vesículas que son compuestos celulares que se filtran de las células durante la ozonización indicando permeabilidad de la membrana. Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado por Orta *et. al.*, en 2017 para *H. pylori* cocoide VNC. Estas OMV han sido reportadas en casos clínicos de *H. pylori* como respuesta a la exposición a los antibióticos (Fiocca *et. al.*, 1999), e incluso por jugar un papel importante en la formación de biopelícula (Yonesawa *et. al.*, 2009), y más recientemente, las OMV actúan como un mecanismo de defensa que confiere protección a *V. cholerae* al tratamiento con fagos (Reyes Robles, 2018). Sin embargo, para células VNC de *V. cholerae* no ha habido informes previos sobre la presencia de OMV en respuesta a la exposición al ozono.



**Figura 53** *Pseudomonas aeruginosa* tratada con ozono, observación por microscopía TEM  
Fuente: Zhang *et. al.*, 2011



**Figura 54** *Pseudomonas aeruginosa* tratada con ozono, observación por microscopía SEM  
Fuente: Zhang *et. al.*, 2011

### **Análisis estadístico**

A continuación, se presenta el análisis estadístico relativo a la eficacia del proceso de desinfección con cloro y ozono en el análisis de q-PCR-PMA, que incluye tabla de análisis de varianza ANOVA; pruebas de comparación de Tukey y gráficas de interacción. Este análisis se realizó con la ayuda del software RStudio, en el anexo C se incluye el programa realizado en RStudio.

Recapitulando, el modelo matemático para un diseño Factorial, balanceado, 2x6 está descrito por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_k + \gamma_j + \xi_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, \dots, 6$$

$$j = 1, 2$$

$$k = 1, 2, 3$$

Dónde:

- $\mu$  Media general
- $\alpha_k$  Efecto del factor concentración del desinfectante k-ésimo
- $\gamma_j$  Efecto del factor tiempo de contacto j-ésimo
- $\xi_{jk}$  Efecto de la interacción de los factores concentración de desinfectante y tiempo de contacto
- $\varepsilon_{ij}$  Error experimental de la unidad experimental

En las Tablas 32 y 33 se muestran las Tablas de análisis de varianza ANOVA para la desinfección realizada para cloro y ozono.

- **Desinfectante: cloro**

**Tabla 32** ANOVA para la desinfección con cloro

Respuesta: bacterias intactas

Factor de varianza	Grados de libertad	Sum Sq	Mean Sq	F valor	P-valor
Tiempo	5	8.3044 x10 <sup>10</sup>	1.6609 x10 <sup>10</sup>	673591614	<2x10 <sup>-16</sup> ***
Concentración	1	0.00	0.00	0	1
Error	28	6.9 x10 <sup>2</sup>	2.5 x10 <sup>1</sup>		
Total	34	8.3044x10 <sup>10</sup>			

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

De RStudio con el comando qf, se obtiene el valor de F de tablas, para el factor tiempo es de 0.2219882, para concentración es de 0.004003258. Al compararlo con los valores obtenidos de la tabla ANOVA se tiene:

$F_{value} < F_{tabla}$ , se acepta la hipótesis de que el no factor influye en la variable de respuesta.

Para el factor tiempo  $F_{value} > F_{tabla}$ , por lo tanto, influye en la variable de respuesta y para el factor concentración  $F_{value} < F_{tabla}$ , por lo que este factor no influye en la variable de respuesta. Esto también se puede concluir a partir de los valores de P, siendo el del factor tiempo altamente significativo. De la tabla ANOVA se concluye que el tiempo es el factor es el que más efecto tiene sobre el proceso de desinfección. En la tabla ANOVA no se observa que haya interacción entre los factores, sin embargo, esto se comprobará con una prueba de comparación de Tukey y por gráficas de interacción.

A continuación, se muestra la comparación de Tukey para el factor tiempo, se llegó a este cuadro comparativo considerando un valor P <0.05, así todas las comparaciones que no eran iguales estaban por debajo de este valor. Debido a que no hay interacción entre los factores, solo se muestra la comparación dentro del mismo factor. El cuadro comparativo

presentado solo resume si entre los factores hay semejanza, los datos completos que RStudio arroja en la salida de cómputo se encuentran en el anexo D.

Cuadro comparativo para el factor tiempo

Tiempo	Media	Conclusión
30	27.4	a
20	48.6	b
3.5	626.6	c
15	645.4	d
3	7216.6	e
0	109413.6	

Cuadro comparativo para el factor concentración

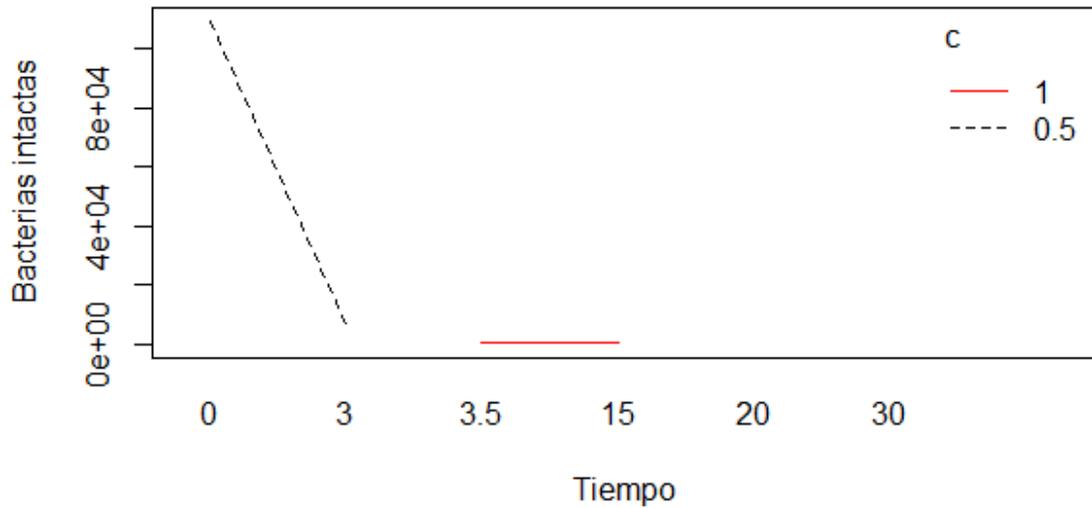
Concentración	Media	Conclusión
1.0	27678.25	a
0.5	38892.93	b

De la conclusión designada por una letra, se observa que no hay comparación entre los niveles del factor tiempo ni para los niveles del factor concentración.

A continuación, se presentan las Gráficas 10 y 11, correspondientes a la interacción entre factores. Como ya se había mencionado antes, en dichas gráficas se comprueba que no existe interacción entre los factores, es decir el efecto del tiempo de contacto y la concentración no son aditivos en la inactivación de la bacteria.

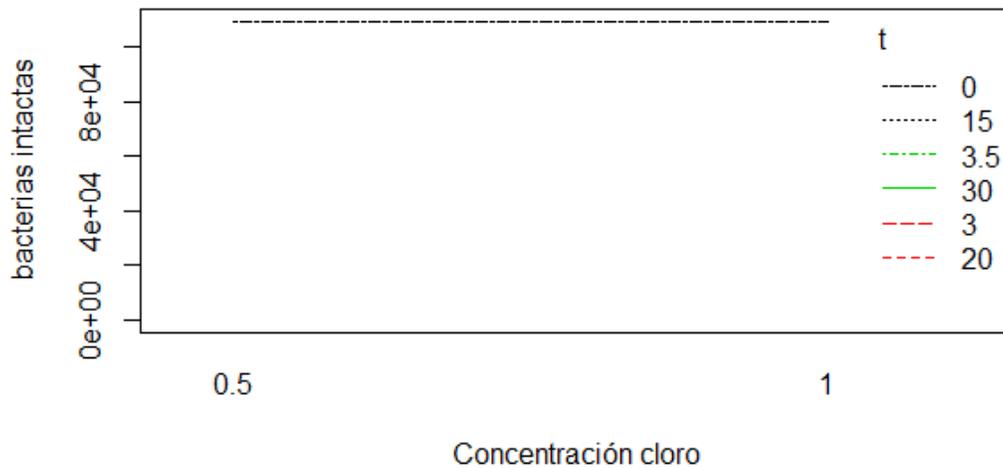
En las Gráficas 10 y 11, se observa que los factores tiempo y concentración no tienen interacción, en este caso el modelo estadístico considera una interacción aditiva, es decir que el efecto de ambos factores se suma. En el caso de la Gráfica 10, en la que se observa el efecto del tiempo sobre la cantidad de bacterias intactas, no se observa interacción entre las concentraciones de desinfectante usadas y el tiempo de contacto. En la Gráfica 11, se observa el mismo comportamiento, por lo que se concluye que en el caso del desinfectante cloro no hay adición de los efectos que la concentración y el tiempo de contacto pudieran tener sobre la cantidad de bacterias intactas al final de la desinfección.

### Gráfica de interacción



Gráfica 10 Interacción con respecto al tiempo para la desinfección con cloro

### Gráfica de interacción



Gráfica 11 Interacción con respecto a la concentración para la desinfección con cloro

- **Desinfectante: Ozono**

A continuación, en la Tabla 33, se muestra el ANOVA correspondiente a la desinfección con ozono.

**Tabla 33** ANOVA para la desinfección con ozono

Respuesta: bacterias intactas

Factor de varianza	Grados de libertad	Sum Sq	Mean Sq	F valor	P valor
Tiempo	4	3.5634x10 <sup>10</sup>	8908575346	177406.7	<2.2x10 <sup>-16</sup> ***
Concentración	1	2.0653x10 <sup>8</sup>	206531645	4112.9	<2.2x10 <sup>-16</sup> ***
Tiempo:Concentración	1	2.0653x10 <sup>8</sup>	206531645	4112.9	<2.2x10 <sup>-16</sup> ***
Error	28	1.4060x10 <sup>6</sup>	50216		
Total	34	3.6049x10 <sup>10</sup>			

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

De RStudio con el comando `qf`, se obtiene el valor de F de tablas, para el factor tiempo es de 0.1737903, para concentración es de 0.004003258 y para la interacción de tiempo: concentración es de 0.004003258. Primero se analizará la interacción, ya que en este caso ésta existe, de la tabla ANOVA se tiene:

Para la interacción se observa que  $F_{value} > F_{tabla}$ , por lo tanto, influye en la variable de respuesta por lo que se descarta el efecto que los factores individualmente pudieran tener sobre la variable de respuesta. Para conocer la interacción, se comparará haciendo una prueba de Tukey y por gráficas de interacción.

A continuación, se muestra la comparación de Tukey para la interacción del factor Tiempo: Concentración, se llegó a este cuadro comparativo considerando un valor  $P < 0.05$ , así todas las comparaciones que no eran iguales estaban por debajo de este valor. El cuadro comparativo presentado solo muestra si entre los factores hay semejanza, los datos completos que RStudio arroja en la salida de cómputo se encuentran en el anexo D.

Cuadro comparativo para la interacción de los factores Tiempo (t): Concentración (c)

Interacción	Conclusión
-------------	------------

t:c		
0 – 1	a	
0 – 0.5	a	
1 – 0.5	b	
1 – 1	c	
3 – 0.5	d	
7.5 – 1	d	e
18 – 1	d	e

De la comparación de Tukey se observa que las interacciones del tiempo 0 minutos con ambas concentraciones de desinfectantes son iguales, esto debido a que son el blanco es decir la bacteria sin aplicación de desinfectante.

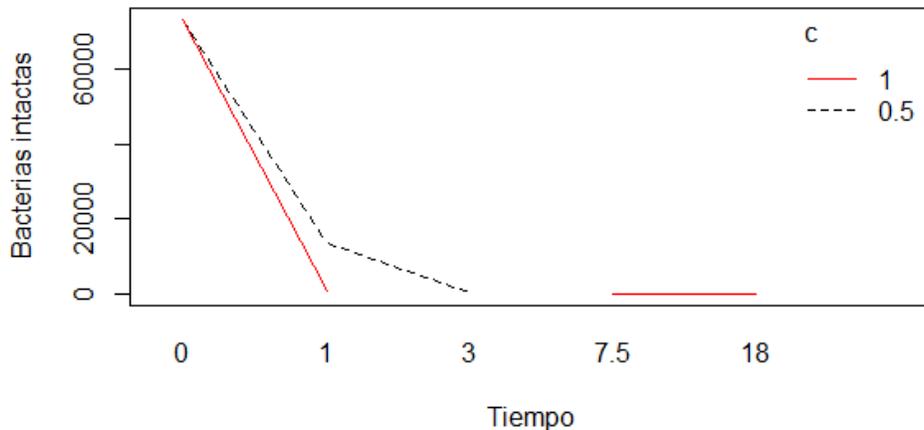
En cuanto a las interacciones de 3 min – 0.5 mg/L, 7.5 min – 1 mg/L y 18 min – 1 mg/L, estadísticamente son iguales, tal vez la media de las observaciones correspondientes, presentada en la Tabla 29, no son idénticas o parecidas, sin embargo al realizar el análisis del porcentaje de bacterias inactivadas a las combinaciones de factores ya mencionadas, se observa que tienen inactivaciones superiores al 99% (ver Tabla 30), por lo que las combinaciones ya descritas, se pueden considerar iguales a nivel estadístico, sin embargo, a nivel de desinfección un decimal en el porcentaje de inactivación conlleva a una mayor cantidad de bacterias inactivadas. Lo mismo se concluye a partir del cuadro comparativo para las combinaciones de 7.5 min – 1 mg/L y 18 min – 1 mg/L, que según la prueba de Tukey indica que son iguales estadísticamente.

A continuación, se presentan las Gráficas 12 y 13, correspondientes a la interacción entre factores. Como ya se había mencionado antes, en dichas gráficas se comprueba que existe la interacción entre los factores concentración de desinfectante y tiempo de contacto. La Gráfica 12 muestra como interactúan los pares de combinaciones 0 minutos con ambas concentraciones de desinfectantes, indicando interacción. Lo mismo sucede con los factores 3 min – 0.5 mg/L, 7.5 min – 1 mg/L y 18 min – 1 mg/L. Si se traza la interacción respecto a la concentración de ozono no muestra de manera clara la interacción entre factores, es decir el efecto que el tiempo de contacto y la concentración de desinfectante influyen de manera combinada en la inactivación e la bacteria.

En la Gráfica 12, se observa que el factor concentración igual a 1 mg/L a un valor de tiempo 1 minutos tiene una alta reducción de bacterias intactas, mientras que para el valor de concentración de 0.5 mg/L se alcanza la mayor disminución de bacterias al tiempo 3 minutos, por lo que ambos factores de suman al efecto causado sobre las bacterias posterior al proceso de desinfección.

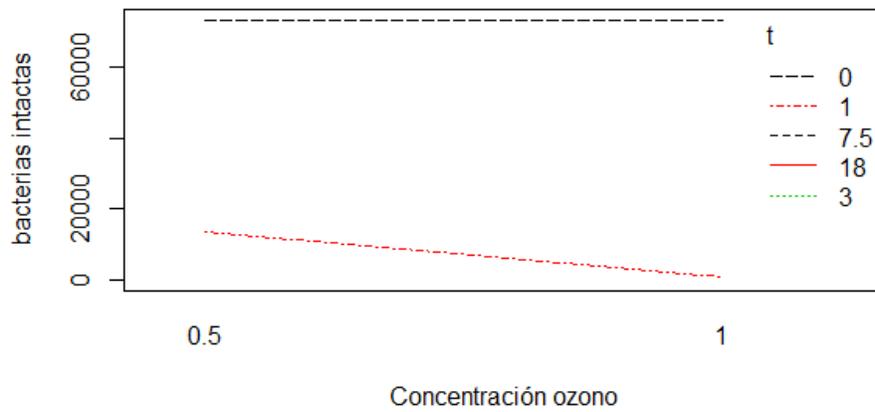
En la Gráfica 13, solo se observan graficados los tiempos de contacto de 0 minutos y 1 minuto, los otros no se observan ya que para estos tiempos de contacto la reducción de bacterias intactas es muy similar, sin embargo, se observa el efecto aditivo del efecto que tiene la concentración de desinfectante y el tiempo de contacto.

**Gráfica de interacción**



**Gráfica 12** Interacción con respecto al tiempo para la desinfección con cloro

Gráfica de interacción



Gráfica 13 Interacción con respecto a la concentración para la desinfección con ozono

## 8. Conclusiones

- La inducción de *V. cholerae* de su estado viable cultivable a un estado viable no cultivable (VNC) se logró a los 32 días en agua de mar artificial. Se comprobó que la bacteria cambia de una morfología de bacilo a una forma cocoide al adquirir un estado VNC cuando se encuentra ante condiciones adversas como mecanismo de supervivencia.
- Con la aplicación de la técnica de biología molecular q-PCR-PMA, fue posible determinar que con un CT de 1.5 se logra inactivar 2.33 log (99.53%) de unidades bacterianas de *V. cholerae* en estado VNC utilizando ozono. Mientras que con el mismo CT fue posible inactivar sólo 1.18 log (93.4%) de la bacteria usando cloro. Por lo que se necesitan menores tiempos de contacto para el ozono que para el cloro, logrando mejores porcentajes de inactivación.
- La cinética de reacción indica que la velocidad de inactivación es directamente proporcional al número de microorganismos que sobreviven a un tiempo  $t$ , en el caso del ozono la velocidad de inactivación es más alta que la del cloro. Esto demostrado con la ecuación de la línea recta de la cinética que utiliza como variable dependiente el valor  $Ct$ , con esta ecuación se puede calcular que para alcanzar una reducción de 2 logaritmos se necesita un valor de  $Ct=8.2 \text{ mg min L}^{-1}$  para el cloro y un valor de  $Ct=1.2 \text{ mg min L}^{-1}$ ; demostrando que el ozono es más rápido inactivando microorganismos comparado con el cloro.
- Para los desinfectantes usados, se observa que en el estado VNC, el cloro causa menores daños que el ozono, esto se pudo comprobar con las micrografías FESEM y con los datos de la q-PCR-PMA. De acuerdo con las micrografías el mecanismo de acción del cloro se manifiesta en una la alteración de la permeabilidad de la membrana de la bacteria y para el ozono se observó una la lisis celular. Además de que se pudo hacer la observación de que la bacteria al contacto con los desinfectantes tiende a expulsar material celular al exterior.

## 9. Glosario

**Acidosis metabólica.** Pérdida de bicarbonato por vía digestiva (Secretaría de Salud, manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México).

**Antígeno.** Molécula capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos. Esta definición amplía el concepto de antígeno más allá del concepto clásico que definía antígeno como la sustancia que desencadena la producción de anticuerpos. (<http://medmol.es/glosario/107/>)

**Catalasa positiva.** Es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. ([http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa\\_oxidasa.htm](http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm))

**Choque hipovolémico.** Conforme empeora la pérdida hidroelectrolítica se desarrolla un estado de choque; la tensión arterial cae; el pulso se vuelve filiforme y puede ser indetectable; el sujeto presenta sudoración fría y pegajosa y acrocianosis distal, es frecuente que manifieste dolor abdominal y en las extremidades debido a calambres musculares (Secretaría de Salud, manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México).

**Cianótico.** Coloración azul violáceo que se presenta en cara, labios, etc. ([http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Cianotico](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Cianotico))

**Cocépedo.** Subclase de crustáceos maxilópodos de tamaño muy pequeño, en ocasiones microscópicos de los que se conocen unas 12 000 especies. Carecen de caparazón, la gran mayoría son de cuerpo transparente, tienen un solo ojo, las antenas principales son articuladas y mucho mayores que las secundarias. Los caracteriza poseer 4 pares de apéndices torácicos que les sirven para nadar (<https://www.ecured.cu/Cop%C3%A9podos>).

**Patógeno oportunista.** Organismo que existe en forma inofensiva formando parte del ambiente del cuerpo humano y no se convierte en una amenaza para la salud hasta que fracasa el sistema inmunitario corporal (<https://diccionario.medciclopedia.com/p/patogeno-oportunista/>)

**Serogrupo.** Es la agrupación de serotipos según sus principales afinidades antigénicas reveladas en la prueba de aglutinación cruzada (Llop, 2001).

**Serotipo.** Es la unidad taxonómica básica en uso, representada actualmente por una cepa de referencia (Llop, 2001).

## 10. Bibliografía

1. ACC. (2016). *Drinking water chlorination, a review of disinfection practices and issues*. Mayo 2017, de American Chemistry Council Sitio web: <https://chlorine.americanchemistry.com/Chlorine-Benefits/Safe-Water/Disinfection-Practices.pdf>
2. Alonso, R. M. y Constans, A. (2001). *Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con bacteria*. Noviembre 2016, de Ministerio de Trabajo y asuntos sociales España Sitio web: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp\\_p\\_585.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_p_585.pdf)
3. Alyamani, A. y Lemine, O. M. (2012). *FE-SEM Characterization of Some Nanomaterial*, Scanning Electron Microscopy Viacheslav Kazmiruk, IntechOpen,. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/fe-sem-characterization-of-some-nanomaterials->
4. Ávalos Rendón, T. L., (2006) Scanning Electron Microscopy SEM, acceso 25 octubre 2018, Centro de Ciencias de la Materia Condensada, UNAM, Sitio web: [https://www.cnyn.unam.mx/~wencil/Cursos/Fenomenos%20de%20superficies/SEM\\_Tatiana.pdf](https://www.cnyn.unam.mx/~wencil/Cursos/Fenomenos%20de%20superficies/SEM_Tatiana.pdf)
5. Avilés, M., y Montellano, L. (s.f.). *Identificación de sistemas de desinfección de aguas residuales*. Octubre 2016, de CONAGUA e IMTA Sitio web: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/5.2.13%20Identificaci%C3%B3n%20de%20sistemas%20de%20desinfecci%C3%B3n%20de%20aguas%20residuales.ppsx>.
6. Bader H, Hoigné J (1981) *Determination of ozone in water by the indigo method*. Water Research Vol. 15, pp. 89 – 112
7. Baker, R. M., Singleton, F. L., Hood, M. A. (1983) *Effects of Nutrient Deprivation on Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 46, pp. 930 – 940
8. Birsall CM, Jenkins AC, Spadinger E (1952) *Iodometric determination of ozone*. Analytical Chemistry 24(4), 662-664.
9. BIOTUM (2017), *PMA dye*, octubre 2017, de Biotum, sitio web: <https://biotium.com/product/pmatm-dye-propidium-monoazide/>
10. Bridier, A., Meylheuc, T., Briandet, R. (2013) *Realistic representation of Bacillus subtilis biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM)*. Micron. Vol. 48, pp. 65 – 69
11. Carrillo, G. (2015), *Alerta de cólera en México*, enero 2017, <http://www.cucs.udg.mx/principal/noticias/archivo-de-noticias/alerta-de-c-lera-en-m-xico>
12. Casasola-Rodríguez, B., Orta de Velásquez, M. T., Luqueño-Martínez, V. G., Monje-Ramírez, I. (2013) *Quantification of Helicobacter pylori in the viable but nonculturable state by*

*quantitative PCR in water disinfected with ozone*. Water Science Technology. Vol. 68, pp. 2468 – 2472

13. Casasola Rodríguez, B. (2018) *Evaluación de la resistencia del estado viable no cultivable de Helicobacter pylori y Vibrio cholerae a la desinfección con cloro y ozono mediante el uso de técnicas moleculares*. Tesis Doctorado, Instituto de Ingeniería. UNAM. pp. 83 – 138

14. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2013) *Brote de cólera en México. Informe de situación y evaluación del riesgo para España*, España, marzo 2017 [https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/CCAES\\_Colera\\_Octubre2013.pdf](https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/CCAES_Colera_Octubre2013.pdf)

15. Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T., Colwell, R. R. (2001) *Viability of the nonculturable Vibrio cholerae O1 and O139*. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 24, pp. 331 – 341

16. Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Grim, C., Maugel, T., Huq, A., Colwell, R. R. (2007) *Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable Vibrio cholerae*. Environmental Microbiology Vol. 9, pp. 393 – 402

17. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California, *Manual técnico de desinfección poscosecha, Programa de inocuidad alimentaria*, SAGARPA, disponible en línea: <http://www.cesavebc.com/PIA/documentos/Manual%20de%20desinfeccion.pdf>

18. CONAGUA (2007), *Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento, desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento*, México, pp. 27 – 140

19. CONAGUA. (2015). *Estadísticas del agua en México*. Septiembre 2016, de CONAGUA Sitio web: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EAM2015.pdf>

20. CONAGUA. (2017). *Estadísticas del agua en México*. Septiembre 2018, de CONAGUA Sitio web: [http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM\\_2017.pdf](http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2017.pdf)

21. CONAVE. (2016). *Situación epidemiológica de cólera*. marzo 2017, de CONAVE Sitio web: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225120/AE\\_Colera\\_191016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225120/AE_Colera_191016.pdf)

22. Diao H. F., Li, X. Y., Gu, J. D., Shi, H. C., Xie, Z. M., (2004) Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reacción, Process Biochemistry, Vol. 39, pp. 1421 – 1426.

23. Díaz y Serrano (2002), *Desinfección de agua con luz ultravioleta*, México, octubre 2016, <http://www.oocities.org/mx/ionopura/3-4-02diaz.pdf>

24. Díaz S. A., Flores R. L., Aportela C. J., Sierra P. E. (2014). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. Septiembre 2016, de ResearchGate Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/266856169\\_PCR\\_reaccion\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa)

25. Duncan, M., Nigel, H. (2003), *Handbook of water and wastewater microbiology*, Reino Unido, Academic Press, p. 59

26. Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S., Molmeret, M. (2008) *A PCR-Based method for monitoring Legionella pneumophila in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability*, Applied and Environmental microbiology, Vol. 74 p. 4817 – 4824
27. EPA (1999) *Wastewater technology fact sheet, Ozone disinfection*, noviembre 2017, de EPA, sitio web: <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/ozon.pdf>
28. Farfán S. M. (2002), *Estudio de la estructura genética de poblaciones de Vibrio cholerae*, Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, pp. 29 – 30
29. Fernández F, S., y Alonso, G. (2009). *Cólera y Vibrio cholerae*. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Vol. 40, p. 50-69.
30. FIBAO. (2007). *Electroforesis en gel*. Noviembre 2016, de Medicina molecular Sitio web: <http://medmol.es/tecnicas/68/>
31. Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L., Solcia, E. (1999) *Release of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium*. Journal of Pathology. Vol. 188, pp. 220 – 226
32. Flores, J.J. (1990), *Cólera: aspectos microbiológicos, epidemiológicos y clínicos*, Rev. Biomédica, Vol. 1 p. 211 – 225
33. Flores, J. L., Martínez J. C., Casillas F. J. (1999). *Manual de buenas prácticas de higiene y seguridad*. Octubre 2016, de Secretaría de Salud Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/sanidad.html>
34. Garza-Velasco, R., Peniche-Quintana, E., Manero-Brito, S. M. (1998). *Bacterias de moda*. Mayo 2017, de Facultad de Química, UNAM Sitio web: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-bacteriasdemoda.pdf>
35. Garrity, G., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, segunda edición. Volume 2, The Gammaproteobacteria* USA: Springer US. pp. 494 – 545
36. Gião, M. S., Azevedo, N. F., Wilks, S. A., Vieira, M. J., Keevil, C. W. (2010) *Effect of chlorine on incorporation of Helicobacter pylori into drinking water biofilms*. Applied and environmental microbiology. Vol. 76, pp. 1669 – 1673
37. González, L. M.; Casanova, M. C.; Pérez, J. (2011), *Cólera: historia y actualidad*. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río, Vol. 15, p. 280 – 294
38. González-Escalona, N., Fey, A., Höfle, M. G., Espejo, R. T., Guzmán, C. A. (2006) *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of Vibrio cholerae cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock*. Environmental Microbiology Vol. 6, pp. 658 – 666

39. Gyürék L. L., Finch G. R. (1998), *Modeling water treatment chemical disinfection kinetics*, Journal of Environmental Engineering., Vol 124: p. 783 – 793
40. Highmorea, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A., Keevil, C. W. (2018). *Viable-but-nonculturable Listeria monocytogenes and Salmonella enterica serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious*. mBio. Vol. 9, pp. 1 – 12
41. Hinze, H., Prakash, D., Holzer, H. (1987). *Effect of ozone on ATP, cytosolic enzymes and permeability of Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology. Vol. 147, pp. 105 – 108
42. Hood, M. A., Guckert, J. B., White, D. C., Deck, F. (1986) *Effect of Nutrient Deprivation on Lipid, Carbohydrate, DNA, RNA, and Protein Levels in Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52, pp. 788 – 793
43. Howard K., Inglis T. (2003) *The effect of free chlorine on Burkholderia pseudomallei in potable water*, Water Research, Vol. 37 p. 4425 – 4432
44. Iáñez Pareja, E. (1998). *Acción de los agentes químicos sobre las bacterias*. Octubre 2016, Sitio web: [http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/19\\_micro.html](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/19_micro.html)
45. Iphorki, M. y Bozzano, P. B., (2013) *Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales*. Ciencia e investigación, tomo 63, número 3, pp. 43 – 53
46. Komanapalli, I. R., Lau, B., H. (1996) *Ozone-induced damage of Escherichia coli K-12*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 46, pp. 610 – 614
47. Le Dantec C., Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S., Vincent V. (2001), *Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system*, Applied and environmental microbiology. Vol 68, p. 1025 – 1032
48. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004). *Brock. Biología de los Microorganismos*. España: Prentice Hall-Pearson Education., pp. 613 – 619
49. Mantell, C. L. (1980), *Ingeniería electroquímica*, Reverté, España. pp. 529 – 544
50. McCarthy, S. A. (1996) *Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic Vibrio cholerae O1 in Seawater*. Microbiology. Ecology. Vol. 31, pp. 167 – 175
51. Metcalf y Eddy (1996), *Ingeniería de las aguas residuales tratamiento, vertido y reutilización*, Vol. 1, tercera edición, pp. 311 – 337
52. Mezule L., Tsyfansky S., Yakushevich V., Juhna T. (2008) *A simple technique for water disinfection with hydrodynamic cavitation: Effect on survival of Escherichia coli*, Desalination Vol. 248, p. 152 – 159
53. Mihelcic J. R., Zimmerman J. B. (2012), *Ingeniería ambiental, Fundamentos, sustentabilidad, Diseño*. Alfaomega, México, p. 440
54. Miranda M. (2005) *Estudio y evaluación del poder germicida de compuestos de plata en aguas residuales parcialmente tratadas*. Tesis Maestría, Facultad de Química. UNAM. pp. 19 – 21

55. Mirande, B. C. Tracanna, C. T. Seeligmann, R. Cangemi, O. Aulet, M. Cecilia, C. Silva y N. Binsztein. (2007). *Ecología de Vibrio cholerae en relación al Fitoplancton y variables fisicoquímicas en ríos de Tucumán (Argentina)*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, Vol. 42 p. 195 – 209
56. Mishra, A., Taneja, N., Sharma, M. (2012) *Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable Vibrio cholerae O1 in freshwater microcosm*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 112, pp. 945 – 953
57. Molina López, J., Uribarren Berrueta, T. (2015). *Generalidades de bacterias*. Marzo 2017, de Facultad de Medicina, UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
58. Mondaca M. A., Campos V. (2014). *Riesgo de enfermedades transmitidas por el agua en zonas rurales*. Enero 2017, de Pan American Health Organization Sitio web: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd57/riesgo.pdf>
59. Montoya Villafañe, H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, pp. 205 – 207
60. Moore L. R., Coe, A., Zinser, E. R., Saito, M. A., Sullivan, M. B., Lindell, D., Frois-Moniz, K., Waterbury, J., Chisholm, S. W. (2007). *Culturing the marine cyanobacterium Prochlorococcus*. Limnology and Oceanography.: Methods, Vol. 5, p. 353 – 362
61. Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J. L., Jiménez, A., González, A, Ferrús, M. A. (2007) *Survival and viability of Helicobacter pylori after inoculation into chlorinated drinking water*. Water Research. Vol. 41, pp. 3490 – 3496
62. Nieto López, M. G. (2010) *Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido*, ECOSUR, México, p. 24
63. Nocker, A., Sossa, K. E., Camper, A. K. (2007) *Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR*, Journal of microbiological methods Vol. 70, p. 252 – 260
64. NOM-127-SSA1-1994, *Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*, septiembre 2016, de Secretaría de Salud, Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
65. Oliver, J. D. (2000). *The viable but nonculturable state and cellular resuscitation*, p. 723 – 730. In C. R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (ed.), *Microbial biosystems: new frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
66. Oliver J. D. (2005). *The viable but nonculturable state in bacteria*. The Journal of Microbiology, Vol 43, p. 93 – 100
67. OMS (2005), *Manual de bioseguridad en el laboratorio*, Octubre 2016, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: [http://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf)

68. OMS. (2006). *Aspectos microbiológicos*. En Guías para la calidad del agua potable (398 p). Suiza: OMS. pp. 105 – 108
69. OMS. (2016). Agua. Octubre 2016, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
70. OMS (2016). Cólera, Octubre 2016, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es/>
71. OMS (2017). *Epidemias mundiales e impacto del cólera*, Febrero 2017, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/topics/cholera/impact/es/>
72. OPS (1984), *Criterios de salud ambiental 14: radiación ultravioleta*. Organización Mundial de la salud y la Asociación Internacional para la Protección Contra Radiaciones, 109 p.
73. OPS. (2004). *Tratamiento de agua para consumo humano, Plantas de filtración rápida, Manual I: Teoría Tomo I*. Febrero 2017, de Pan American Health Organization Sitio web: [http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manuall/tomol/ma1\\_tomo1\\_indice.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manuall/tomol/ma1_tomo1_indice.pdf)
74. Orozco Barrenetxea, C., Pérez Serrano, A., González delgado, M. N., Rodríguez Vidal, F. J., Alfayate Blanco, J. M., (2011). Contaminación ambiental. Una visión desde la química. España, Ediciones Parainfo, SA., pp. 159 – 161
75. Orta M. T., Rojas Valencia M. N., Ayala A. (2008). *Wastewater disinfection using ozone to remove free-living, highly pathogenic bacteria and amoebae*. Ozone: science & engineering, Vol. 30, p. 367 – 375
76. Orta de Velásquez, M. T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B., Román Román, P. I. (2017) *Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC Helicobacter pylori by molecular techniques and FESEM images*, Environmental technology. Vol. 38 p. 744 – 753
77. Orta, M. T., Díaz P. V., Aparicio, G. (1996) *Desinfección de agua potable contaminada con Vibrio cholerae adaptada al cloro*. Febrero 2017, de Pan American Health Organization Sitio web: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/mexico/02392e14.pdf>
78. Percival, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P. (2004). *Microbiology of waterborne diseases*. Gran Bretaña: Elsevier. pp. 197 – 205
79. Reasoner, D. J. (1998). *Agentes patógenos en el agua potable - Estado actual y perspectiva*. Octubre 2016, de Pan American Health Organization Sitio web: <http://www.bvsde.paho.org/bvsala/e/fulltext/agentes/agentes.pdf>
80. Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., Ali, A., Wright, E. R., Camilli, A. (2018). *Vibrio cholerae outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection* Journal of Bacteriology 200(12)
81. Richards, G. P., Watson M. A. (2006). *A simple fluorogenic method to detect Vibrio cholerae and Aeromonas hydrophila in well water for areas impacted by catastrophic disasters*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Vol.75, p. 516 – 521

82. Robles L. A., García R. M., Torres, J. (1999). *Toxinas de Vibrio cholerae*. Revista Mexicana de Patología Clínica, Vol. 46, p. 255 – 259
83. Román Román, P. I. (2013) Efecto sobre la estructura celular de Helicobacter pylori presente en agua por acción de cloro y ozono, tesis de licenciatura, Facultad de química, UNAM, pp. 53 – 73.
84. Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga E. (2005). *Antisépticos y desinfectantes* Dermatología Peruana, Vol. 15, p. 82 – 103
85. Sardesai, Y. N. (2005). *Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health*. Current Science. 89:10
86. Scher K., Romling U., Yaron S. (2004) *Effect of heat, acidification, and chlorination on Salmonella enterica serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface*, applied and environmental microbiology, Vol. 71, p. 1163 – 1168
87. Serveis Tècnics D'Investigació, 2012, <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/sem-sesion-12-de-noviembre.pdf>
88. Singleton, F. L., Attwell, R., Jangi, S., Colwell, R. R. (1982) *Effects of Temperature and Salinity on Vibrio cholerae Growth*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44, pp. 1047 – 1058
89. Singleton, F. L., Attwell, R. W., Jangi, M. S., Colwell, R. R. (1982) *Influence of Salinity and Organic Nutrient Concentration on Survival and Growth of Vibrio cholerae in Aquatic Microcosms*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 43, pp. 1080 – 1085
90. Solsona, F. (2002). *Desinfección del agua*. Lima, Perú: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. pp. 31 – 92, 109 – 124
91. Sorrivias de Lozano V., Morales A., Yáñez M. J. (2014). *Principios y práctica de la microscopía electrónica*. Febrero 2017, de Bahía Blanca Sitio web: <http://www.bahiablanca-conicet.gob.ar/biblioteca/principios-practica-microscopia-electronica.pdf>
92. Tamagnini L. M., Paraje M. G. (2015). *¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica)*. Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Vol. 2, p. 99 – 102
93. Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en Discapacidad, Vol. 2, p. 70 – 78
94. Tamplin, M. L., Colwell, R. R. (1986) *Effects of Microcosm Salinity and Organic Substrate Concentration on Production of Vibrio cholerae Enterotoxin*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52, pp. 297 – 301
95. Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., Srisukonth, C. (2002). *Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria*. Journal of General and Applied Microbiology. Vol. 48, pp. 193 – 199

96. Ulloa Flores, M. T., *Vibrio cholerae*, caracterización fenotípica y molecular, marzo 2017, <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Caracterizacion%20bioquimica%20y%20molecular%20de%20Vibrio%20cholerae.pdf>
97. UNEP-UN Habitat. (2010). *Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development*. Septiembre 2016, de UNEP Sitio web: [http://staging.unep.org/pdf/SickWater\\_screen.pdf](http://staging.unep.org/pdf/SickWater_screen.pdf)
98. Venczel L. V., Likirdopulos C. A., Robinson C. E., Sobsey M. D. (2004). *Inactivation of enteric microbes in water by electro-chemical oxidant from brine (NaCl) and free chlorine*. Water Science. Technology., Vol. 50, p. 141 – 146
99. Vital, M., Fuchslin, P., Hammes, F., Egli, T. (2007) *Growth of Vibrio cholerae O1 Ogawa Eitor in freshwater*. Microbiology Vol. 153, pp. 1993 – 2001
100. Wai, S.N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H., & Amako, K. (1996). *Resuscitation of Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock*. FEMS Microbiology Letters Vol. 136, pp. 187–191.
101. Water Environment Federation (1996), *Wastewater disinfection, Manual of practice* no. FD-10, United States
102. Weber Walter J. Jr (1979). *Control de la calidad del agua Procesos fisicoquímicos*, Reverté, España, p. 469
103. Wennberg A. C., Tryland I., Østensvik Ø., Secic I., Monshaugen M., Liltved H. (2012). , *Effect of water treatment on the growth potential of Vibrio cholerae and Vibrio parahaemolyticus in seawater*. Marine Environmental Research, Vol. 83, p. 10 – 15
104. Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., Kamiya S. (2009). *Outer membrane vesicles of Helicobacter pylori TK1402 are involved in biofilm formation*. BMC Microbiology. Vol. 9:197
105. Zhang S., Ye C., Lin H., Lv L., Yu X. (2015) *UV Disinfection Induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*, Environmental Science and Technology, Vol. 49, p. 1721 – 1728
106. Zhang, Y. Q., Wu, Q. P., Zhang, J. M., Yang, X. H. (2011) *Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology. Vol. 111, pp. 1006 – 1015
107. <http://www.el.es/procesos/desinfeccion/factores/factores-definfeccion-agua.html>
108. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo9.pdf>

# ANEXOS

## Anexo A. Preparación de soluciones

### **Anexo A1. Agua de mar artificial**

En la siguiente tabla se muestra la composición del agua de mar artificial (Moore, 2007) utilizada para la inducción de *V. cholerae* a VNC:

<b>Componente</b>	<b>Concentración final (mM)</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>g/L</b>
NaCl	481	58.4	28.09
MgSO <sub>4</sub>	28	120.4	3.37
MgCl <sub>2</sub>	27	95.2	2.57
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	10	147	1.47
KCl	9	74.5	0.67

Estas cantidades son para preparar 1 litro de agua de mar artificial (ASW), posterior llevar a esterilización en autoclave y conservar a 4°C.

Moore *et. al.*, (2007), no establece que esta agua de mar artificial tenga alguna calidad específica, por lo que se debe medir los parámetros de interés.

### **Anexo A2. Solución salina isotónica**

Pesar 850 mg de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada, esterilizar en autoclave. Conservar a 4°C.

### **Anexo 3. Yoduro de potasio**

Pesar 20 gramos de yoduro de potasio. Agregar a un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada. Esta solución está al 2% en p/v.

### **Anexo 4. Ácido sulfúrico, 1N**

Con los siguientes datos se calcula la cantidad de ácido sulfúrico que se necesita para preparar 100 mL de solución de concentración 1 N.

Datos:

Peso molecular: 98 g/mol

Densidad: 1.84 g/mL

Pureza: 98%

En una solución de concentración 1 N, hay dos equivalentes por litro, para el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

$$\frac{1 \text{ eq}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol}}{2 \text{ eq}} \times 0.1 \text{ L} \times \frac{98 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mL H}_2\text{SO}_4}{1.84 \text{ g H}_2\text{SO}_4} \times \frac{100 \text{ mL react. analítico}}{98 \text{ mL H}_2\text{SO}_4} = 2.71 \text{ mL} \approx 2.7 \text{ mL}$$

Tomar 2.7 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agregar a un matraz aforado de 100 mL con agua, y aforar.

#### **Anexo A5. Solución de índigo** (Bader y Hoigné, 1981).

Solución madre de índigo.

En un matraz aforado de 1L, agregar 500mL de agua, agregar 1mL de ácido fosfórico concentrado y añadir con agitación, 770 mg de trisulfonato potásico de índigo, aforar con agua destilada. Una dilución 1:100 exhibe una absorbancia de 0.02 cm a 600 nm. La solución madre es estable por cuatro meses almacenada en frasco ámbar.

Reactivo de índigo I

En un matraz aforado de 1L, añadir 20 mL de solución madre, 10g de fosfato monobásico de sodio y 7 mL de ácido fosfórico concentrado. Diluir hasta el aforo (almacenar en frasco ámbar).

Reactivo de índigo II.

Proceder como en el reactivo de índigo I, añadiendo 100 mL de solución madre en lugar de 20 mL.

### **Anexo 6. Glutaraldehído al 3%**

La solución de glutaraldehído al 3% p/v, se prepara con 12 mL de glutaraldehído al 25% p/v (Sigma-Aldrich; cat. G5882, lote 056K5318) y se afora a un volumen de 100 mL con un búfer de fosfatos. Este búfer se prepara de acuerdo con lo indicado por Nieto López (2010):

Se inicia con la preparación de las soluciones stock

Solución A. (0.2 M) Fosfato de sodio monobásico,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (27.6 g/L)

Solución B. (0.2 M) Fosfato de sodio dibásico,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (28.4 g/L)

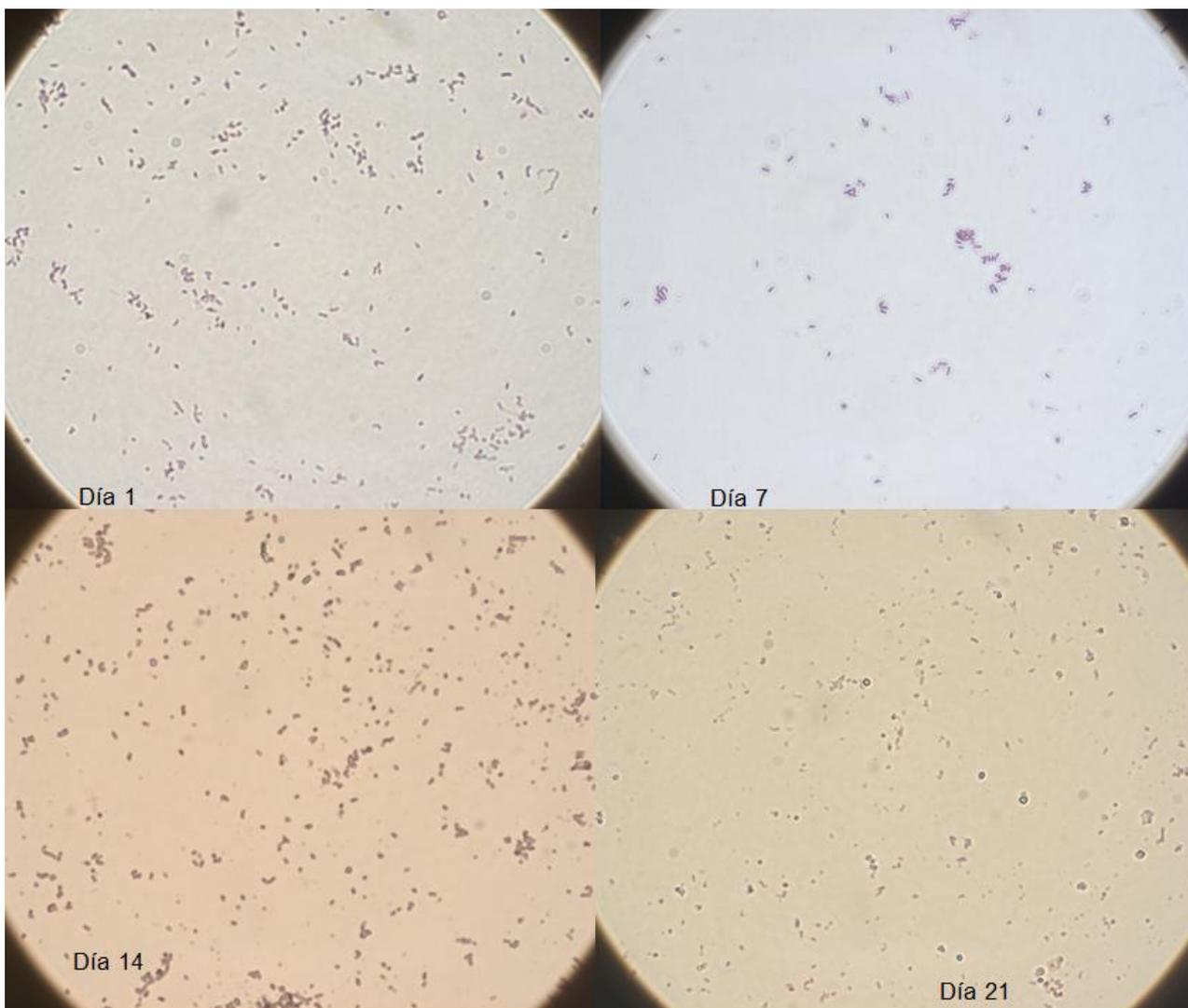
Para obtener un amortiguador 0.2 M con pH 7.2 - 7.4, mezclar 23 mL de la solución A + 77 mL de la solución B. Este búfer se esteriliza en autoclave.

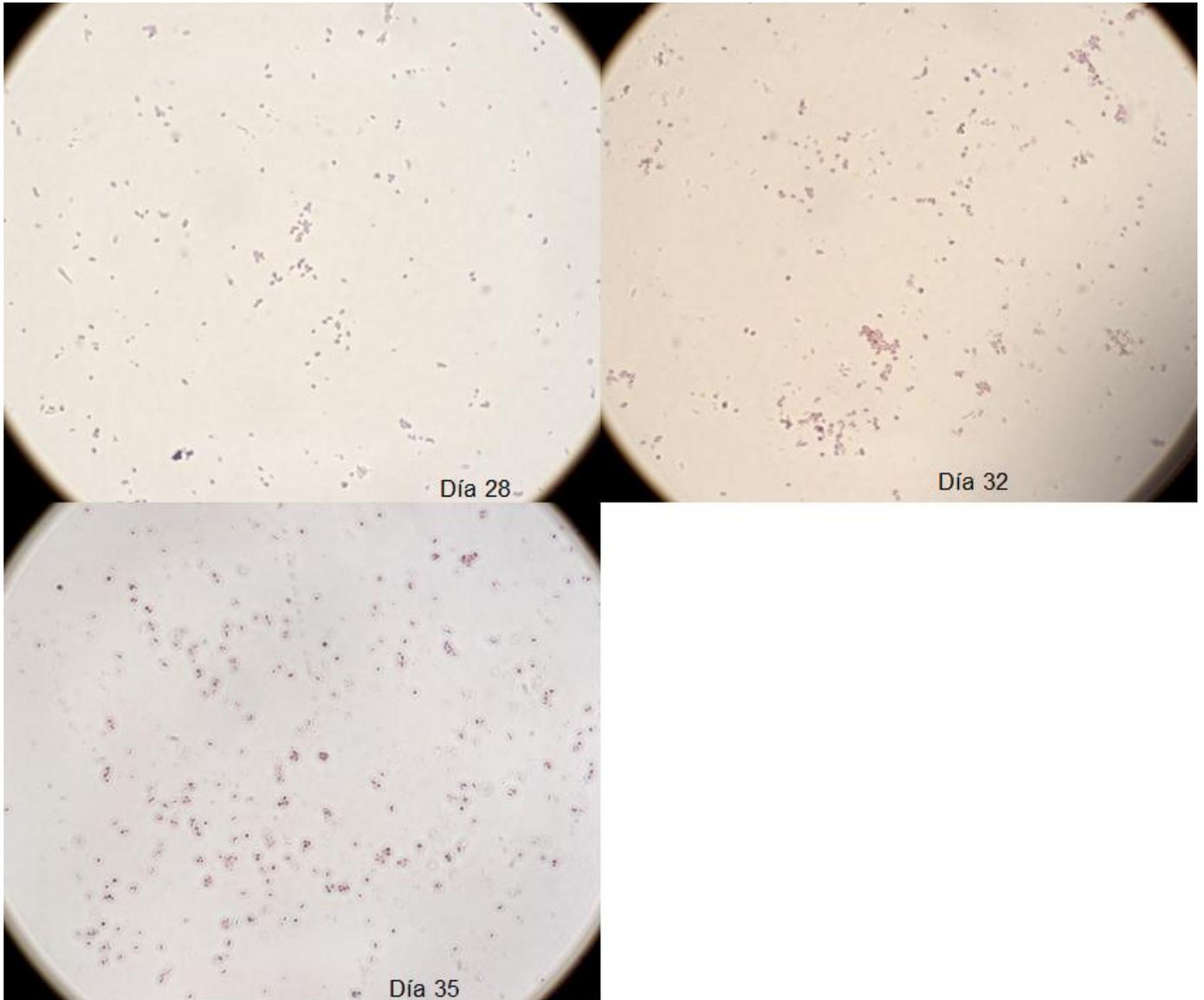
La solución de glutaraldehído al 3% p/v, se conserva a 4°C.

# Anexo B. Memoria fotográfica

### *Microscopía óptica*

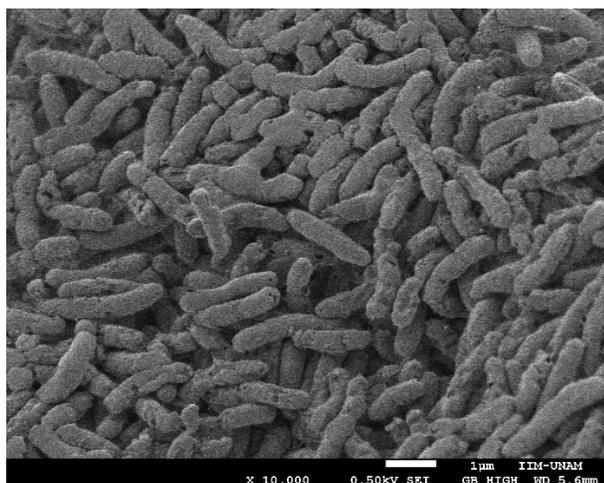
En las siguientes imágenes se muestra el seguimiento de la inducción por tinción de Gram, se muestran los días más representativos.



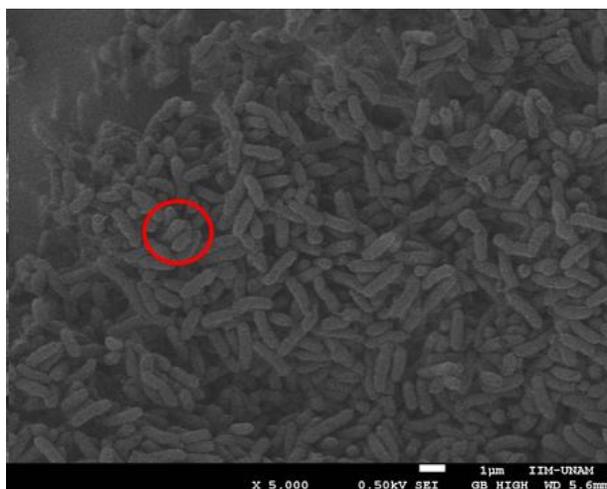


## Microscopía electrónica

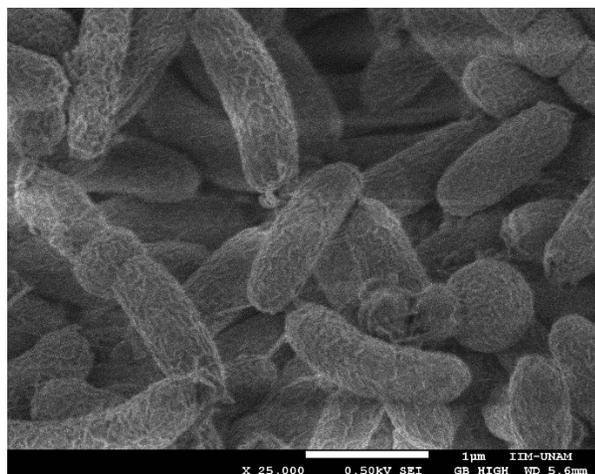
### Inducción a VNC



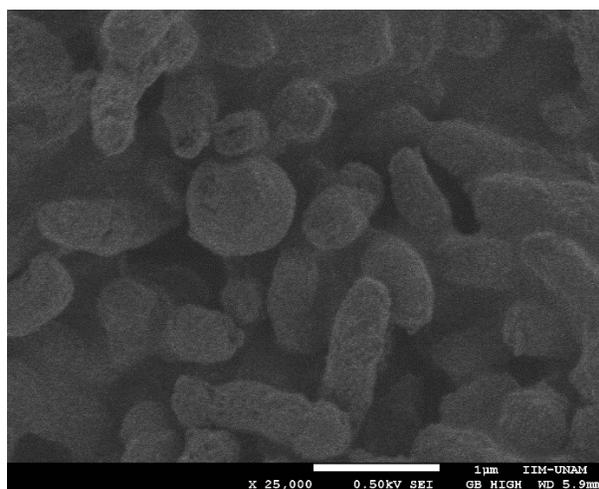
Día 1. Forma bacilar



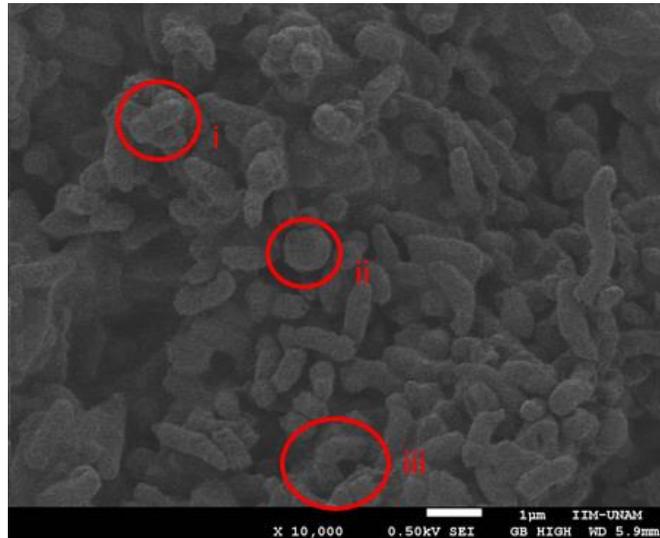
Día 7. Hay indicios de conversión a forma de "U"



Día 7. Inicio de curvatura en algunas bacterias, también se observa un coco.



Día 21. Hay presencia de cocos



Día 21. Presencia de varias morfologías de la bacteria (i) bacilo corto (ii) coco (iii) forma de “U”, y bacilos.

# ANEXO C. Programa en RStudio

**Programa para el cloro:**

```
#Cloro
tiempo<-c(rep(0,10),rep(3,5),rep(3.5,5),rep(15,5),rep(20,5),rep(30,5))
conc<-c(rep(0.5,5),rep(1,5),rep(0.5,5),rep(1,10),rep(0.5,5),rep(1,5))
bact<-
c(109410,109415,109420,109405,109418,109410,109415,109420,109405,109418,7222,7
213,7210,7228,7210,627,620,628,630,628,644,640,648,645,650,49,48,50,49,47,28,2
7,29,28,25)
datos<-cbind(tiempo,conc,bact)
t<-as.factor(tiempo)
c<-as.factor(conc)
modelo<-aov(bact~t*c)
anova(modelo)

#Tukey para cloro
TukeyHSD(modelo,ordered=T)

#Gráfica de interacciones para cloro
interaction.plot(t,c,bact,type="l",main="Gráfica de
interacción",xlab="Tiempo",ylab="Bacterias intactas",col=1:3)
interaction.plot(c,t,bact,type="l",main="Gráfica de
interacción",xlab="Concentración cloro",ylab="bacterias intactas",col=1:3)
```

**Programa para el ozono:**

```
#ozono
tiempo<-c(rep(0,10),rep(1,10),rep(3,5),rep(7.5,5),rep(18,5))
conc<-c(rep(0.5,5),rep(1,5),rep(0.5,5),rep(1,5),rep(0.5,5),rep(1,10))
bact<-
c(73500,72599,73500,73550,73580,73500,72599,73500,73550,73580,13700,13760,1374
0,13730,13709,878,868,875,872,876,342,345,345,341,340,114,112,113,111,114,35,3
3,33,35,34)
datos<-cbind(tiempo,conc,bact)
t<-as.factor(tiempo)
```

```
c<-as.factor(conc)
modelo<-aov(bact~t*c)
anova(modelo)
```

```
#Tukey para ozono
TukeyHSD(modelo,ordered=T)
```

```
#Gráfica de interacciones para ozono
interaction.plot(t,c,bact,type="l",main="Gráfica de
interacción",xlab="Tiempo",ylab="Bacterias intactas",col=1:3)
interaction.plot(c,t,bact,type="l",main="Gráfica de
interacción",xlab="Concentración ozono",ylab="bacterias intactas",col=1:3)
```

# ANEXO D. Prueba de Tukey

A continuación se muestra la salida de cómputo para la comparación de Tukey, se sombrea en color amarillo los contrastes que son iguales, considerando que el valor  $P < 0.05$  significa que NO son iguales.

### #Tukey para cloro

```
> TukeyHSD(modelo, ordered=T)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level
factor levels have been ordered
```

```
Fit: aov(formula = bact ~ t * c)
```

```
$t
      diff      lwr      upr    p adj
20-30   21.2 1.160296e+01  30.79704 3.50e-06
3.5-30  599.2 5.896030e+02  608.79704 0.00e+00
15-30   618.0 6.084030e+02  627.59704 0.00e+00
3-30   7189.2 7.179603e+03  7198.79704 0.00e+00
0-30  109386.2 1.093779e+05 109394.51128 0.00e+00
3.5-20   578.0 5.684030e+02  587.59704 0.00e+00
15-20   596.8 5.872030e+02  606.39704 0.00e+00
3-20   7168.0 7.158403e+03  7177.59704 0.00e+00
0-20  109365.0 1.093567e+05 109373.31128 0.00e+00
15-3.5    18.8 9.202963e+00   28.39704 2.61e-05
3-3.5   6590.0 6.580403e+03  6599.59704 0.00e+00
0-3.5  108787.0 1.087787e+05 108795.31128 0.00e+00
3-15    6571.2 6.561603e+03  6580.79704 0.00e+00
0-15   108768.2 1.087599e+05 108776.51128 0.00e+00
0-3    102197.0 1.021887e+05 102205.31128 0.00e+00
```

```
$c
      diff      lwr      upr    p adj
1-0.5 1.091394e-11 -3.47425 3.47425      1
```

### #Tukey para ozono

```
> TukeyHSD(modelo, ordered=T)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level
  factor levels have been ordered
```

```
Fit: aov(formula = bact ~ t * c)
```

```
$t
      diff      lwr      upr    p adj
7.5-18   78.8 -334.1172  491.7172 0.9802673
3-18    308.6 -104.3172  721.5172 0.2175220
1-18   7266.8  6909.2033  7624.3967 0.0000000
0-18  73311.8 72954.2033  73669.3967 0.0000000
3-7.5   229.8 -183.1172  642.7172 0.4967203
1-7.5   7188.0  6830.4033  7545.5967 0.0000000
0-7.5  73233.0 72875.4033  73590.5967 0.0000000
1-3     6958.2  6600.6033  7315.7967 0.0000000
0-3    73003.2 72645.6033  73360.7967 0.0000000
0-1    66045.0 65753.0235  66336.9765 0.0000000
```

```
$c
      diff      lwr      upr p adj
0.5-1 3749.083 3592.297 3905.87    0
```

```
$`t:c`
      diff      lwr      upr    p adj
7.5:1-18:1   78.8 -407.24618  564.8462 0.9998913
3:0.5-18:1   308.6 -177.44618  794.6462 0.4934822
1:1-18:1     839.8  353.75382  1325.8462 0.0000856
1:0.5-18:1  13693.8 13207.75382 14179.8462 0.0000000
0:0.5-18:1  73311.8 72825.75382 73797.8462 0.0000000
0:1-18:1    73311.8 72825.75382 73797.8462 0.0000000
7.5:0.5-18:1    NA      NA      NA      NA
18:0.5-18:1    NA      NA      NA      NA
3:1-18:1       NA      NA      NA      NA
3:0.5-7.5:1   229.8 -256.24618  715.8462 0.8268545
1:1-7.5:1     761.0  274.95382  1247.0462 0.0003725
1:0.5-7.5:1  13615.0 13128.95382 14101.0462 0.0000000
0:0.5-7.5:1  73233.0 72746.95382 73719.0462 0.0000000
0:1-7.5:1    73233.0 72746.95382 73719.0462 0.0000000
7.5:0.5-7.5:1    NA      NA      NA      NA
18:0.5-7.5:1    NA      NA      NA      NA
3:1-7.5:1      NA      NA      NA      NA
1:1-3:0.5     531.2  45.15382  1017.2462 0.0238230
1:0.5-3:0.5  13385.2 12899.15382 13871.2462 0.0000000
0:0.5-3:0.5  73003.2 72517.15382 73489.2462 0.0000000
0:1-3:0.5    73003.2 72517.15382 73489.2462 0.0000000
7.5:0.5-3:0.5    NA      NA      NA      NA
18:0.5-3:0.5    NA      NA      NA      NA
3:1-3:0.5      NA      NA      NA      NA
1:0.5-1:1    12854.0 12367.95382 13340.0462 0.0000000
0:0.5-1:1    72472.0 71985.95382 72958.0462 0.0000000
```

0:1-1:1	72472.0	71985.95382	72958.0462	0.0000000
7.5:0.5-1:1	NA	NA	NA	NA
18:0.5-1:1	NA	NA	NA	NA
3:1-1:1	NA	NA	NA	NA
0:0.5-1:0.5	59618.0	59131.95382	60104.0462	0.0000000
0:1-1:0.5	59618.0	59131.95382	60104.0462	0.0000000
7.5:0.5-1:0.5	NA	NA	NA	NA
18:0.5-1:0.5	NA	NA	NA	NA
3:1-1:0.5	NA	NA	NA	NA
0:1-0:0.5	0.0	-486.04618	486.0462	1.0000000
7.5:0.5-0:0.5	NA	NA	NA	NA
18:0.5-0:0.5	NA	NA	NA	NA
3:1-0:0.5	NA	NA	NA	NA
7.5:0.5-0:1	NA	NA	NA	NA
18:0.5-0:1	NA	NA	NA	NA
3:1-0:1	NA	NA	NA	NA
18:0.5-7.5:0.5	NA	NA	NA	NA
3:1-7.5:0.5	NA	NA	NA	NA
3:1-18:0.5	NA	NA	NA	NA