



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

### INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM

Evaluación de la desinfección con ozono en *Vibrio cholerae*  
en su morfología bacilar, bacilar rugosa y cocoide mediante  
FESEM

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**DAVID PÉREZ CENOBIO**

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ISAURA YÁÑEZ NOGUEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. GERMÁN CALVA VÁSQUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2019





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.



**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*

La presente tesis fue desarrollada para el cumplimiento de los objetivos del proyecto IT100618 PAPIIT-DGAPA. Se agradece el apoyo y recursos otorgados para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi formación académica como Biólogo y ser mi segunda casa.

Al instituto de ingeniería de la UNAM y a todo el personal del LIA por brindarme las facilidades para realizar mi tesis en esta institución.

A mi directora M en C. Isaura Yáñez Noguez por darme la oportunidad de realizar esta tesis, así como su apoyo, guía y paciencia durante el desarrollo y escrito del trabajo.

Al M. en C. German Calva Vásquez por su enseñanza durante mi formación, así como su gran apoyo y amistad.

A la Dra. María Teresa Orta Ledesma por permitirme ser parte de su gran grupo de trabajo, así como el apoyo recibido durante el desarrollo de la investigación.

Al 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 micrografías FESEM.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo en el proceso de secado a punto crítico de las muestras para microscopía FESEM.

A mis sinodales Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz, Dra. Claudia Janette De la Rosa Mera y Biól. Irene Castillo Chaires por su tiempo empleado para enriquecer esta tesis.

# *Dedicatorias*

A mis padres Lucila y Salvador por todo su amor, paciencia, dedicación y apoyo que me han otorgado en cada momento de mi vida, siempre estaré agradecido por todo el sacrificio que han hecho por mí. Los amo.

A mi abuela Juanita y mi tío Antonio siempre han sido parte fundamental de mi vida, en especial en esta etapa, sin ustedes no podría haber hecho esto posible.

A mi hermano Oscar con el que he compartido desde peleas hasta excelentes momentos llenos de risas y diversión, sigue así futuro nutriólogo.

A Anelly, Azulon, Marco, Max y Luis los mejores amigos que una persona podría desear, gracias por su más sincera amistad y por todos los buenos momentos que pasamos a lo largo de todo este tiempo y claro, por aquellos que nos faltan vivir y compartir. Sin ustedes la universidad no habría sido una excelente etapa de la vida.

A Angeles, Jovana, Moni y Gissel gracias por su amistad, su apoyo y de hacer de cada momento algo divertido y agradable los cuales siempre llevaré en mi memoria.

A Angie y Gissel las mejores personas que pude conocer en el laboratorio de contaminación ambiental, las cuales se convirtieron en grandes y excelentes amigas para mí.

A Chucho, Iván, Omar, Yozi y Arturo amigos extraordinarios con los cuales compartí momentos inolvidables llenos de risas y diversión dentro de la FES, en las salidas de campo y en las fiestas.

A Karina gracias por tu amistad y toda la ayuda que me brindaste con la tesis durante mi estancia en el IINGEN.

A Axa, Lidia, Andrea e Isaac por hacer más ameno y divertido el tiempo en el cual desarrolle mi tesis en el IINGEN.

A Daniel, Edith y Fany con quienes pase momentos de risa y diversión y sobre todo partidas muy divertidas de lolcito.

A Víctor, Dalila, Karen, Rocío, Yosber, Diego, Yair, Marco, Nájera, Fernando, Ricardo, Pepe, Manolo y Carlos mis oaxaqueños favoritos con los cuales compartí los mejores momentos de mi juventud.

# Índice

Índice.....	1
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	9
3. Justificación.....	11
4. Marco teórico.....	12
4.1 Epidemiología del cólera.....	12
4.2 Género <i>Vibrio</i> .....	14
4.3 Estructura y fisiología de <i>Vibrio cholerae</i> .....	15
4.4 Supervivencia en el medio ambiente.....	17
4.4.1 Variante rugosa de <i>V. cholerae</i> .....	17
4.4.2 Morfología cocoide o estado viable no cultivable.....	19
4.4.3 Aislamiento y medios de cultivo para <i>Vibrio cholerae</i> .....	20
4.5 Vías de transmisión.....	21
4.5.1 Fecal-oral.....	21
4.5.2 Agua como vía de transmisión.....	22
4.6 Metodologías de desinfección del agua.....	22
4.6.1 Métodos físicos.....	23
4.6.2 Métodos químicos.....	25
4.7 Análisis por microscopía electrónica.....	29
4.7.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
4.7.2 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).....	32
4.8 Método de cuantificación por filtración por membrana.....	33

## Índice

5. Antecedentes .....	35
6. Objetivos .....	40
6.1 General .....	40
6.2 Particulares.....	40
7. Hipótesis.....	41
8. Metodología.....	42
8.1 Inducción de <i>Vibrio cholerae</i> a la morfología cocoide.....	42
8.2 Inducción de <i>Vibrio cholerae</i> a la morfología rugosa. ....	43
8.3 Preparación de la suspensión bacteriana de <i>Vibrio cholerae</i> para la desinfección con ozono. ....	43
8.3.1 Suspensión de la morfología bacilar para la desinfección con ozono. ...	43
8.3.2 Suspensión de la morfología cocoide para la desinfección con ozono. ....	44
8.3.3 Suspensión de la morfología rugosa para la desinfección con ozono... ..	44
8.4 Desinfección con ozono de <i>Vibrio cholerae</i> .....	44
8.4.1 Preparación de la solución de ozono para la desinfección de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	45
8.4.2 Determinación de la demanda inmediata de ozono para <i>Vibrio cholerae</i> .....	45
8.4.3 Dosis y tiempo de exposición para la desinfección con ozono.....	46
8.5 Evaluación de la desinfección con ozono .....	47
8.5.1 Preparación de las muestras para microscopía FESEM .....	47
8.5.2 Cuantificación por Filtro de membrana.....	48
9. Resultados y discusión.....	51
9.1 Inducción a la morfología cocoide .....	51



## Índice

9.2 Inducción de <i>Vibrio cholerae</i> a la morfología rugosa .....	52
9.3 Decaimiento del ozono en agua .....	53
9.4 Determinación de las demandas de ozono.....	55
9.5 Cálculo de la Inactivación de <i>V. cholerae</i> por cuantificación por filtro de membrana.....	60
9.6 Evaluación del daño por ozono en la ultraestructura de <i>Vibrio cholerae</i> .....	64
10. Conclusiones.....	73
11. Bibliografía .....	75

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>V. cholerae</i> mediante microscopia electrónica de barrido, recuperado de: <a href="http://remf.dartmouth.edu/cholera_sem/">http://remf.dartmouth.edu/cholera_sem/</a> (consultado el 11 de feb de 2019). .....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema de la serotipificación de <i>V. cholerae</i> (OMS, 2007). .....	16
<b>Figura 3.</b> Funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (Salas, 2014). .....	31
<b>Figura 4.</b> Metodología de cuantificación por filtro de membrana. a) la muestra pasa por un kit de filtración aplicando vacío b) el filtro es retirado en condiciones estériles c) el filtro es colocado en la superficie de agar solido d) se mantiene en incubación por 24 horas e) se lleva a cabo el conteo de las colonias visibles. Recuperado de: <a href="http://innotec.com.vn/en/phuong-phap-mang-loc-phan-tich-vi-sinh-vat-trong-nuoc/">http://innotec.com.vn/en/phuong-phap-mang-loc-phan-tich-vi-sinh-vat-trong-nuoc/</a> (consultado el 11 de feb de 2019). .....	50
<b>Figura 5.</b> Morfología de <i>V. cholerae</i> . Tinción Gram al día 42 después de iniciada la inducción a la forma cocoide observada en microscopio óptico a 100x aumentos con aceite de inmersión. 1) bacilo, 2) forma de “U”, 3) formar de “U” elongada 4) forma anillada y 5) forma cocoide.....	51
<b>Figura 6.</b> Colonias de <i>V. cholerae</i> en agar TSA. A) bacilar y B) variante rugosa. 52	
<b>Figura 7.</b> Decaimiento de la concentración de ozono en agua destilada.....	54
<b>Figura 8.</b> Demanda de ozono para <i>V. cholerae</i> en su morfología bacilar.....	56
<b>Figura 9.</b> Demanda de ozono para <i>V. cholerae</i> variante rugosa cultivada en APA 1%. .....	57
<b>Figura 10.</b> Demanda de ozono para <i>V. cholerae</i> variante rugosa cultivada en APA 2%. .....	58
<b>Figura 11.</b> Demanda de ozono para <i>V. cholerae</i> morfología cocoide.....	59
<b>Figura 12.</b> <i>V. cholerae</i> morfología bacilar. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (CAV=cavidades, OMV=vesículas de la membrana externa). .....	66

## Índice

**Figura 13.** *V. cholerae* morfología rugosa APA 1%. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (BP=biopelícula, OMV=vesículas de la membrana externa, CAV=cavidades)..... 68

**Figura 14.** *V. cholerae* morfología rugosa APA 2%. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (BP=biopelícula, OMV=vesículas de la membrana externa, CD=célula deformada, CAV=cavidades).  
..... 70

**Figura 15.** *V. cholerae* morfología cocoide. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (OMV=vesículas de la membrana externa, FA=fibrilla de adhesión)..... 71

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones para la desinfección con ozono para <i>V. cholerae</i> .....	46
<b>Tabla 2.</b> Datos de la inactivación mediante la desinfección con ozono de <i>V. cholerae</i> bacilar.....	60
<b>Tabla 3.</b> Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de <i>V. cholerae</i> variante rugosa cultivada en APA al 1%. .....	61
<b>Tabla 4.</b> Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de <i>V. cholerae</i> variante rugosa cultivada en APA al 2% .....	62
<b>Tabla 5.</b> Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de <i>V. cholerae</i> en su morfología cocoide. ....	63

## 1. Resumen

### 1. Resumen

El enfoque del estudio consistió en evaluar mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (Field Emission Scanning Electron Microscopy, por sus siglas en inglés: FESEM) el efecto que causa el ozono en la bacteria *Vibrio cholerae* durante el proceso de desinfección. El efecto fue observado para dos variantes resistentes en el ambiente, rugosa y cocoide, así como en la morfología común (bacilar). El efecto fue determinado para diferentes condiciones de desinfección a través del análisis de las micrografías obtenidas mediante FESEM. Las micrografías demostraron que las células de la variante rugosa tienen mayor resistencia durante el proceso de desinfección con ozono. Los daños observados en su ultraestructura evidenciaron deformación celular, formación de cavidades en la célula, así como fuga de material celular ocasionada por el daño en la membrana. En el caso de la variante cocoide las micrografías comprobaron una completa lisis y destrucción total del material celular, presencia de restos celulares, vesículas de la membrana externa y en algunos casos se observan fibrillas de adhesión que sugieren formación de biopelícula. Para la morfología normal (bacilar) se observó la lisis de las células, cavidades de mayor tamaño y vesículas de la membrana externa producto del daño a la membrana y de la salida del material intracelular. Con base en la bibliografía la cantidad de vesículas en la superficie de la envoltura celular es un indicador del aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática y se correlaciona con la acumulación del material que se produce bajo estrés, lo que exagera el deterioro de los mecanismos normales de mantenimiento y respuesta de la célula. Adicionalmente se determinaron los porcentajes de inactivación de la bacteria en sus tres morfologías. Para determinar el porcentaje de inactivación aplicando cinco diferentes condiciones de desinfección con ozono se calcularon los siguientes valores de CT (concentración en mg • tiempo de contacto en min): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 7.5 y 18. Como resultados representativos y a manera de comparar, el

## 1. Resumen

análisis de los datos indicó que aplicando un valor de CT de  $1.5 \text{ mg min L}^{-1}$  para la morfología normal (bacilar) se logró la inactivación de 5.66 log lo que corresponde al 99.999%, para la morfología rugosa se inactivaron 1.98 log (98.943%); para la morfología cocoide y con datos generados dentro del proyecto se ha establecido una inactivación de 2.33 log lo que corresponde a 99.53%. Lo anterior indica que el ozono es un desinfectante que provee una opción viable para la inactivación de la bacteria *V. cholerae*, aunque en especial la variante rugosa demostró mayor resistencia, sugiriendo que podría ser la potencial causa de resurgimiento de la bacteria en el ambiente acuático.

## 2. Introducción

Es de gran importancia para la salud pública tener un fácil acceso al agua salubre, ya sea que se utilice para beber, para uso doméstico, para producir alimentos o para fines recreativos. Sin embargo, en países subdesarrollados o en desarrollo, 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. La gestión inadecuada de las aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas conlleva a que el agua que beben cientos de millones de personas se vea peligrosamente contaminada por microorganismos o productos químicos (OMS, 2018).

El cólera es una enfermedad diarreica acuosa aguda con vómito abundante, lo cual puede conducir a una deshidratación 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, 2017a).

El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Vibrio cholerae*, es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios y en ambientes marinos, por lo que el medio acuático ha sido reconocido como el principal reservorio y vehículo para su transmisión. La bacteria de *V. cholerae* puede desarrollar diferentes morfologías para la persistencia en el medio ambiente bajo condiciones desfavorables, las cuales son la morfología cocoide o estado viable no cultivable (VBNC) y la morfología “rugosa”.

Estas morfologías adquieren mayor importancia debido a su capacidad para adherirse a superficies bióticas o abióticas, tales como las tuberías de

## 2. Introducción

abastecimiento, las cuales aumentan su supervivencia formando grupos o agregados celulares con capacidad de formar biopelículas (Percival *et al.*, 2014).

Ante esta problemática el presente estudio se enfoca en evaluar la desinfección con ozono para inactivar *V. cholerae* en sus morfologías bacilar, cocoide y rugosa, evaluando el daño en la ultraestructura mediante micrografías FESEM.



### 3. Justificación

*Vibrio cholerae* ha cobrado gran importancia debido a su capacidad de permanencia en el medio acuoso, mediante cambios morfológicos como estrategias de resistencia (variante rugosa y estado viable no cultivable). Dado lo anterior, surge la necesidad de buscar alternativas para la eliminación de esta bacteria patógena. Esta investigación se enfoca en proporcionar información sobre el efecto en la estructura celular de *V. cholerae* por la aplicación de ozono y su inactivación en el medio acuoso.

## 4. Marco teórico

### 4.1 Epidemiología del cólera

La provisión de agua potable y de saneamiento es un factor significativo en la salud de la población, al evitar su exposición a los agentes patógenos. El acceso adecuado a estos servicios es crucial para la reducción de la mortalidad y morbilidad entre la población menor de cinco años, la disminución de enfermedades de transmisión hídrica (hepatitis viral, fiebre tifoidea, cólera, disentería y otras causantes de diarrea), así como de afecciones resultantes del consumo de componentes químicos patógenos (arsénico, nitratos o flúor) (CONAGUA, 2016).

El abastecimiento de agua para uso o consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales entre otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas y organolépticas, químicas y radiactivas (NOM-127-SSA1-1994).

Las epidemias de enfermedades transmitidas por el agua pueden afectar a numerosas personas, por ello es importante que la prioridad en los controles de calidad aplicados a los sistemas de distribución de agua sea el control de dichas epidemias. Las vías de infección relacionadas al agua son tres diferentes: ingestión (bebidas), inhalación y aspiración (aerosoles), así como por contacto (baño); que se asocian a su vez a padecimientos gastrointestinales, respiratorios y dérmicos respectivamente (OMS, 2007).

Más de 1800 millones de personas en el mundo beben agua de fuentes contaminadas con heces que pueden contener el bacilo del cólera, y 2400 millones no disponen de instalaciones de saneamiento adecuadas. Paralelamente, se ha

#### 4. Marco teórico

reducido la ayuda mundial para mejorar la calidad del agua y el saneamiento (OMS, 2017a).

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con el bacilo *V. cholerae* (OMS, 2017a)

La Organización Mundial de la Salud mantiene una base de datos de brotes de cólera, aunque sus investigadores y epidemiólogos consideran que hay una subestimación de la incidencia de la infección. Los datos compilados entre 1995 y 2005 mostraron que, de los 632 informes, el 66% se originó en el África subsahariana, el 16,8% en el sudeste asiático, el 7,1% en América del Sur y Central y el 5,7% en África del Norte y Asia Occidental (Griffith *et al.*, 2006).

El cólera sigue siendo una amenaza mundial para la salud pública y un indicador de inequidad y falta de desarrollo social. 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, 2017a).

El cólera en México ha estado presente en el país desde la epidemia de los años 90, y en los últimos años se han registrado casos aislados, como los ocurridos en los 2010, 2011 y 2012 en el estado de Sinaloa, siendo el mismo tipo de bacteria que ha circulado desde la década de los noventa la que continua presente. En 2013, se originaron brotes y casos en el Distrito Federal, Hidalgo, Veracruz y San Luis Potosí (Secretaría de Salud, 2016). En 2015 se identificó un caso en Puebla y en agosto de 2016 se registró uno en Nayarit (Carrillo, 2015; CONAVE, 2016). Aunque actualmente, el cólera en el país se mantiene bajo control epidemiológico, es importante controlar la transmisión de la enfermedad con tecnologías eficientes de desinfección.

## 4.2 Género *Vibrio*

El género *Vibrio* son bacterias Gram negativas, típicamente cortas en forma de bacilo (0.5 por 1.3 a 3 mm, pero también pueden ser curvas o en forma de coma. *Vibrio* es anaerobios facultativos, no esporulados, no encapsulados, catalasa positiva y móvil por medio de un único flagelo polar. En medios líquidos, todos los *Vibrios* exhiben una vigorosa movilidad. La mayoría de las especies son oxidasas positivas y reducen los nitratos a nitritos. Cuando se cultiva en medios de agar, *Vibrio* forma dos tipos de colonias muy distintas, llamadas rugosas y lisas. La formación de estas dos variantes de colonias está asociada con la diversidad de la población y la adaptación a las condiciones ambientales (Beyhan e Yildiz, 2007).

El género *Vibrio* pertenece a la división proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Vibrionales, familia Vibrionaceae. Actualmente, se reconocen 78 especies de *Vibrio* de las cuales cerca de la tercera parte de las especies son patógenas para el humano y la enfermedad es por lo general, el resultado de la ingestión de agua o alimentos contaminados o por la exposición de heridas a ambientes acuáticos donde las especies de *Vibrio* están presentes. Las especies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los patógenos humanos más importantes (Fernández y Alonso, 2009).

En 1854, el médico italiano Filippo Pacini (1812-1883) descubrió la primera especie de *Vibrio*, es decir, *V. cholerae*, el agente causal del cólera, mientras estudiaba los brotes de esta enfermedad en Florencia examinando la mucosa intestinal de las víctimas mortales del cólera usando un microscopio detectando *V. cholerae* en todas las muestras (Thompson *et al.*, 2004).

### 4.3 Estructura y fisiología de *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo que mide de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho; en cultivos jóvenes (< de 18 h) se observa en forma de coma y a veces, en forma de S, posee flagelación polar (Figura 1), es catalasa y oxidasa positivo y aunque crece bien en los medios de cultivo habituales de laboratorio, el medio selectivo de elección es el agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) donde las colonias crecen lisas de 2-4 mm de diámetro, de color amarillo, con el centro opaco, la periferia traslúcida y muy pegajosas (SSA, 2012). La dosis infectiva reportada es de al menos  $10^6$  unidades celulares, en condiciones normales (Percival *et al.*, 2014). Este microorganismo se mantiene viable en un pH entre 7.6 y 8.6, el rango de temperatura óptimo se encuentra entre 18 y 40, mientras que el rango de salinidad que prefiere es de entre 15 y 25% (Orta *et al.*, 1996).

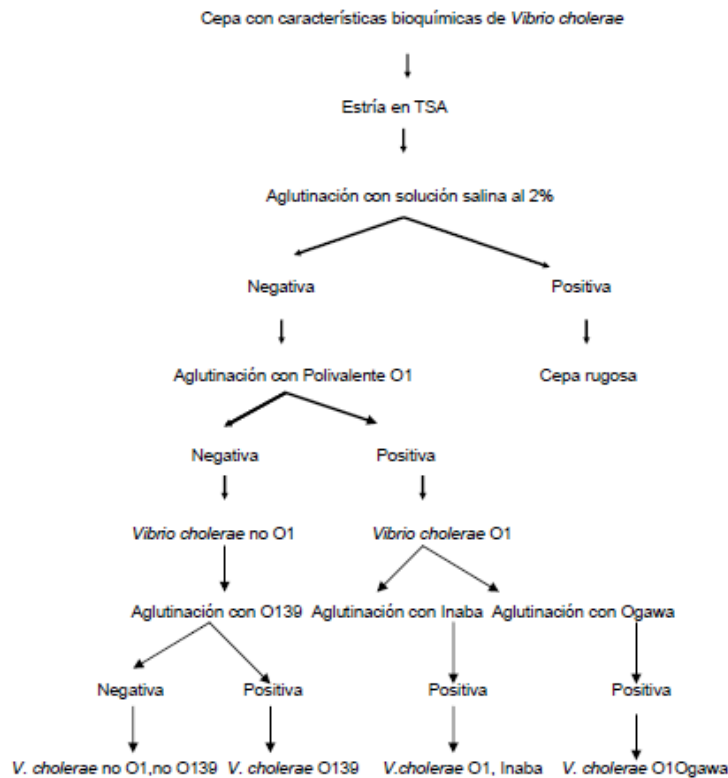


**Figura 1.** *V. cholerae* mediante microscopía electrónica de barrido, recuperado de: [http://remf.dartmouth.edu/cholera\\_sem/](http://remf.dartmouth.edu/cholera_sem/) (consultado el 11 de feb de 2019).

*V. cholerae* es una especie bien definida sobre las bases de pruebas bioquímicas. Pero, la especie no es homogénea en lo que respecta a su potencial patógeno. La presencia de antígenos somáticos termoestables O, ha permitido determinar más

#### 4. Marco teórico

de 200 serogrupos de *V. cholerae*. Solamente dos de ellos se reconocen como responsables de las epidemias de Cólera, el O1 y el O139. Los serogrupos no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis, apendicitis aguda, colecistitis aguda, otitis media, celulitis, neumonía, meningoccefalitis y septicemia (OMS, 2007). *V. cholerae* O1 es considerado el serogrupo virulento y epidémico por excelencia. Los aislamientos del serogrupo O1 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, siendo este último muy raro (Figura 2). Las cepas de *V. cholerae* O1 pueden interconvertir y producir un cambio de serotipo. Los aislamientos de *V. cholerae* O1 también pueden dividirse en dos biotipos, El Tor y Clásico, sobre la base de varias características fenotípicas. el biotipo El Tor, es el causante de todos los casos de Cólera en el mundo, pues el biotipo Clásico está extinto (Fernández y Alonso, 2009).



**Figura 2.** Esquema de la serotipificación de *V. cholerae* (OMS, 2007).

## 4.4 Supervivencia en el medio ambiente

*V. cholerae* es responsable de un gran número de brotes transmitidos por el agua (Alam *et al.*, 2006) y se ha detectado tanto en el estado planctónico como también unido a superficies bióticas y abióticas que incluyen zooplancton (por ejemplo, amebas), fitoplancton (por ejemplo, *Volvox*) y cianobacterias. Se sabe que los niveles de *Vibrio* aumentan significativamente durante las floraciones de fitoplancton y zooplancton (Colwell, 1996). También se ha demostrado que los *Vibrios* pueden persistir durante más de 15 meses dentro de la vaina mucilaginosa del alga acuática *Anabaena variabilis* (Islam *et al.*, 1990). La supervivencia de *Vibrio* en el agua y el medio ambiente también aumenta cuando las células bacterianas se unen a una superficie (Huq *et al.*, 1983) con agua más caliente que favorece el crecimiento.

Es probable que *V. cholerae* exista en el medio marino en varias formas. Estos incluyen un estado de vida libre, particularmente durante temperaturas elevadas del agua y concentraciones de nutrientes; una fase epibiótica, asociación de *Vibrios* con sustratos específicos, p. ej. La quitina de los mariscos, el estado viable pero no cultivable (Colwell y Huq, 1994) y el fenotipo rugoso. Se cree que *Vibrio* forma el microvibrio en condiciones adversas y estas células tienen morfologías alteradas que resultan en una disminución en el tamaño y los requisitos y/o actividades metabólicas (Hood *et al.*, 1986).

### 4.4.1 Variante rugosa de *V. cholerae*

Como forma de sobrevivencia *V. cholerae* puede cambiar su fenotipo de colonias bacilares a rugosas manteniendo su virulencia, caracterizado por una producción abundante de exopolisacáridos la cual le confiere resistencia siendo un mecanismo de supervivencia y persistencia ambiental. Este fenotipo exhibe una elevada resistencia a agentes tales como el cloro, los ácidos, el peróxido de hidrógeno, la

#### 4. Marco teórico

actividad bactericida del suero, antibióticos y condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Rahman *et al.*, 2014). La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia de una célula sobre una superficie. Este proceso va a depender de factores ambientales, como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes y de factores genéticos que afectan a aspectos como la motilidad, la sensibilidad ambiental y presencia de determinadas proteínas en la superficie de la célula en cuestión. La formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biopelículas ofrece cuatro ventajas importantes: (I) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilita la transferencia de material genético (ADN) (Domínguez, 2010).

Se ha demostrado que la morfología rugosa de *V. cholerae* O1 El Tor estaba asociada con la producción de un exopolisacárido, que promovía la formación de biopelículas y que era el responsable de la resistencia mostrada por la variante rugosa (Suzarte *et al.*, 2005). Las biopelículas se forman en superficies bióticas o abióticas y protegen a los microorganismos al proporcionar estructuras firmes tridimensionales, multicelulares, complejas y autoensambladas (Furkanur *et al.*, 2016).

El pequeño tamaño de la mayoría de estos microorganismos ha impedido la investigación óptica multiescalar de biopelículas vivas. La formación de la biopelícula de *V. cholerae* implica la producción de polisacáridos de *Vibrio* (VPS) y tres proteínas de matriz (RbmA, RbmC y Bap1) se predice que contienen módulos de unión a los carbohidratos. A pesar de los avances en la identificación de los constituyentes polisacáridos y proteínicos de la matriz extracelular de la biopelícula, aún se desconocen en gran medida los mecanismos por los cuales estos factores producen una biopelícula definida mecánicamente y organizada espacialmente (Berk *et al.*, 2012).



## 4. Marco teórico

### 4.4.2 Morfología cocoide o estado viable no cultivable

El estado Viable pero no Cultivable (VBNC por sus siglas en inglés, Viable but non-culturable) se define como un estado donde la bacteria es metabólicamente activa, pero carece de la capacidad para reproducirse en medios de cultivo rutinarios (Wu, 2016). Se ha demostrado que *V. cholerae* se reduce en tamaño y adopta una forma cocoidal, sostiene ciertas funciones como actividad metabólica, expresión génica específica, resistencia a antibióticos, virulencia y su potencial patogénico durante un tiempo prolongado en concentraciones bajas de nutrientes, las temperaturas subóptimas, la salinidad elevada, el pH extremo o la radiación solar (Fernández, *et al.*, 2015).

A pesar de no tener la capacidad de ser cultivada en medios normalmente permisivos, las células VBNC no son consideradas como células muertas debido a diversas diferencias. Las células muertas tienen una membrana dañada que no puede retener el ADN cromosómico y plasmídico, mientras que las células VBNC tienen una membrana intacta que contiene información genética no dañada (Cook and Bolster, 2007). Mientras que las células muertas son metabólicamente inactivas, las células VBNC son metabólicamente activas y llevan a cabo la respiración (Besnard *et al.*, 2002). Además, las células muertas no expresan genes, mientras que las células VBNC continúan la transcripción y, por lo tanto, la producción de ARNm, especialmente las correspondientes a los genes de respuesta al estrés (Gonzales-Escalona *et al.*, 2006). A diferencia de las células muertas que ya no utilizan nutrientes, se demostró que las células VBNC tenían una captación e incorporación continuadas de aminoácidos en las proteínas (Lleó *et al.*, 2000 citado en Li, 2014).

Algunas poblaciones bacterianas en el medio ambiente a menudo están expuestas a tensiones debidas a limitaciones y cambios en la disponibilidad de nutrientes,

#### 4. Marco teórico

temperatura, salinidad, iluminación solar, concentración de NaCl y saturación de oxígeno (Besnard *et al.*, 2002). Por lo que se ha sugerido que es una estrategia de supervivencia por la cual las bacterias son capaces de soportar tales condiciones ambientales (Pinto *et al.*, 2015).

Algunos experimentos han demostrado que las bacterias en estado VBNC pueden recuperar la capacidad de cultivo después de la digestión en animales o en seres humanos. Por lo que se enfatiza el riesgo presentado por bacterias patógenas en el estado VBNC, que no puede ser detectado por procedimientos de análisis habitualmente utilizados en laboratorios, y algunos de ellos consideran este estado es un riesgo para la salud pública (Besnard *et al.*, 2002).

##### 4.4.3 Aislamiento y medios de cultivo para *Vibrio cholerae*

Para el aislamiento de *V. cholerae* a partir de agua contaminada, muestras fecales o biopsias, el aislamiento primario debe hacerse empleando medios selectivos. Estos medios contienen una alta concentración de sales biliares que inhiben el desarrollo de microorganismos Gram positivos, retardando el crecimiento de *E. coli* y otros bacilos entéricos permitiendo recuperar *Vibrio* de muestras donde la concentración de otros microorganismos es muy alta (CDC, s.f.).

Se recomienda el agar TCBS como el agar preferible para el aislamiento de *V. cholerae* siendo el utilizado ampliamente en todo el mundo. El crecimiento de *V. cholerae* se lleva a cabo en un tiempo de 18 a 24 horas, en donde se producen colonias grandes de aproximadamente 2 a 4 mm de diámetro, ligeramente aplanadas, de color amarillo con centro opaco y una periferia traslucida. Los cultivos de *V. cholerae* deben subcultivarse en medios no selectivos, por ejemplo, agar TSA o agar BHI, como preparación para la identificación serológica y pruebas

## 4. Marco teórico

bioquímicas (pruebas de oxidasa, tinción de Gram, prueba de cuerda, etc.) (OMS, 2004).

En algunos casos suele utilizarse de manera opcional un enriquecimiento en agua peptonada alcalina debido al rápido crecimiento de *V. cholerae* que es de entre 6 a 8 horas, por lo que se presentara en mayor cantidad. Para de aquí posteriormente ser estriado en agar TCBS. Sin embargo, últimamente se ha demostrado que este medio de enriquecimiento al incubar *V. cholerae* durante 7 días o más a 37°C induce a la bacteria a su morfología rugosa (CDC, s.f.).

### 4.5 Vías de transmisión

*V. cholerae* está presente de forma natural en ambientes acuáticos de moderada salinidad y es considerado un patógeno facultativo para el hombre. Esta bacteria es la causante del cólera, enfermedad caracterizada por una diarrea acuosa intensa ocasionada por una variante productora de toxina colérica una vez que coloniza el intestino delgado del hombre. Estas cepas toxígenas están asociadas principalmente con el serotipo O1, de distribución mundial y causante de la séptima pandemia de esta enfermedad y con el serotipo O139 (Faruque *et al.*, 1998).

#### 4.5.1 Fecal-oral

Generalmente el cólera se transmite por vía fecal-oral y usualmente es provocado por la ingestión de un elevado número de organismos ( $10^8$ - $10^{11}$ ) (Zelada *et al.*, 2015). Se contrae al consumir alimentos como el pescado y mariscos crudos o insuficientemente cocinados, las frutas y verduras crudas, y otros productos contaminados durante la preparación o el almacenamiento (OMS, 2017b).

#### 4.5.2 Agua como vía de transmisión

El *V. cholerae* está presente de forma natural en ambientes acuáticos tanto marinos como continentales, ha sido aislado de lagos ríos y zonas costeras en regiones templadas y tropicales, encontrando las condiciones óptimas en sitios con niveles moderados de salinidad, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas y pH neutro o ligeramente alcalino. Bajo estas condiciones *V. cholerae* puede encontrarse como un organismo autóctono y de vida libre (Roldan, 2014)

En el medio acuático, la bacteria del cólera emplea estrategias comunes de supervivencia. Estas estrategias implican (i) la activación de respuestas de estrés generales y específicas, (ii) expresión de motilidad flagelar y quimiotaxis, (iii) apego a superficies, (iv) desarrollo de comunidades sésiles multicelulares, y (v) desprendimiento. Particularmente para la supervivencia de *V. cholerae* en las aguas hospederas y estuarinas es su capacidad de cambiar entre estilos de vida móvil (planctónico) y sésil (biopelícula) en respuesta a cambios químicos y físicos en el medio extracelular (Silva y Benites, 2016). En éste contexto y considerando que el hábitat natural de ésta bacteria es el agua y que es la principal vía de transmisión resulta primordial buscar alternativas eficaces de desinfección.

#### 4.6 Metodologías de desinfección del agua

La desinfección es la destrucción de organismos potencialmente dañinos a niveles que no sean patógenos y comúnmente constituye la etapa final de todo tratamiento de agua para prevenir la propagación de enfermedades transmitidas por el agua (CONAGUA, 2007).

## 4. Marco teórico

La desinfección del agua puede llevarse a efecto por diferentes procesos: (1) con agentes químicos; (2) con medios físicos. Cada uno de ellos tiene sus ventajas y sus desventajas, por lo que hay que tomar en serio y ser cuidadosos con las implicaciones de la desinfección, se emplean uno u otro método según sean las circunstancias.

### 4.6.1 Métodos físicos

#### ***Desinfección solar***

El proceso de desinfección solar es un proceso térmico que consiste en elevar la temperatura del agua por un espacio suficiente de tiempo en contenedores acondicionados para lograr la absorción del calor proveniente de la radiación solar. Las altas temperaturas tienen un marcado efecto sobre todos los microorganismos; las células vegetativas mueren debido a la desnaturalización de las proteínas y la hidrólisis de otros componentes. En el agua, si bien hay algunas bacterias con capacidad de esporular, lo que las hace particularmente resistentes al calor, en general puede afirmarse que la mayoría de las bacterias mueren entre los 40 y los 100° C, mientras que las algas, protozoarios y hongos lo hacen entre los 40 y los 60° C (Solsona y Méndez, 2002).

#### ***Radiación ultravioleta***

La inactivación de microorganismos por irradiación se debe a la absorción de rayos ultravioleta (UV) de alta energía, que causa reacciones fotoquímicas de los componentes fundamentales de las células, perjudicando su funcionamiento (Guimaráes y Nour, 2001). Generalmente mantiene la integridad celular dado a que se dirige a los ácido nucleicos dentro de la célula (Zhang *et al.*, 2015).

El UV absorbido promueve la formación de uniones entre nucleótidos adyacentes, creando moléculas dobles o dímeros. La formación de un número suficiente de

#### 4. Marco teórico

dímeros dentro de un microorganismo impide que éste duplique su DNA y RNA, impidiendo así su reproducción (Wright y Cairns, 1990)

##### ***Filtración***

Es un proceso que consiste en la separación de partículas y pequeñas cantidades de microorganismos (bacterias, virus) a través de un medio poroso. Es la fase responsable de que se cumplan los estándares de calidad para el agua potable. Desde el punto bacteriológico, los filtros tienen una eficiencia de remoción superior a 99% (Solsona y Méndez, 2002).

El tamaño de las partículas que quedan retenidas en mayor o menor proporción en los granos del lecho filtrante varía desde flóculos de 1mm hasta coloides, bacterias y virus inferiores a  $10^{-3}$  mm. Cuando el flóculo tiene un volumen mayor que el de los poros del lecho filtrante quedará retenido por cernido en los intersticios del lecho; sin embargo, en el caso de las bacterias cuyo tamaño es mucho menor que el de los poros deberán ser removidas por otra serie de fenómenos (Chulluncuy, 2011).

##### ***Desinfección por radiación***

Existen otros dos tipos de radiación que solo se han usado experimentalmente, pero que potencialmente podrían utilizarse en el futuro con buena capacidad de desinfección. Esas radiaciones son las “gamma” y las “X”. Se han reconocido dos mecanismos de desinfección por radiación: uno donde la potencia de la radiación daña el DNA del microorganismo y el segundo donde el choque de aquella contra algunos átomos de oxígeno componentes de la célula o células genera ozono y otros radicales que la disturban hasta su aniquilación (Solsona y Méndez, 2002).

#### 4.6.2 Métodos químicos

##### ***Cloro y sus derivados***

El cloro y sus derivados son por mucho los agentes desinfectantes que más se emplean en el mundo. Es posible emplear compuestos tales como: el cloro gas, el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio o compuestos organoclorados como el ácido tricloroisocianurico (cloro 90). Eventualmente todos ellos producen el ácido hipocloroso  $\text{HClO}$  y el ion hipoclorito  $\text{ClO}^-$  que son los agentes activos, y su efectividad depende de la cantidad de estos componentes que el compuesto clorado forme al estar en solución acuosa (Universidad Autónoma de Chihuahua, 2009).

El cloro es el método más utilizado como tratamiento tanto para la desinfección primaria de agua y para mantener un residual en sistemas de distribución. También se utiliza comúnmente en la oxidación y eliminación de hierro y manganeso. Es muy eficaz contra una amplia gama de patógenos, incluyendo bacterias y virus.

La reacción de los microorganismos ante el cloro está determinada por la resistencia de sus membranas, así como por la relativa afinidad química de este compuesto con las sustancias vitales del organismo. La cloración tiene varias desventajas como desinfectante, ya que no es eficaz contra quistes de protozoarios como *Cryptosporidium* (CONAGUA, 2007).

##### ***Plata coloidal***

La plata solo tiene propiedades desinfectantes en su estado coloidal, esto es cuando se presenta en partículas extremadamente pequeñas que permanecen en suspensión y que por su tamaño se cargan eléctricamente con mucha facilidad.

La plata en su forma coloidal no elimina a los virus, pero se considera de gran eficacia para destruir diversas bacterias. El mecanismo de desinfección actúa por la inactivación de las enzimas de las células bacterianas y hongos que usan oxígeno

#### 4. Marco teórico

para su metabolismo, pues causa una disrupción celular, aunque en tiempos muy variables y dependientes de la temperatura (Solsona y Méndez, 2002).

##### ***Desinfección con bromo***

El bromo una vez disuelto en el agua produce ácido hipobromoso (HOBr), el HOBr actúa de manera similar al HOCl; esto es, penetrando 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 (Solsona y Méndez, 2002).

##### ***Desinfección con yodo***

A pesar de que el ion hipoyodito no es un buen desinfectante, tanto el I<sub>2</sub> como el ácido hipoyodoso sí lo son y además presentan características microbicidas muy deseables. Ambos son buenos bactericidas y destruyen inclusive esporas, quistes y virus (Solsona y Méndez, 2002).

##### ***Desinfección por peróxido de hidrogeno***

El peróxido de hidrógeno es un fuerte oxidante. Su actividad antimicrobiana se basa en su poder oxidante. De esta forma reacciona con grupos sulfhidrilo y dobles enlaces en proteínas, lípidos y afectando por lo tanto la membrana citoplasmática (Ramon *et al.*, 2016).

##### ***Ozono***

El ozono (O<sub>3</sub>) es un gas alótropo del oxígeno. A la temperatura y presión del ambiente es un gas inestable que se descompone rápidamente para volver a la molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>). Debido a esta característica, no se puede almacenar o envasar, sino que debe generarse in situ y usarse inmediatamente. Por lo general, la ozonización se utiliza cuando se requiere su propiedad más importante: su elevado potencial oxidante, que permite eliminar los compuestos orgánicos que dan color, sabor u olor desagradables al agua y, al mismo tiempo, cuando se desea



#### 4. Marco teórico

inactivar los microorganismos patógenos del agua. Una característica importante de la ozonización es la ausencia de efecto residual, lo cual es un beneficio porque si el ozono se mantuviese en el agua le daría un sabor desagradable, pero a la vez es una desventaja, ya que, como se ha expresado, es necesario asegurar la calidad del agua hasta que llegue al consumidor mediante algún efecto residual (Solsona y Méndez, 2002).

El método de desinfección por ozonización consiste en agregar cantidades suficientes de ozono lo más rápidamente que sea posible, de manera que satisfaga la demanda y mantenga un residuo de ozono durante un tiempo suficiente para asegurar la inactivación o destrucción de los microorganismos. La demanda de ozono en la mayoría de los sistemas de abastecimiento de agua suele ser mayor a la del cloro, debido a su gran potencial de oxidación. Los procesos de desinfección por ozono normalmente tratan de mantener un residual mínimo de 0,4 a 0,5 ppm después de 10 a 20 minutos de contacto con el agua (EPA, 2011).

El ozono actúa penetrando en la pared bacteriana, formando una capa de ozono en esta y luego del contacto con algunas moléculas de ozono y la pared celular bacteriana se produce una lisis celular, destruyéndose y transformándose en compuestos inocuos al instante (Neira y Padilla, 2016).

Respecto al nivel de concentración del ozono para la desinfección del agua de consumo humano, no se conoce ningún efecto adverso directo sobre la salud. Sin embargo, el ozono puede producir subproductos (SPD) como los bromatos, el bromoformo, el ácido bromoacético, los aldehídos, las cetonas y los ácidos carboxílicos. Entre ellos, los aldehídos son probablemente los de mayor inquietud para la salud, pero la información aún es insuficiente para evaluar los riesgos de la exposición a los mismos en el agua potable. Para la desinfección secundaria se recomienda que la cloración sea inmediata a la ozonización, lo cual permitirá una elevada reducción en la formación de trihalometanos (THM). Asimismo, se

#### 4. Marco teórico

recomienda que la ozonización esté seguida de carbón activado o de absorción por una capa biológica, debido a que ciertos compuestos después del proceso son más biodegradables que lo usual y se corre el riesgo de recrudescimiento biológico en los sistemas de distribución (Solsona y Méndez, 2002).

##### ***Demanda de ozono***

La demanda inmediata de ozono en el agua permite estimar la cantidad de ozono que se debe aplicar al agua para conseguir una concentración de ozono residual. La cinética de consumo de ozono en el agua es un parámetro que depende de múltiples factores. Tales como, las pérdidas de ozono por oxidación de materia orgánica contenida en el agua, la temperatura y el pH del agua, la presión parcial del gas sobre el líquido, la difusión del ozono en el agua, la técnica de aplicación del ozono, entre otros. Todos estos factores hacen imposible un cálculo de solubilidad (Langlais *et al.*, 1991). Bataller *et al.*, (2002), recomiendan encontrar la cinética de consumo de ozono mediante la experimentación de cada caso en particular. Generalmente una dosis de 1 a 2 mg de ozono por litro de agua potable aplicado de 4 a 10 minutos producirá el residual de 0.1 a 0.4 mg/L necesarios para la desinfección de agua.

Para evaluar el daño que causan a nivel celular los desinfectantes aplicados para la remoción de bacterias existen alternativas de microscopía electrónica que pueden proveer información relevante al respecto.

## 4.7 Análisis por microscopía electrónica

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) es un instrumento muy versátil, permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, dando información morfológica, eficiente y simultáneamente del material analizado. Su versatilidad está dada en su alta resolución y apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco (Rosas, 2018). Sin embargo, la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy) suele ser una mejor opción para el análisis de muestras biológicas dado que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales minimizando el efecto de carga para minimizar el daño en la muestra.

### 4.7.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El Microscopio Electrónico de Barrido usa lentes electromagnéticas para conducir el haz de electrones hasta la muestra, barriendo su superficie y generando diferentes interacciones, lo que permite obtener imágenes con contraste topográfico o composicional (CACTI, 2017).

En un microscopio SEM se utiliza un rayo de electrones que se denomina “sonda”, a causa de la intensidad del rayo de electrones que pasa por la superficie del objeto. Los electrones en la sonda cuando encuentran un objeto serán desviados por átomos en el objeto, llamándose a esto “electrón disperso”. Sin embargo, a la vez algunos electrones en la sonda causan la emisión de “electrones secundarios” cerca de la superficie y los “rayos X” emitidos desde la sub-superficie del área del objeto. La mayoría de SEM que es usado en áreas biológicas tiene imágenes formadas desde electrones secundarios. En general, los electrones esparcidos y los rayos X

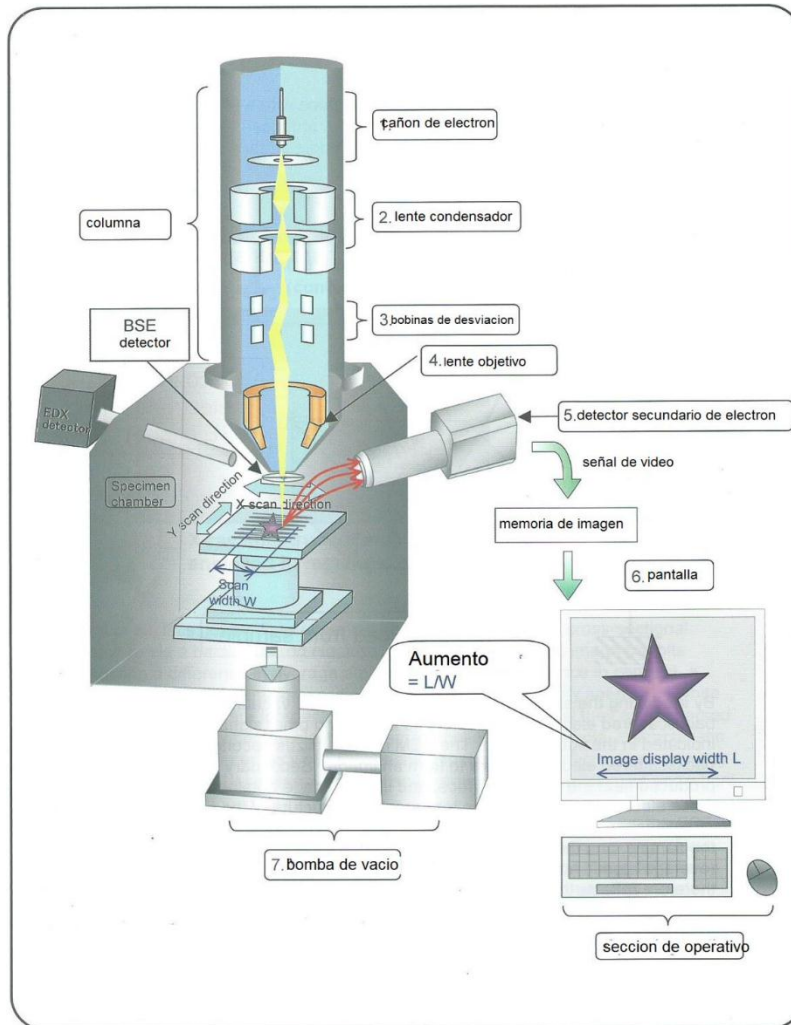
#### 4. Marco teórico

proveen información útil sobre el objeto, como se lo resumirá a continuación (Salas, 2014).

1. Electrones secundarios: Observación topográfica de la superficie
2. Electrones esparcidos en la parte posterior: Componen la observación de superficie.
3. Rayos X: El análisis elemental del espécimen.

La intensidad de electrones esparcida por el espécimen y los electrones secundarios emitidos desde el espécimen, dependen de la composición elemental de la superficie topográfica del objeto y de la energía, e inciden en la sonda de electrones emitida. Los electrones dispersos o los electrones secundarios pueden ser tomados por un electrodo de carga positiva llamado colector o ánodo. El electrón cargado se refleja sobre la pantalla fluorescente (llamada cintillador) y emite fluorescencia. La fluorescencia emitida por el electrón cargado por el cintillador es convertida a corriente eléctrica por un tubo fotomultiplicador (PMT). La corriente eléctrica amplificada por un circuito electrónico se usa para controlar la brillantez de un tubo de rayos catódico (CRT). Las velocidades de rastreo de sonda y el rayo electrónico del CRT están sincronizadas, la topografía del espécimen puede ser reproducida sobre la pantalla del CRT (Figura 3) (Salas, 2014).

#### 4. Marco teórico



**Figura 3.** Funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (Salas, 2014).

Se requieren dos condiciones para analizar muestras en un SEM: que se encuentren libres de humedad y sean conductoras. En estos microscopios las muestras no conductoras (orgánicas, biológicas, vidrios, polímeros) necesitan una cubierta metálica para lograr su observación, generalmente una cubierta de oro, o con carbono cuando se quiere realizar análisis químico. Por otro lado, las muestras conductoras pueden ser revisadas sin ningún tipo de cubierta. En el caso de las muestras biológicas se procesan deshidratando con alcohol o acetona,

## 4. Marco teórico

posteriormente son secadas por el método de punto crítico (CPD por sus siglas en inglés, Critical Point Drying) y finalmente ser metalizadas. El CPD es un método de secado que permite conservar la forma y estructura celular de la muestra. Se basa en el reemplazo de los líquidos (utilizados en la fijación, y deshidratación: procesos iniciales de conservación) por CO<sub>2</sub>, que es evaporado bajo ciertas condiciones de temperatura y presión sin dañar los tejidos de la muestra (Rosas, 2018).

### 4.7.2 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy en inglés) es un tipo de microscopio electrónico que representa la superficie de la muestra escaneándola con un haz de electrones de alta energía en un patrón de barrido. Se utilizan como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (Field Emission Gun, FEG) que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daños en muestras sensibles (ICMM, 2017).

Estos tipos de emisores de electrones pueden producir hasta 1000x la emisión de un filamento de tungsteno. Sin embargo, requerían condiciones de vacío mucho más altas. Después de que el haz de electrones salga del cañón de electrones, entonces se confinan y se enfocan en una viga monocromática enfocada delgada usando aperturas de metal y lentes magnéticas. Por último, los detectores de cada tipo de electrones se colocan en los microscopios que recogen las señales para producir una imagen de la muestra (Alyamani y Lemine, 2012).

La mayor diferencia entre un FESEM y un SEM reside en el sistema generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de

#### 4. Marco teórico

campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales (0.02-5 kV); esto ayuda a minimizar el efecto de carga en especímenes no conductores y a evitar daños en muestras sensibles al haz electrónico (UPV, 2012).

Además del daño a nivel celular visible mediante microscopía electrónica, es necesario evaluar la inactivación de las células después de los procesos de la desinfección para determinar su eficacia. Ya sea mediante técnicas de sembrado en placa para las morfologías que tienen la capacidad de crecer en agar o mediante técnicas de biología molecular para las morfologías VBNC.

#### **4.8 Método de cuantificación por filtración por membrana**

El método de filtro de membrana es un método altamente reproducible, que puede ser utilizado para evaluar la eficacia de la desinfección del agua, este método es generalmente usado para el análisis de muestras de un volumen relativamente grande, obteniendo resultados en menor tiempo que otros métodos de cuantificación de bacterias (Palma *et al.*, 1999).

El método de filtración por membrana es un método ágil, proporciona recuentos directos, la lectura de resultados se da en un menor tiempo (24 horas), además se puede utilizar en pruebas de campo, empleando accesorios adecuados. El análisis se dificulta en muestras de aguas muy turbias o con abundante carga bacteriana. Este inconveniente es posible remediarlo, haciendo diluciones de la muestra o haciendo inóculos muy pequeños de acuerdo con el tipo de muestra a analizar (Palma *et al.*, 1999).

#### 4. Marco teórico

La muestra de agua se hace pasar mediante vacío por un filtro de celulosa de 0.45 micras de tamaño del poro, para que queden retenidas en él, las bacterias deben ser colocados en un medio de cultivo específico para lo que se desea determinar en la muestra (coliformes totales, coliformes fecales y microorganismos mesofílicos), incubando a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas (Palma *et al.*, 1999).

Se debe utilizar una membrana con un diámetro de poro que permita una completa retención de las bacterias coliformes. Se debe además tener en cuenta que estos filtros estén libres de químicos susceptibles de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano, que posean una velocidad de filtración satisfactoria (Páez, 2008).



## 5. Antecedentes

Cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas para mantener un crecimiento normal tales como una baja concentración de nutrientes, temperaturas subóptimas y descendentes, salinidad elevada, pH extremo o radiación solar; *V. cholerae* adopta una estrategia de supervivencia reduciéndose en tamaño y convirtiéndose a una forma de coco adquiriendo un estado VBNC (Fernández-Delgado, 2015). En este estado *V. cholerae* mantiene sus funciones como la actividad metabólica, la expresión de genes específicos, la resistencia a los antibióticos, la virulencia y su potencial patógeno por un tiempo prolongado (Gonzales-Escalona *et al.*, 2006).

Diversos autores han demostrado la inducción al estado viable no cultivable de *V. cholerae* mediante diversas condiciones ambientales, Baker *et al.*, en 1983, probaron que al utilizar agua de mar privada de nutrientes al 24% de salinidad la inducción a cocoide se llevaba a cabo de 75 días y observando mediante microscopia electrónica una región central densa la cual se encontraba rodeada de citoplasma la cual se mostraba de manera muy ligera a la incidencia de electrones. Pruzzo *et al.*, (2003) indujeron la bacteria *V. cholerae* a su estado VBNC utilizando agua de mar artificial (ASW); después de 20 días se observó por microscopía una inducción del 100% a 5°C, mientras que a 18°C se observó una inducción del 10% de células cocoides con 90% de células en forma de bacilos cortos concluyendo que la temperatura es un factor fundamental en la inducción al estado VBNC

Asakura *et al.*, (2006) emplearon agua de mar artificial estéril (ASW) a una concentración mayor con 38% de salinidad incubándola a 4°C obteniendo una pérdida de cultivo en agar soya tripticasa (TSA) del 100% a los 60 días después de la incubación. Chaiyanan *et al.*, en 2007, reportaron que en agua de mar artificial estéril con una concentración del 1% de salinidad conservada a 4°C, las cepas de *V. cholerae* O1 y O139 bacilares adoptaban una forma VBNC en su totalidad,

## 5. Antecedentes

después de 60 días determinado mediante microscopia electrónica de barrido. Imamura *et al.*, (2015) utilizando las mismas condiciones que Chaiyanan reportaron la adopción del estado viable pero no cultivable a partir de 8 a 11 semanas de inducción observando el cambio mediante microscopia de fluorescencia. Se han utilizado medios diferentes al agua de mar artificial estéril, Mishra *et al.*, (2011) utilizaron agua dulce de lago con un pH de 6.8 incubada a 4°C observando una pérdida de cultivo del 100% a partir de los 16 días de la inducción.

Como se expuso anteriormente, se ha propuesto que la persistencia de *V. cholerae* en el medio ambiente se debe a un estado VBNC en respuesta a la inanición y bajas temperaturas; sin embargo, no se sabe si el fenotipo VBNC promueve la persistencia en regiones donde el cólera es endémico y en condiciones distintas de la inanición y la temperatura (Ali *et al.*, 2002). Las cepas de *V. cholerae* son habitantes naturales de agua salobre y sistemas estuarinos. Como respuesta al agotamiento de nutrientes, las bacterias pueden sufrir considerables cambios morfológicos, fisiológicos y químicos (Mizunoe *et al.*, 1999). Wai *et al.*, (1998) informaron que *V. cholerae* O1 TSI-4 puede cambiar a una morfología de colonia rugosa asociada con la expresión de exopolisacáridos (EPS) que promueve la formación de biopelícula, la cual le otorga resistencia al estrés osmótico y oxidativo.

Por otro lado, algunos autores han llevado la inducción de la bacteria *V. cholerae* a su morfología rugosa en agua peptonada alcalina (1% de NaCl y 1% peptona, pH 8.5) incubándola a 37°C, observando que el tiempo de inducción varía dependiendo de la cepa, mostrando la aparición de colonias con morfología rugosa desde los 7 hasta los 30 días de incubación (Suzarte *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2017; Ledón *et al.*, 2014). Aunque, de igual manera se ha podido llevar a cabo la inducción de *V. cholerae* bacilar a su variante rugosa utilizando un medio diferente al APA, Yildiz (1999) utilizó un medio mínimo M9 con limitación de carbono y suplementando con 0.02 de glucosa incubándolo a 30°C obteniendo colonias rugosas posterior al día 20 de incubación. Sun, *et al.*, (1998) demostraron por microscopia electrónica de

## 5. Antecedentes

barrido que durante el cambio de la morfología colonial de *V. cholerae* a una morfología colonial rugosa había presencia de exopolisacáridos compuesta de N-acetil-D-glucosamina, D-manosa, 6-desoxi-D-galactosa y D-galactosa (7.4: 10.2: 2.4: 3.0) los cuales rodean a la célula promoviendo la formación de biopelículas y resistencia a agentes estresantes.

Pocos estudios han sido reportados para la utilización del ozono como desinfectante de agua contaminada con alguna de las morfologías de resistencia: cocoide o rugosa. Al respecto, Orta *et al.*, (1996) reportaron para *V. cholerae* rugosa a una concentración similar a  $1.5 \times 10^8$  aplicando una concentración de ozono de 1.7 mg/L durante 8 min fue posible la obtención de 0 unidades formadoras de colonias de la bacteria. En otro estudio, éste mismo autor llevó a cabo estudios en la morfología bacilar de *V. cholerae* aplicando en muestras sintéticas con concentraciones de  $10^6$  NMP/100mL parecidas a agua residuales, un flujo de ozono con una concentración de 51.5 mg/L, bajo estas condiciones después de 8 min de ozonación se obtuvo una concentración de (1000 NMP/100 mL), y al cabo de 14 minutos la bacteria quedaba completamente destruida (Orta, 2008).

Por su parte, Casasola *et al.*, (2013) demostraron que para *Helicobacter pylori* en su morfología cocoide, conforme aumentan los valores del CT (0.11, 0.58, 1.16, 1.75, 4.08, 4.67 y 15) de la desinfección con ozono disminuye el número de microorganismos, teniendo un 89.0 a 99.98 % de inactivación de la bacteria durante la desinfección.

Así también, Casasola (2018) realizó el proceso de desinfección con ozono para *V. cholerae* en su morfología bacilar y cocoide, utilizando CT de 0.5, 1.0, 1.5, 7.5 y 18 min mg/L, obteniendo porcentajes de inactivación de 99.48, 99.55, 99.70, 99.86 y 99.99% respectivamente en la bacteria en su morfología bacilar, y para el fenotipo cocoide utilizo CT de 0.5, 1.0, 1.5, 7.5 y 18 min mg/L con un porcentaje de inactivación del 81.36, 98.67, 99.53, 99.84 y 99.99% respectivamente.

## 5. Antecedentes

Tachikawa *et al.*, (2009) aplicaron concentraciones de 0.6 mg/L y 1.7 mg/L de O<sub>3</sub> durante un tiempo de exposición de 5 y 10 minutos en la bacteria *Pseudomonas fluorescens* formadora de biopelículas. En un control inicial con una cantidad de 3.80 x10<sup>8</sup> UFC/placa, al aplicar la primera dosis de 0.6 mg/L durante 5 minutos obtuvo una reducción en la cantidad de UFC/placa teniendo una cantidad de 1.6x10<sup>8</sup> y un porcentaje de supervivencia del 42%, a la misma concentración de ozono, pero a cabo de 10 minutos la cantidad había disminuido a 1.18x10<sup>8</sup> UFC/placa con un porcentaje de supervivencia del 31%. En cuanto a la dosis de 1.7 mg/L al aplicarla durante 5 minutos la cantidad de bacterias había disminuido a 6.9 x10<sup>7</sup> UFC/placa teniendo un 18% de supervivencia de la bacteria, y al tiempo de exposición de 10 minutos obtuvo una reducción hasta el valor de 5.4x10<sup>7</sup> UFC/placa teniendo como máximo un 14% de supervivencia de la bacteria. De igual manera llevaron a cabo la medición del ozono residual después de los 10 minutos de tiempo de exposición, reportando que aún conservaba aproximadamente el 50% de ozono inicial atribuyéndolo principalmente a la descomposición del ozono en agua y a un consumo leve del ozono por parte de la biopelícula. Shikongo-Nambabi *et al.*, (2010) observaron que en cepas de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en su variante rugosa al aplicar una concentración de 0.8 y 1.6 mg/L de ozono por una hora, reducía un logaritmo en los niveles bacterianos.

No se han reportado casos de estudio en donde se muestre el daño en la ultraestructura de *V. cholerae*, sin embargo, si se han llevado a cabo en otras especies de bacterias; Thanomsub *et al.*, (2002) observaron mediante SEM que las bacterias bacilares (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Bacillus subtilis*), así como en bacterias cocoides (*Staphylococcus aureus*) en concentraciones de 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFC/mL a una exposición de 30 minutos a una concentración de ozono de 0.167 mg/min/L, los cambios en la ultraestructura de la bacteria mostraban deformación, daño y destrucción de la superficie, a los 60 minutos mostraron colapso y encogimiento, y a los 90 minutos ruptura severa y lisis celular.

## 5. Antecedentes

Zhang *et al.*, (2011) realizaron desinfección con ozono en *Pseudomonas aeruginosa* aplicando agua ozonada a una concentración de 0.51 y 0.53 mg/L de O<sub>3</sub> durante 0.5, 1, 3, 5 y 10 minutos, observando mediante SEM y TEM la presencia de vesículas sobre la superficie celular, las cuales son compuestos celulares que se filtran durante la ozonación indicando un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, daños en la membrana citoplasmática y aglutinaciones del citoplasma.

Orta *et al.*, (2016) realizaron trabajos de desinfección con ozono para *Helicobacter pylori* en su estado VBNC evaluando los daños mediante FESEM observándose en las micrografías fuga del material intracelular como resultado de daños visibles en la membrana como vesículas de la membrana externa, sugiriendo que el ozono causa lisis celular en *Helicobacter pylori*.

Feng *et al.*, (2018) observaron mediante TEM que después de aplicar un tratamiento de ozono acuoso a una concentración de 1.0 mg/L durante un tiempo de exposición de un minuto. Las células bacilares de *Vibrio parahaemolyticus*, presentaban irregularidades y rupturas en la pared celular, además de que las células parecían huecas, lo cual es el resultado de la pérdida del contenido celular (enzimas, material genético) y lo que finalmente conduce a la muerte celular.

Patil *et al.*, (2011) Aplicaron en *E. coli* una dosis de ozono a una concentración de 6 µg/mL durante 30 segundos, lo cual observo mediante FESEM que las células de *E. coli* tenían una superficie celular ligeramente alterada y dañada. Las células mostraban una rugosidad en la superficie a comparación de células sin tratamiento

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo de investigación plantea exponer el efecto del ozono sobre la ultraestructura de *V. cholerae* tanto para su forma común (bacilar) como para sus morfologías de resistencia (cocoide y rugosa) evaluado mediante la obtención de micrografías por microscopia FESEM, así como la obtención de porcentajes de inactivación por la técnica de filtro de membrana.

## 6. Objetivos

# 6. Objetivos

## 6.1 General

Evaluar la eficacia de la desinfección y el daño estructural en *Vibrio cholerae* en sus tres morfologías, sometido a desinfección con ozono, utilizando microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

## 6.2 Particulares

- [1] Inducir la bacteria *Vibrio cholerae* bacilar a su morfología rugosa mediante la incubación en agua peptonada alcalina a 37°C, y a su morfología cocoide mediante la exposición a agua de mar artificial estéril incubándola a 4°C para determinar el efecto del ozono en su ultraestructura.
- [2] Establecer dosis y tiempos de exposición para inactivar *Vibrio cholerae*, mediante la aplicación de ozono para cada una de sus morfologías.
- [3] Determinar el efecto de desinfección por ozono en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar, bacilar rugosa y cocoide mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), aplicando las dosis y tiempos de exposición establecidos.

## 7. Hipótesis

# 7. Hipótesis

Si *Vibrio cholerae* a partir de su morfología bacilar (común) puede crear adaptaciones morfológicas como rugosa y cocoide (resistentes) para adaptarse a condiciones ambientales adversas, entonces, la aplicación del ozono en diferentes concentraciones y tiempos de exposición causará daños más visibles mediante FESEM sobre la morfología bacilar comparada con las formas resistentes.

## 8. Metodología

Las pruebas iniciales consistieron en inducir la bacteria *Vibrio cholerae* a sus morfologías de resistencia ambiental cocoide y rugosa, esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

### 8.1 Inducción de *Vibrio cholerae* a la morfología cocoide.

Una suspensión de *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor fue proporcionada por el instituto de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubirán la cual se proliferó en agar triptona de soya (TSA) a 37°C durante 24 horas en una incubadora.

El inóculo se preparó a partir de una colonia aislada en una botella de cultivo con 50mL de caldo Luria la cual se dejó crecer a temperatura ambiente durante 24 horas. De este cultivo se tomaron 100 µL y se adicionaron a 50 mL de caldo Luria, el cual fue colocado en una incubadora con agitación a 200 RPM durante 3 horas, posteriormente se centrifugó en un tubo falcón estéril a 3000 RPM durante 10 minutos, desechando el sobrenadante. Se agregó 50 ml Agua de Mar Artificial Estéril (ASW), se homogenizó la bacteria en un vórtex y se centrifugó a las condiciones mencionadas anteriormente, este proceso se repitió 2 veces más para eliminar restos de caldo LB. Al pellet obtenido se le añadió 6 mL de ASW, se homogeneizó y dividió en 3 botellas de cultivo con 50 mL de ASW teniendo una concentración de  $9 \times 10^8$  células/mL (de acuerdo con el número 3 en la escala de McFarland) y conservándola en refrigeración a 4°C durante 30 días, la inducción fue monitoreada diariamente mediante tinciones de Gram observadas al microscopio óptico.



## 8.2 Inducción de *Vibrio cholerae* a la morfología rugosa.

Se tomaron colonias aisladas de un cultivo de la forma bacilar de la bacteria *V. cholerae*, las cuales fueron colocada en tubos de ensayo con 5 mL de agua peptonada alcalina (APA) al 1 y 2%, incubándolos a 37°C durante 24 horas, pasando el tiempo de incubación, se tomó una ansada y se cultivó en agar infusión cerebro corazón durante 24 hora a 37°C, se alternó el cultivo de agua peptonada alcalina a BHI durante 20 días. Una vez inducida la bacteria se conservó en placas de agar TSA resembrando cada 15 días para mantener la cepa rugosa.

## 8.3 Preparación de la suspensión bacteriana de *Vibrio cholerae* para la desinfección con ozono.

Una vez realizada la inducción, fue necesario preparar las suspensiones de la bacteria en sus tres morfologías bacilar, bacilar rugosa y cocoide para llevar a cabo la desinfección con ozono, esto se realizó de la siguiente manera:

### 8.3.1 Suspensión de la morfología bacilar para la desinfección con ozono.

Se tomó una colonia aislada con un asa bacteriológica y se colocó en una botella de cultivo con 50 mL de caldo LB colocándola en una incubadora con agitación a 200 RPM durante 3 horas, posteriormente se centrifugo en un tubo Falcon estéril a 3000 RPM durante minutos, desechando el sobrenadante.

El pellet fue colocado en una botella de cultivo con 50 mL de solución salina isotónica (SSI) obteniendo una concentración de  $9 \times 10^8$  células/mL conforme al tubo #3 de la escala de Mc Farland.

## 8. Metodología

### 8.3.2 Suspensión de la morfología cocoide para la desinfección con ozono.

La muestra se preparó centrifugando a 3000 RPM por 15 minutos la solución bacteriana contenida en ASW ya inducida completamente al estado VBNC, el pellet formado se suspendió en SSI, ajustando la concentración al #3 en la escala de McFarland.

### 8.3.3 Suspensión de la morfología rugosa para la desinfección con ozono.

Se realizaron pruebas de solubilidad de la bacteria con agua destilada estéril, agua con buffer de fosfatos y SSI para saber en qué medio era mejor para la recuperación de biomasa a partir de las placas de TSA.

La recuperación de biomasa se llevó a cabo en condiciones estériles, tomando ansadas a partir de la placa de TSA, depositándolas en tubos de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril hasta obtener una concentración aproximada de  $9 \times 10^8$  conforme al tubo #3 en la escala de McFarland.

## 8.4 Desinfección con ozono de *Vibrio cholerae*.

El primer paso para la desinfección fue preparar la solución acuosa de ozono, seguido de la determinación de la demanda inmediata de ozono y por último la desinfección con ozono.

## 8. Metodología

### 8.4.1 Preparación de la solución de ozono para la desinfección de *Vibrio cholerae*.

La solución de ozono se preparó burbujeadando ozono gas con un amperaje de 0.7 A y una corriente de gas de 0.7 L/min, en agua destilada en una columna de vidrio con capacidad de 2 L con dimensiones de 110 cm de altura por 5.5 cm de diámetro interno.

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.

El ozono es generado a partir de aire enriquecido con oxígeno en un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 1.9 g de  $\text{O}_3/\text{h}$ .

### 8.4.2 Determinación de la demanda inmediata de ozono para *Vibrio cholerae*

La determinación de la demanda inmediata de ozono se llevó a cabo de la misma manera en sus tres morfologías.

Se colocó suspensión bacteriana y desinfectante en una relación 1:9 en un tubo Falcon estéril de 50 mL durante 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo, en un matraz aforado de 100 mL con 10 mL de solución índigo II se añadieron 10 mL de la mezcla de desinfección y se llenó con agua destilada hasta el aforo.

De la solución se tomaron 10 mL los cuales se colocaron en una celda de vidrio, colocándola en un espectrofotómetro marca Hach, midiendo la absorbancia con una

## 8. Metodología

longitud de onda de 600nm para conocer la concentración de ozono residual en el agua mediante la siguiente ecuación:

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

Dónde:

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

### 8.4.3 Dosis y tiempo de exposición para la desinfección con ozono

La desinfección con ozono se llevó a cabo de la misma manera para las tres morfologías. En tubos Eppendoff de 1.5 mL estériles se añadió suspensión bacteriana y la solución desinfectante de ozono a 0.5 mg/L y 1 mg/L de acuerdo con los tiempos de contacto que se muestran en la Tabla 1. Una vez transcurrido el tiempo de contacto establecido, se adicionó tiosulfato de sodio 0.1 N estéril para detener la reacción de desinfección.

**Tabla 1.** Condiciones para la desinfección con ozono para *V. cholerae*.

CT	Tiempo (minutos)	Concentración (mg/L)
0	0	0
0.5	1	0.5
1	1	1
1.5	3	0.5
7.5	7.5	1
18	18	1

## 8. Metodología

### 8.5 Evaluación de la desinfección con ozono

Para poder evaluar los efectos de la desinfección con ozono en la ultraestructura de las células de *V. cholerae* se llevó a cabo la preparación y observación mediante microscopía FESEM. Además, para evaluar cuantitativamente los efectos de la desinfección se utilizó el método de cuantificación por filtro de membrana.

#### 8.5.1 Preparación de las muestras para microscopía FESEM

Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estos a su vez en una microcentrífuga (Spectrafuge 24D Labnet) a 10,000 RPM durante 10 minutos, Se desechó el sobrenadante recuperando el pellet, se agregó 1 mL de glutaraldehído al 3% con un buffer de fosfato dejándolo reposar durante 2 horas, una vez transcurrido el tiempo de reposo se centrifugó nuevamente a 10,000 RPM durante 10 minutos.

Las muestras son deshidratadas con soluciones de agua-etanol a diferentes concentraciones crecientes (10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% v/v) dejando reposar durante 5 min y centrifugando a 10 RPM durante 10min para cada concentración, manteniendo las muestras en alcohol absoluto para ser llevadas a secado a punto crítico.

El procedimiento de secado en punto crítico se llevó a cabo en el Instituto de Biología de la UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias, el cual consiste en colocar los pellet formados y deshidratados en un pequeño sobre de papel arroz y cerrados con una grapa, el pellet se colocó en una cámara de punto crítico (EMITECH K850), con la ayuda de CO<sub>2</sub> se enfrió hasta 0°C, posteriormente las muestras son lavadas con CO<sub>2</sub> de 5 a 10 min, pasando este tiempo la cámara se llenó por completo de CO<sub>2</sub> hasta que desaparezcan las burbujas, se calentó

## 8. Metodología

hasta 40°C y una presión oscilante de 1100 PSI a 1200 PSI, una vez alcanzadas las condiciones se apagó el equipo y se dejó reposar por 10 minutos, después se inyectó aire y se esperó hasta que la presión bajara a 0 PSI para poder retirar las muestras.

Después del secado a punto crítico, las muestras se colocaron cuidadosamente en porta muestras cilíndrico de latón con cinta de carbón en la parte superior para su observación mediante FESEM.

Las muestras se observan en un microscopio electrónico de alto vacío (JEOL JSM-7600F) en el Laboratorio Universitario de Microscopia Electrónica (LUME) del instituto de investigación en materiales de la UNAM por el Dr. Omar Novelo Peralta.

Se tomaron las micrografías correspondientes a las diferentes morfologías y tratamientos para observar los cambios estructurales, teniendo como control muestras sin tratamiento (CT=0).

### 8.5.2 Cuantificación por Filtro de membrana

Para evaluar los efectos de la desinfección con ozono en las morfologías bacilar y bacilar rugosa cultivadas en APA al 1 y 2% de *V. cholerae*, se llevaron a cabo pruebas con filtro de membrana con modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SSA1-1998 sustituyendo el agar ENDO o MFC por agar TSA. Omitiendo a la morfología cocoide dado a que no crece en medios de cultivo rutinarios.

Se realizaron pruebas preliminares para determinar la dilución en la cual se puede realizar un conteo significativo de colonias bacterianas.

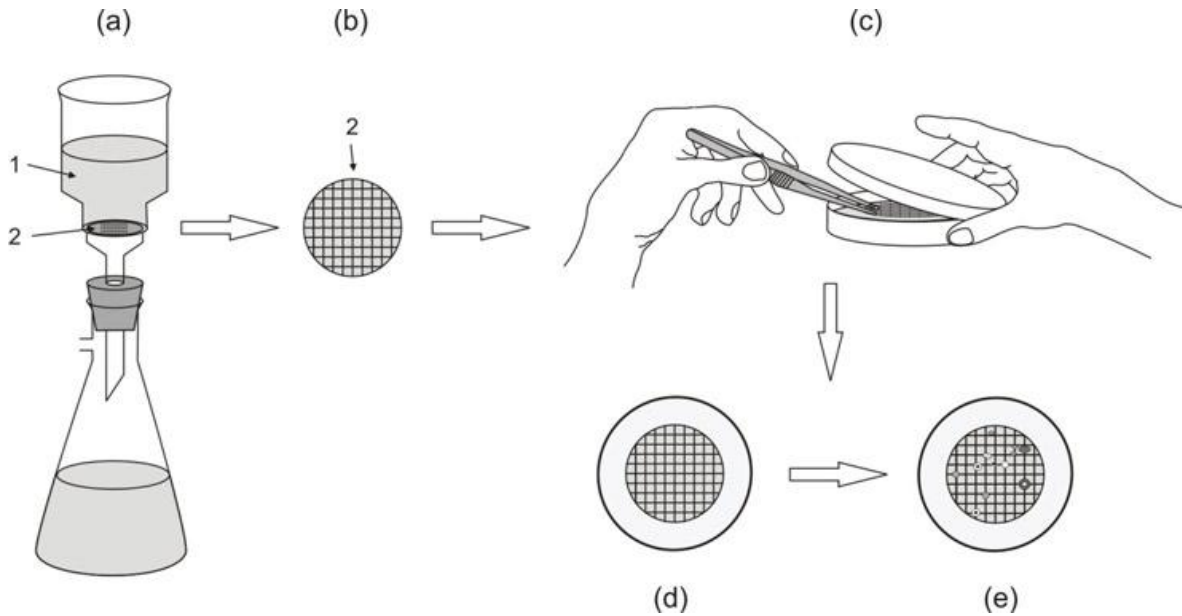
## 8. Metodología

Se preparó una solución bacteria de *V. cholerae* de 100mL con SSI para la morfología bacilar y agua destilada estéril para la variante rugosa a una densidad bacteriana de  $7 \times 10^7$  UFC/mL para cada uno de los tiempos de contacto. Se agregó una alícuota de ozono a una concentración de 0.5 y 1 mg/L a un tiempo de 1, 3, 7.5 y 18 min. Una vez terminada la desinfección se añadió tiosulfato de sodio al 0.1N para detener la acción oxidativa del ozono, para posteriormente llevar a cabo diluciones consecutivas seriadas 1:10 hasta llegar a una dilución de  $10^{-2}$  para la morfología bacilar y  $10^{-5}$  para la variante rugosa.

En un equipo de filtración se colocó con unas pinzas estériles una membrana de celulosa con poros de 47  $\mu\text{m}$ , se hace pasar el volumen de la dilución; las bacterias quedaran retenidas en la superficie de la membrana. Entre cada filtración se lleva a cabo un lavado con 100 mL de agua destilada.

Posteriormente se retiró la membrana del equipo de filtración y se colocó en una caja Petri de 60x15 con medio TSA, la cual se incubo durante 24 horas a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se llevó a cabo el conteo de las colonias formadas (Figura 4).

## 8. Metodología



**Figura 4.** Metodología de cuantificación por filtro de membrana. a) la muestra pasa por un kit de filtración aplicando vacío b) el filtro es retirado en condiciones estériles c) el filtro es colocado en la superficie de agar sólido d) se mantiene en incubación por 24 horas e) se lleva a cabo el conteo de las colonias visibles. Recuperado de: <http://innotec.com.vn/en/phuong-phap-mang-loc-phan-tich-vi-sinh-vat-trong-nuoc/> (consultado el 11 de feb de 2019).

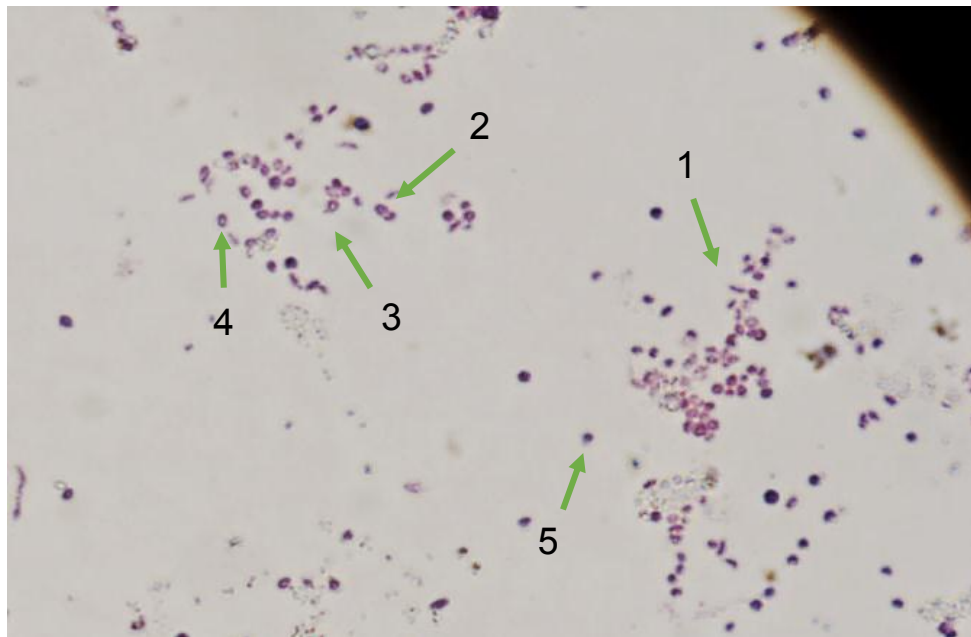
Aunque no fue una actividad propiamente desarrollada en la presente tesis, cabe hacer mención que para evaluar la inactivación de la bacteria *V. cholerae* en su morfología cocoide se consideraron datos generados dentro del proyecto bajo las mismas condiciones de desinfección con ozono. La técnica usada para la cuantificación de la bacteria cocoide antes y después del proceso de desinfección fue la metodología de q-PCR (del inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction; o q-PCR) combinada con un colorante de intercalación en ácidos nucleicos propidio de monoazida (PMA), el cual penetra selectivamente las células con las membranas celulares comprometidas por acción de los desinfectantes, mientras que una membrana celular intacta presenta una barrera para esta molécula. Con PMA es posible detectar bacterias en estado viables y comprobar la eficacia de los procesos de desinfección del agua. La aplicación de esta metodología es una herramienta efectiva para evaluar la inactivación de bacterias en estado VBNC.



## 9. Resultados y discusión

### 9.1 Inducción a la morfología cocoide

La inducción de la morfología bacilar a la forma cocoide de *Vibrio cholerae* se observó diariamente por medio de tinciones de Gram en el microscopio óptico, con la finalidad de establecer el tiempo que tarda la bacteria en cambiar de morfología en agua de mar artificial estéril. Al primer día se observan únicamente células bacilares, al día 10 se observan células en forma de “U”, al día 23 se encontraron células en forma de “U” elongada, al día 38 se encontraron células en forma anillada y por último al día 57 se observó una transformación del 90% de las células a la forma cocoide (Figura 5).



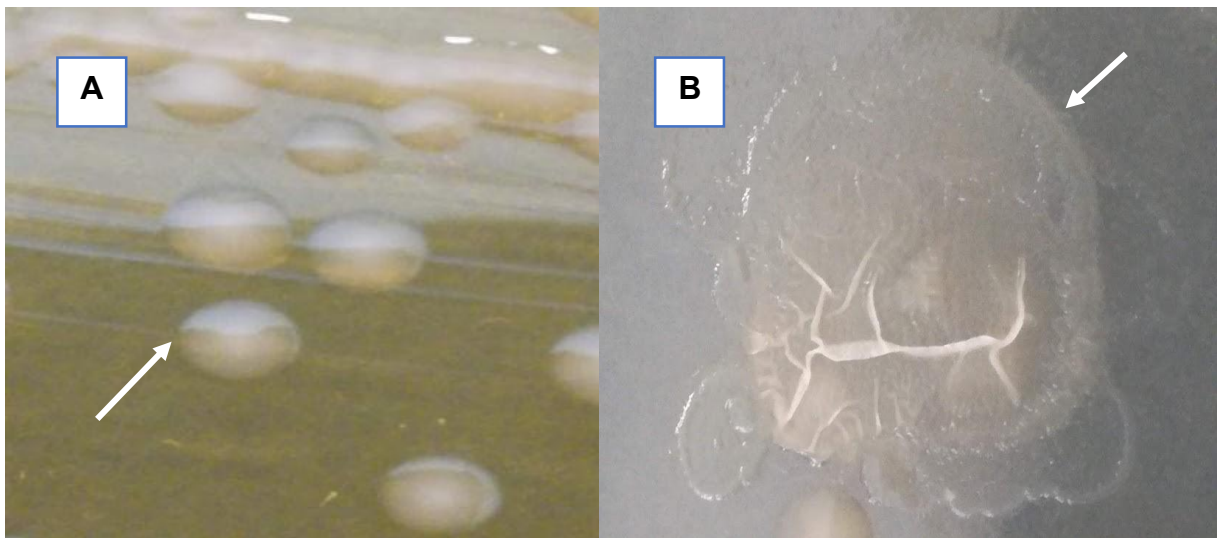
**Figura 5.** Morfología de *V. cholerae*. Tinción Gram al día 42 después de iniciada la inducción a la forma cocoide observada en microscopio óptico a 100x aumentos con aceite de inmersión. 1) bacilo, 2) forma de “U”, 3) formar de “U” elongada 4) forma anillada y 5) forma cocoide.

## 9. Resultados y discusión

Diversos estudios han demostrado las condiciones para inducir *V. cholerae* a su morfología cocoide, se reporta que los días de inducción pueden variar de 9 hasta 80 días, en diversos medios acuosos como agua de mar artificial al 1% hasta el 35% de salinidad, agua esterilizada, solución salina tamponada, agua dulce y medios acondicionados, y diversas temperaturas 4 hasta 37°C; monitoreando la inducción mediante pérdida de cultivo, microscopía SEM, FESEM y de fluorescencia (Baker *et al.*, 1983; Pruzzo *et al.*, 2003; Asakura *et al.*, 2006; Chaiyanan *et al.*, 2007; Colwell, 2009; Mishra *et al.*, 2011; Imamura *et al.*, 2015).

### 9.2 Inducción de *Vibrio cholerae* a la morfología rugosa

Al cabo de 12 días la cepa de *V. cholerae* en su morfología bacilar había cambiado su fenotipo a su variante rugosa, las colonias adoptaron una forma irregular y un borde ondulado, como se muestra en la Figura 6. Tanto para la cepa cultivada al 1 y 2% de APA.



**Figura 6.** Colonias de *V. cholerae* en agar TSA. A) bacilar y B) variante rugosa.

## 9. Resultados y discusión

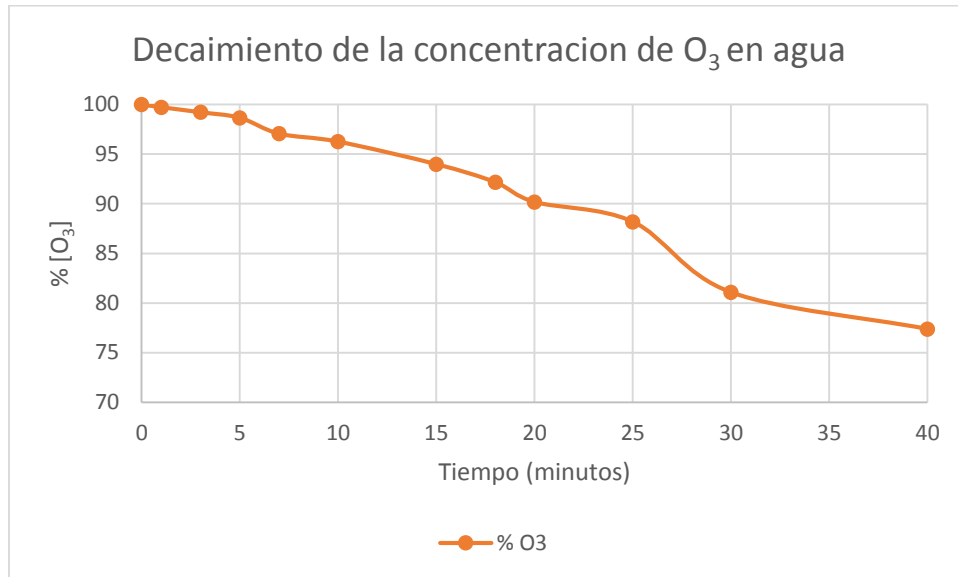
Algunos autores (Suzarte *et al.*, 2005, Payne *et al.*, 2017) han llevado la inducción de *V. cholerae* en agua peptonada alcalina (1% de NaCl y 1% peptona, pH 8.5) incubándola a 37°C, observando que el tiempo de inducción varía dependiendo de la cepa, mostrando la aparición de colonias con morfología rugosa de los 7 hasta los 30 días de incubación.

Como un método rápido de confirmación se tomó una ansada de cultivo puro colocándolo en una lámina y agregando una gota de solución salina al 2%, agitando la lámina durante 2 minutos, una vez transcurrido el tiempo se presentó grumos, por lo cual la cepa de *V. cholerae* correspondía a su fenotipo rugoso tal como indica OMS (2007) en su Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*.

### 9.3 Decaimiento del ozono en agua

La estabilidad del ozono en agua es de suma importancia en el proceso de desinfección, debido a que el tiempo de vida media del O<sub>3</sub> es muy corto descomponiéndose rápidamente en oxígeno, por lo que es necesario determinar el tiempo de residencia en el agua.

## 9. Resultados y discusión



**Figura 7.** Decaimiento de la concentración de ozono en agua destilada.

En la Figura 7 se observa que la concentración de O<sub>3</sub> en agua destilada disminuye con respecto al tiempo; a partir de una concentración de 3.51 mg/L ésta se mantiene de manera casi constante durante los primeros 10 minutos, hasta el minuto 20 se asegura que se mantiene un 90% del O<sub>3</sub> inicial y decayendo de manera considerable después de este tiempo. Por lo que es posible trabajar con muestras de ozono dentro de este intervalo de tiempo y garantizando que la concentración calculada es la dosis real durante la desinfección.

Feng *et al.*, (2018) explicaron que la estabilidad del ozono va a ser afectada por la concentración, temperatura, pH, presencia de materia orgánica y iones metálicos y exposición a los rayos UV, además de que el ozono en su fase acuosa es menos estable que en su fase gaseosa, por lo que tiende a decaer en los primeros 20 minutos hasta un 24.3% de la concentración inicial.

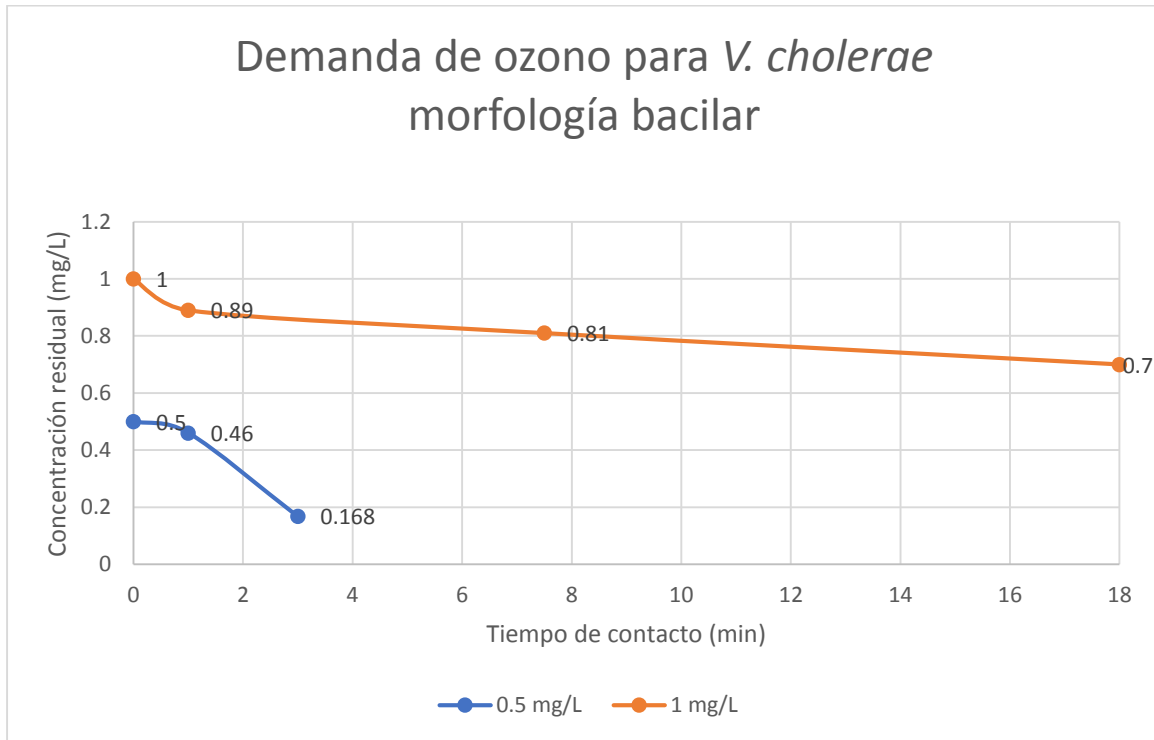
## 9. Resultados y discusión

### 9.4 Determinación de las demandas de ozono

La demanda de ozono en la morfología bacilar de *V. cholerae* se muestra en la Figura 8. Se observa una relación dosis-dependiente en donde mientras menor es la concentración de  $O_3$  el consumo es mayor. Para una dosis a una concentración inicial de 0.5 mg/L se tiene una concentración de ozono de 0.46 mg/L después de pasado un minuto, sin embargo, la concentración residual de  $O_3$  decae drásticamente después de 3 minutos obteniendo un residual de ozono de 0.16 mg/L. En cuanto a la dosis mayor de ozono de 1 mg/L, la concentración una vez transcurrido 1 minuto fue de 0.89 mg/L, posteriormente paso a 0.81 mg/L a los 7 minutos y 30 segundos, y por último el residual de  $O_3$  una vez pasado 18 minutos de exposición fue de 0.7 mg/L.

La norma europea EN-1278:2010 sugiere que, al utilizar ozono como desinfectante para microorganismos, el ozono residual del agua debe mantener una concentración de 0.4 mg/L después 4 minutos de la aplicación. Por lo que únicamente la concentración de 1 mg/L cumple lo establecido con dicha norma.

## 9. Resultados y discusión

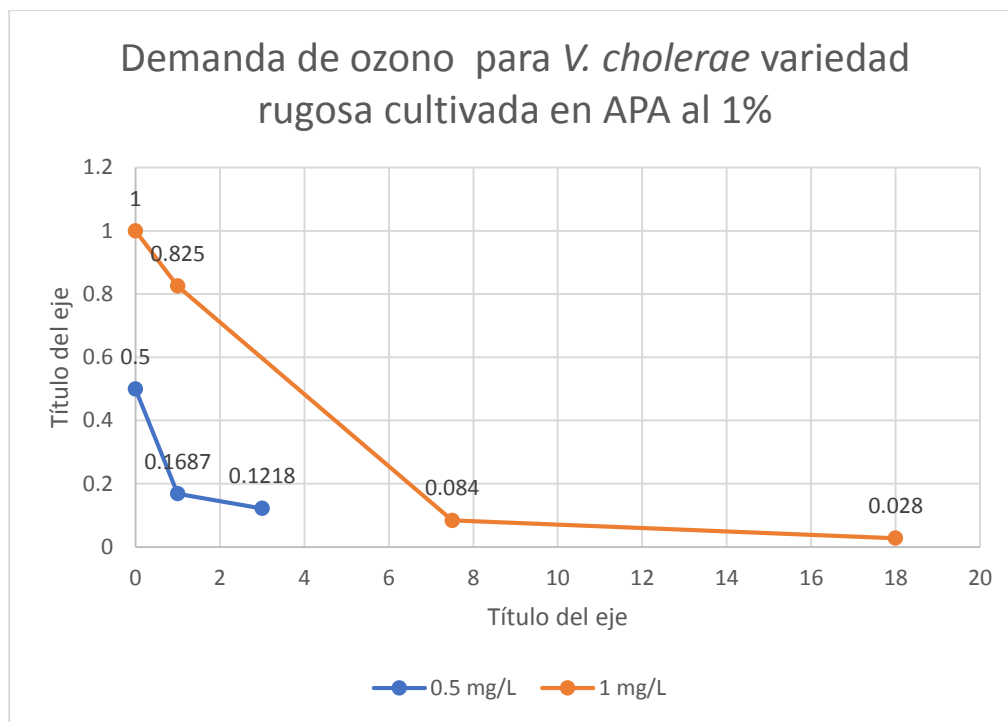


**Figura 8.** Demanda de ozono para *V. cholerae* en su morfología bacilar.

En la Figura 9 se observa la demanda de ozono de *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA al 1 %, en una dosis con una concentración inicial de  $O_3$  de 0.5 mg/L, después de 1 minuto la concentración residual baja drásticamente a 0.16 mg/L y al cabo de 3 minutos se mantiene un residual similar al anterior teniendo una concentración de ozono de 0.12 mg/L. Para la dosis de  $O_3$  de 1 mg/L, después de un minuto de la aplicación el residual conserva el 80% del ozono inicial (0.825 mg/L), sin embargo, al plazo de 7 minutos y 30 segundos la concentración de ozono baja drásticamente, aún más en comparación con la morfología bacilar, teniendo hasta una concentración de 0.084 mg/L, y al cabo de 18 minutos el residual de  $O_3$  es de 0.028 mg/L. Sin embargo, la dosis alta ozono (1 mg/L) a pesar de que decae drásticamente en la concentración, se puede observar en la gráfica que a los 4 minutos después de la aplicación se conserva un residual de  $O_3$  mayor a 4 mg/L.

## 9. Resultados y discusión

Lo anterior se puede atribuir a dos factores: 1) la poca estabilidad del  $O_3$  en su fase acuosa y 2) el consumo del ozono por la biopelícula de la bacteria. Tachikawa *et al.*, (2009) obtuvo resultados similares en *Pseudomonas fluorescens* formadora de biopelículas, en donde al aplicar concentraciones pequeñas (0.51 mg/L) y grandes (1.57 mg/L) de  $O_3$  al cabo de 10 minutos de tiempo de exposición se conservaba aproximadamente el 50% de ozono inicial atribuyéndolo principalmente a la descomposición del ozono en agua y que al consumo de ozono por la biopelícula.



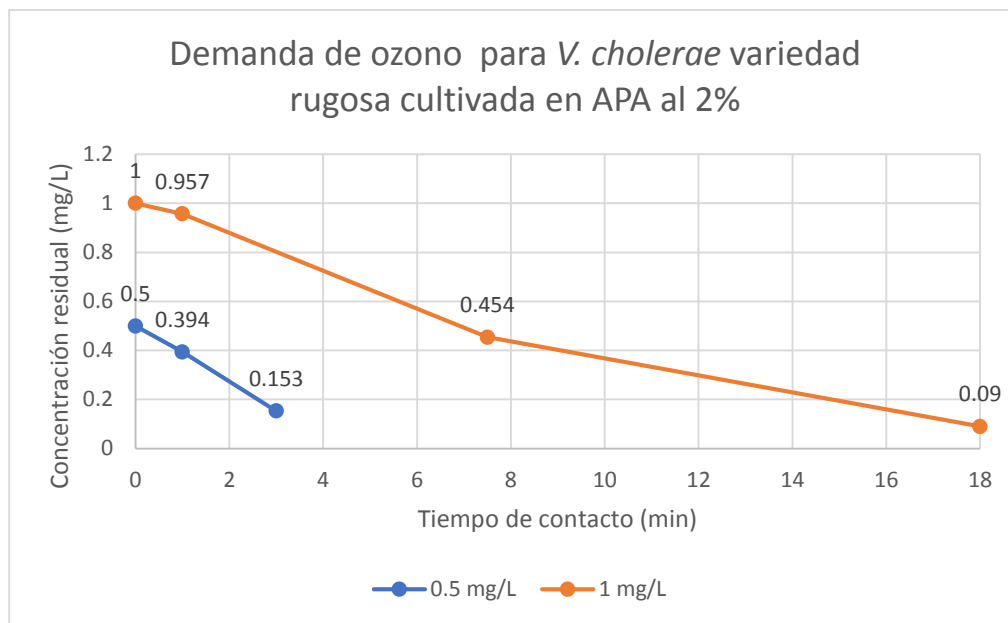
**Figura 9.** Demanda de ozono para *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA 1%.

La demanda de ozono de *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA al 2 % se presenta en la Figura 10, observa que para una dosis con concentración inicial de 0.5 mg/L pasado después de la aplicación 1 minuto el ozono residual se mantiene en 0.39 mg/L, en cambio la concentración residual de  $O_3$  decae drásticamente

## 9. Resultados y discusión

después de 3 minutos obteniendo un residual de ozono de 0.153 mg/L. En cuanto a la dosis mayor de ozono de 1 mg/L, la concentración una vez transcurrido 1 minuto fue de 0.957 mg/L, posteriormente paso a 0.454 mg/L a los 7 minutos y 30 segundos, después de este tiempo y hasta los 18 minutos después de la aplicación, el residual de O<sub>3</sub> bajo hasta una concentración de 0.09 mg/L. Para la dosis alta de ozono (1 mg/L) cumple con la norma europea EN-1278:2010 debido a que al cabo de 4 minutos de exposición la concentración residual está por encima de 6 mg/L.

En comparación con el cultivo en APA al 1%, el consumo de ozono en APA al 2% es menor para ambas dosis (0.5 mg/L y 1 mg/L) esto puede deberse a que la bacteria cultivada en APA al 2% generó una cantidad menor de biopelícula como se puede observarse en la Figura 10.



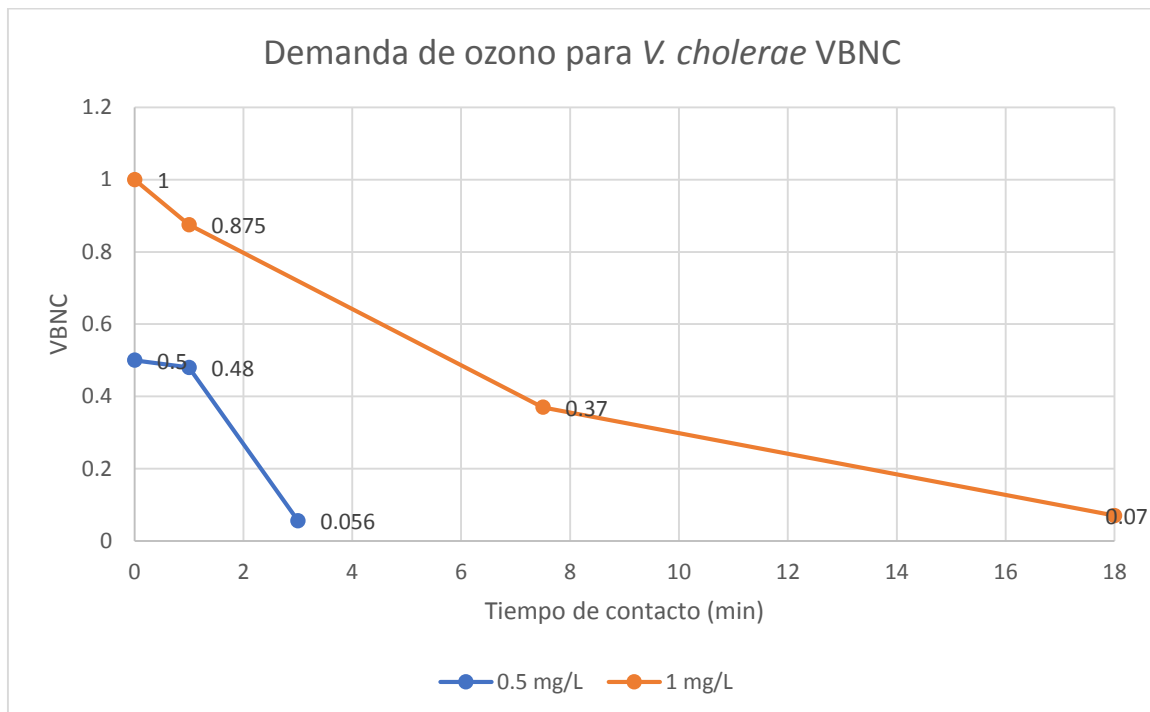
**Figura 10.** Demanda de ozono para *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA 2%.

En la Figura 11 se observa la demanda de ozono de *V. cholerae* VBNC, en una dosis con una concentración baja 0.5 mg/L se conserva un 96% (0.48 mg/L) de la



## 9. Resultados y discusión

concentración inicial pasado un minuto, sin embargo, el residual decae drásticamente hasta una concentración de  $0.056 \text{ mg/L}^{-1}$  después de los 3 minutos de aplicación, en cambio, a una concentración inicial de  $1 \text{ mg/L}^{-1}$ , después de un minuto de la aplicación el residual de ozono mantiene un 87% de la concentración inicial ( $0.875 \text{ mg/L}$ ), al plazo de 7 minutos y 30 segundos la concentración de ozono baja hasta una concentración de  $0.37 \text{ mg/L}$ , sin embargo al cabo de 18 minutos el residual de  $\text{O}_3$  es de  $0.07 \text{ mg/L}$ . Se observa que a 6 minutos de exposición de la concentración inicial de  $1 \text{ mg/L}$  la concentración se mantiene arriba de  $0.4 \text{ mg/L}$  por lo que da cumplimiento a lo establecido con la norma europea EN-1278:2010.



**Figura 11.** Demanda de ozono para *V. cholerae* morfología cocoide.

## 9. Resultados y discusión

### 9.5 Cálculo de la Inactivación de *V. cholerae* por cuantificación por filtro de membrana

Dado a que la morfología cocoide carece de la capacidad de reproducirse en medio de cultivo rutinarios, únicamente se llevó a cabo la experimentación para el cálculo de la inactivación para las morfologías bacilar y rugosa cultivada en APA 1% y APA 2%. Adicionalmente y como parte del mismo proyecto y con información generada dentro del grupo de trabajo, se establecieron los porcentajes de inactivación de la bacteria en su forma cocoide cuantificados por q-PCR combinada con PMA.

Para *V. cholerae* en su morfología bacilar se obtuvo que después del tratamiento con ozono, se observó una relación inversamente proporcional entre el aumento de los valores del CT con la disminución en el promedio de UFC/100mL. Se partió de una cantidad inicial sin tratamiento de  $5.25 \times 10^7$  UFC por cada 100mL, al aplicar un CT de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$  el promedio bajo hasta un valor de 7.175 UFC/100mL logrando disminuir 3.86 log y hasta un máximo de disminución de 7.20 log en el CT  $7.5 \text{ mg min L}^{-1}$  teniendo únicamente 4.25 UFC por cada 100mL. Se obtuvieron porcentajes de inactivación superiores al 99% desde el CT inicial de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$  (99.98%), en CT posteriores todos los valores de inactivación se mantienen mayores al 99.99%. tal cómo se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Datos de la inactivación mediante la desinfección con ozono de *V. cholerae* bacilar

CT (mg min L <sup>-1</sup> )	O <sub>3</sub> (mg/L)	Tiempo (min)	UFC/100mL	Log N <sub>0</sub> /N	%de inactivación
0	0	0	52500000	0	0
0.5	0.5	1	7175	3.8643374	99.98633333
1	1	1	4250	4.0917703	99.99190476
1.5	0.5	3	115	5.6594614	99.99978095
7.5	1	7.5	3.25	7.2082759	99.99999381
18	1	18	4.25	7.0917703	99.9999919

## 9. Resultados y discusión

Para *V. cholerae* en su variante rugosa cultivada en APA al 1% se tiene que después del tratamiento con ozono, se observó una relación inversamente proporcional entre el aumento de los valores del CT con la disminución en el promedio de UFC/100mL. Se partió de una cantidad inicial sin tratamiento de  $7 \times 10^7$  UFC por cada 100mL, al aplicar un CT de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$  el promedio bajo hasta un valor de  $8 \times 10^6$  UFC/100mL logrando disminuir 0.94 log y hasta un máximo de disminución de 2.10 log en el CT  $7.5 \text{ mg min L}^{-1}$  disminuyendo el promedio de UFC por cada 100mL a una concentración de  $5.5 \times 10^5$ . Se obtuvo un porcentaje de inactivación del 88.57% desde el CT inicial de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$ , el cual fue incrementando hasta alcanzar un valor del 99.21% en los dos últimos CT ( $7.5$  y  $18 \text{ mg min L}^{-1}$ ) como se muestra en la Tabla 3.

En comparación con lo reportado por Shikongo-Nambabi, *et al.*, (2010) el cual logra una reducción de 1 log en los niveles bacterianos *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Se observa que la desinfección es de casi dos veces mayor en *V. cholerae* teniendo una reducción de 2.10 log. En cuanto a los porcentajes de inactivación se tiene un intervalo del 88.57 al 99.21, sin embargo, Tachikawa *et al.*, (2009) reporta que en *Pseudomonas fluorescens* el porcentaje de inactivación va está en un intervalo del 58% al 86% el máximo punto aplicando una concentración de 1.7. mg/L durante 10 minutos.

**Tabla 3.** Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA al 1%.

CT (mg min L <sup>-1</sup> )	O3 (mg/L)	Tiempo (min)	UFC/100mL	Log N0/N	% de inactivación
0	0	0	70000000	0	0
0.5	0.5	1	8000000	0.94200805	88.5714286
1	1	1	7500000	0.97003678	89.2857143
1.5	0.5	3	6500000	1.03218468	90.7142857
7.5	1	7.5	550000	2.10473535	99.2142857
18	1	18	550000	2.10473535	99.2142857

## 9. Resultados y discusión

Para *V. cholerae* en su variante rugosa cultivada en APA al 2% se tiene que después del tratamiento con ozono, se observó una relación inversamente proporcional entre el aumento de los valores del CT con la disminución en el promedio de UFC/100mL. Se partió de una cantidad inicial sin tratamiento de  $7.33 \times 10^6$  UFC por cada 100LI, al aplicar un CT de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$  el promedio bajo hasta un valor de  $7 \times 10^5$  UFC/100mL logrando disminuir 1.02 log y hasta un máximo de disminución de 3.35 log en el CT  $7.5 \text{ mg min L}^{-1}$  disminuyendo el promedio de UFC por cada 100mL a una concentración de  $3.25 \times 10^3$ . Se obtuvo un porcentaje de inactivación del 90.45% desde el CT inicial de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$ , el cual fue incrementando hasta alcanzar un valor del 99.95% en el último CT de  $18 \text{ mg min L}^{-1}$  como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de *V. cholerae* variante rugosa cultivada en APA al 2%

CT (mg min L <sup>-1</sup> )	O3 (mg/L)	Tiempo (min)	UFC/100mL	Log N0/N	% de inactivación
0	0	0	7333333.33	0	0
0.5	0.5	1	700000	1.0202033	90.45454545
1	1	1	500000	1.1663314	93.18181818
1.5	0.5	3	77500	1.9759997	98.94318182
7.5	1	7.5	5750	3.1056335	99.92159091
18	1	18	3250	3.3534180	99.95568182

En la Tabla 5 se muestran los datos de la desinfección con ozono en la morfología cocoide de *V. cholerae* los cuales fueron medidos mediante qPCR en combinación con el pigmento PMA. a partir de una concentración inicial de  $7.35 \times 10^4$  UFC al aplicar un CT de  $0.5 \text{ mg min L}^{-1}$  se obtuvo una reducción de 0.73 log la cual fue aumentando conforme al valor del CT, teniendo hasta un máximo de reducción de 3.32 log. el porcentaje de inactivación fue aumentando de 81.36 hasta 99.95%, este último teniendo una cantidad de UFC de 35.

## 9. Resultados y discusión

**Tabla 5.** Datos de la inactivación por la desinfección con ozono de *V. cholerae* en su morfología cocoide.

CT (mg min L <sup>-1</sup> )	O <sub>3</sub> (mg/L)	Tiempo (min)	UFC	Log N <sub>0</sub> /N	% de inactivación
<b>0</b>	0	0	73500	0	0
<b>0.5</b>	0.5	1.0	13700	0.73	81.36
<b>1.0</b>	1.0	1.0	878	1.92	98.81
<b>1.5</b>	0.5	3	345	2.33	99.53
<b>7.5</b>	1	7.5	114	2.81	99.84
<b>18</b>	1	18	35	3.32	99.95

## 9.6 Evaluación del daño por ozono en la ultraestructura de *Vibrio cholerae*

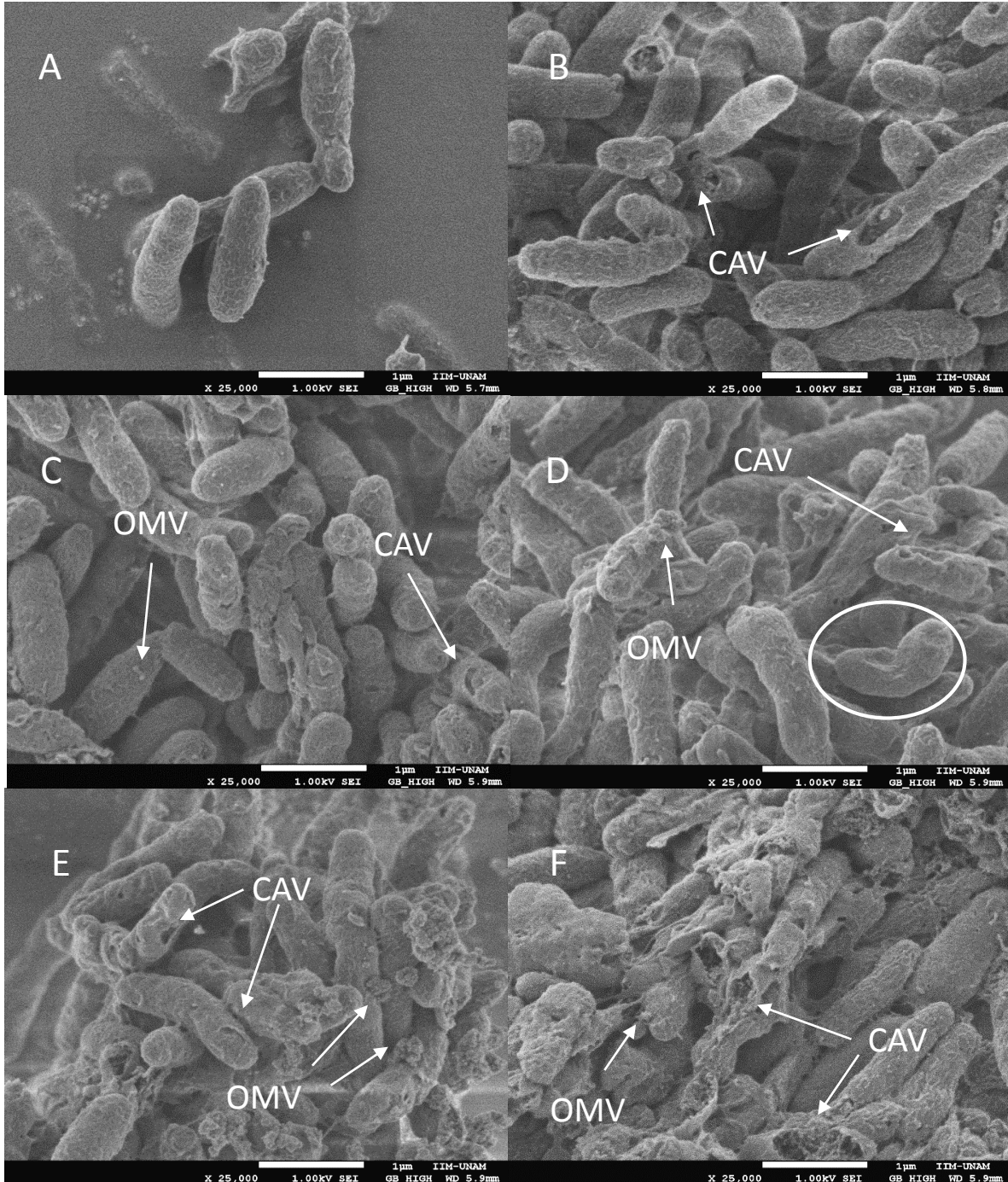
Las micrografías de *V. cholerae* después del tratamiento con ozono para la morfología bacilar se muestran en la Figura 12. El daño en la ultraestructura es proporcional al CT utilizado, aumentando el daño y deterioro de la ultraestructura conforme aumenta la concentración y el tiempo de exposición al O<sub>3</sub>. Desde las Figuras 12A hasta la 12F se observan la formación de cavidades (CAV) en la pared celular, aumentando de magnitud conforme aumenta el CT. La diferencia de tamaño en las cavidades puede atribuirse al aumento del tiempo de exposición y a la concentración del O<sub>3</sub>. En la Figura 12D se puede observar (encerrada en un círculo) una célula deformada y achatada. En la Figura 12B hasta la 12F se puede apreciar la formación de vesículas de la membrana externa (OMV) las cuales varían de tamaño desde 0.02 hasta 0.2 µm como respuesta a la acción oxidativa del desinfectante.

Todo lo anterior se debe dado a que, en las bacterias Gram negativas las capas de lipoproteínas y lipopolisacáridos son los primeros sitios de contacto que resulta en destrucción y el aumento de la permeabilidad celular, y finalmente, en la lisis celular. Los dobles enlaces de los lípidos insaturados de la envoltura celular son particularmente vulnerables al ataque del ozono como lo explica Zhang *et al.*, (2011) en sus estudios de desinfección con ozono en *Pseudomonas aeruginosa*, en el cual reporta que la bacteria después del tratamiento con el desinfectante no mostraba deformación alguna, sin embargo, presentaba una gran cantidad de vesículas en la superficie de la envoltura celular lo cual era un indicador del aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática. McBroom (2007) indica que la producción de las vesículas de la membrana externa ofrece a la célula un método eficaz para la eliminación y remodelación de los componentes de la envoltura, por lo que la cantidad de liberación de vesículas se correlaciona con la acumulación del

## 9. Resultados y discusión

material que se produce bajo estrés y se exagera con el deterioro de los mecanismos normales de mantenimiento y respuesta de la célula. Thanomsub *et al.*, (2002) mencionan que el efecto del ozono en células bacilares de *E. coli* y *B. subtilis* conforme aumenta el tiempo de exposición los cambios en la ultraestructura de la bacteria mostraban después de 30 minutos la deformación, daño y destrucción de la superficie, a los 60 minutos mostraron colapso y encogimiento, y a los 90 minutos ruptura severa y lisis celular.





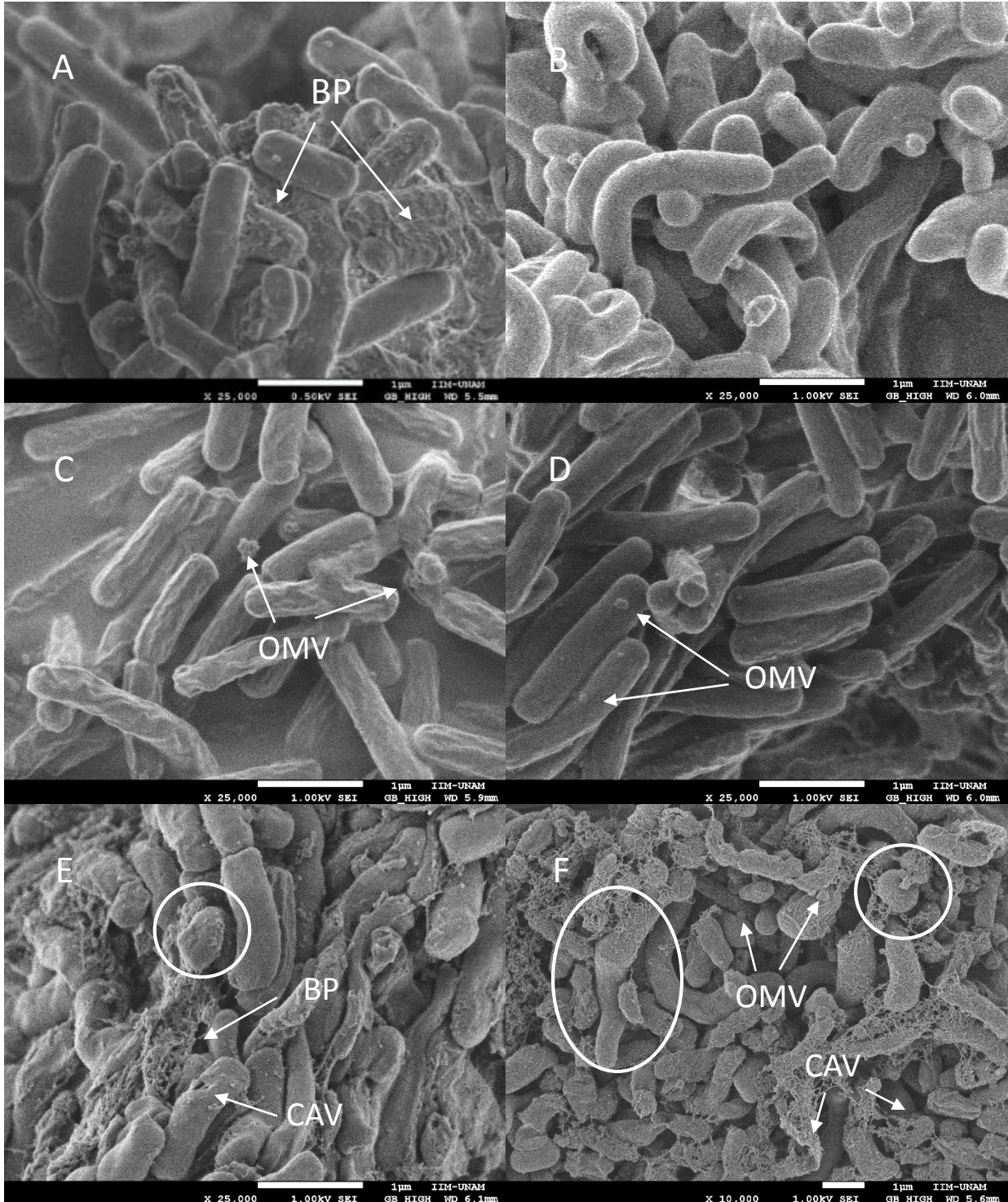
**Figura 12.** *V. cholerae* morfología bacilar. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (CAV=cavidades, OMV=vesículas de la membrana externa).



## 9. Resultados y discusión

En la Figura 13 se muestran los efectos causados del ozono en la variante rugosa de *V. cholerae* cultivada en APA al 1%, en la Figura 8A se observa la muestra sin tratamiento en la cual se aprecia la formación de la biopelícula (BP) la cual rodea a las células bacterianas y formando agregados celulares. En la Figura 13B se observa que las bacterias aún están rodeadas de biopelícula y formando agregados. A partir de la Figura 13C hasta la 13F se puede inferir que la biopelícula se presenta en mucha menor cantidad, además, se puede observar la aparición de OMV. Para los últimos CT 7.5 y 18 se llega a observar la presencia de células con CV, así como deformaciones en los bacilos (señaladas en un círculo).

Suzarte *et al.*, (2005) y Ledón *et al.*, (2014) explican que la biopelícula es capaz de proteger a las células inmersas y recubiertas de la acción bactericida de desinfectantes comunes como el cloro y el peróxido de hidrogeno. De igual manera se sugiere que la aparición de la resistencia a la penetración del ozono dentro de la biopelícula es debido a reacciones del ozono con los constituyentes de la biopelícula, lo cual podría desacelerar tasas de inactivación con ozono (Tachikawa *et al.*, 2009).



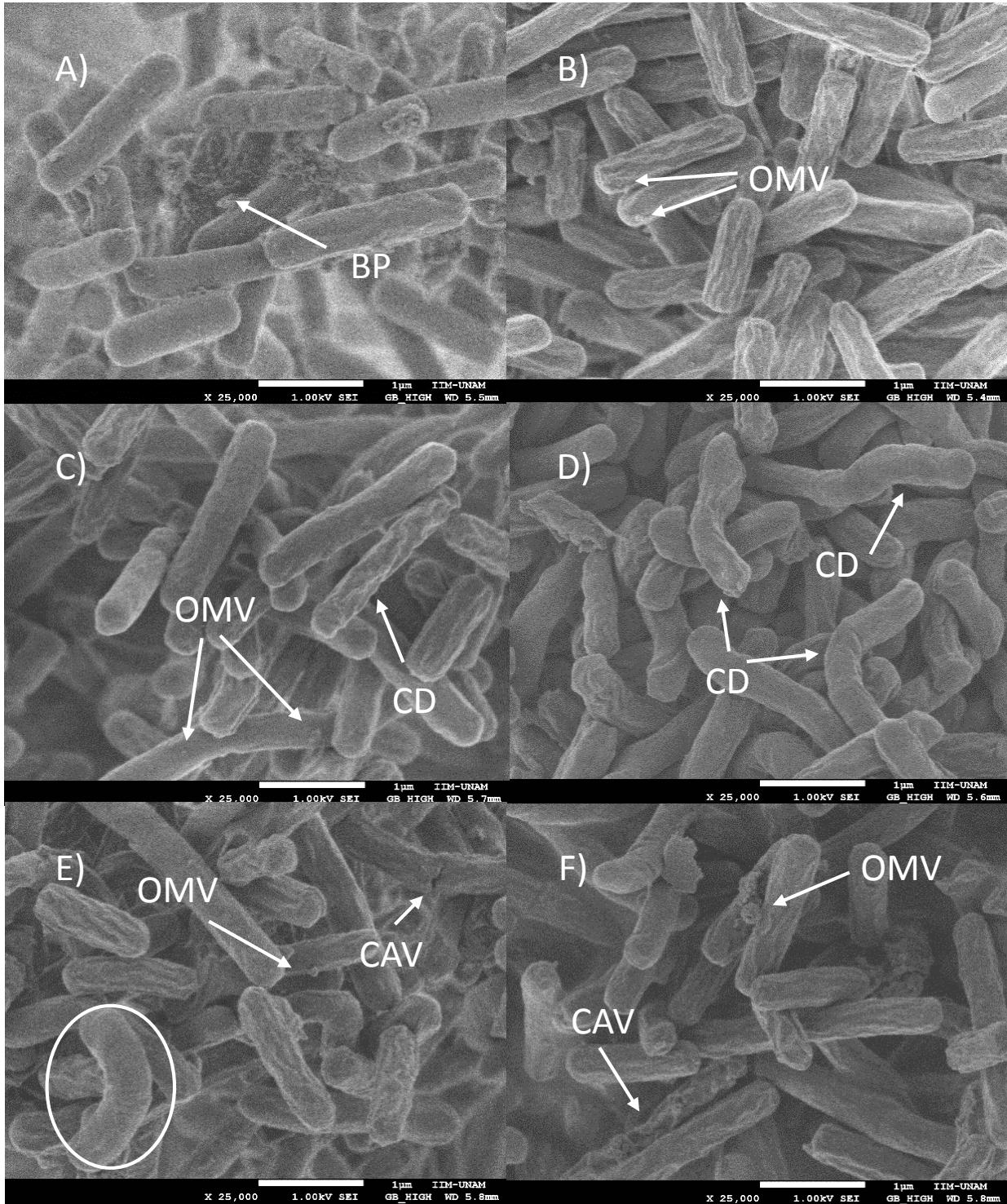
**Figura 13.** *V. cholerae* morfología rugosa APA 1%. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (BP=biopelícula, OMV=vesículas de la membrana externa, CAV=cavidades).

## 9. Resultados y discusión

Los efectos de la desinfección con ozono en la ultraestructura de *V. cholerae* en su variante rugosa cultivada en APA al 2% se muestran en la Figura 14. En comparación con *V. cholerae* rugosa en APA al 1% se logra observar que en las muestras sin tratamiento (Figura 14A) la cantidad de biopelícula es un poco menor al inicio en la bacteria cultivada en APA al 2%, y de igual manera estas forman agregados celulares. La aplicación del ozono en todos los CT muestran una disminución total de la cantidad de biopelícula. Desde el primer CT 0.5 (Figura 14B) se observa la aparición de OMV hasta el último CT 18 (Figura 14F). A partir del CT 1 se observan células deformadas (CD), en los últimos dos CT 7.5 y 18 (Figura 14E y 14F) se observan la generación de cavidades (CAV) en las células bacterianas.

De igual manera que lo expuesto anteriormente para la variante rugosa de *V. cholerae* en APA al 1%, la biopelícula es capaz de proteger a las células inmersas y recubiertas, sin embargo, estas presentan mayor daño pudiendo deberse a que se observa menor cantidad de biopelícula, por lo cual el consumo de ozono es menor, pudiendo actuar directamente en las células bacterianas.



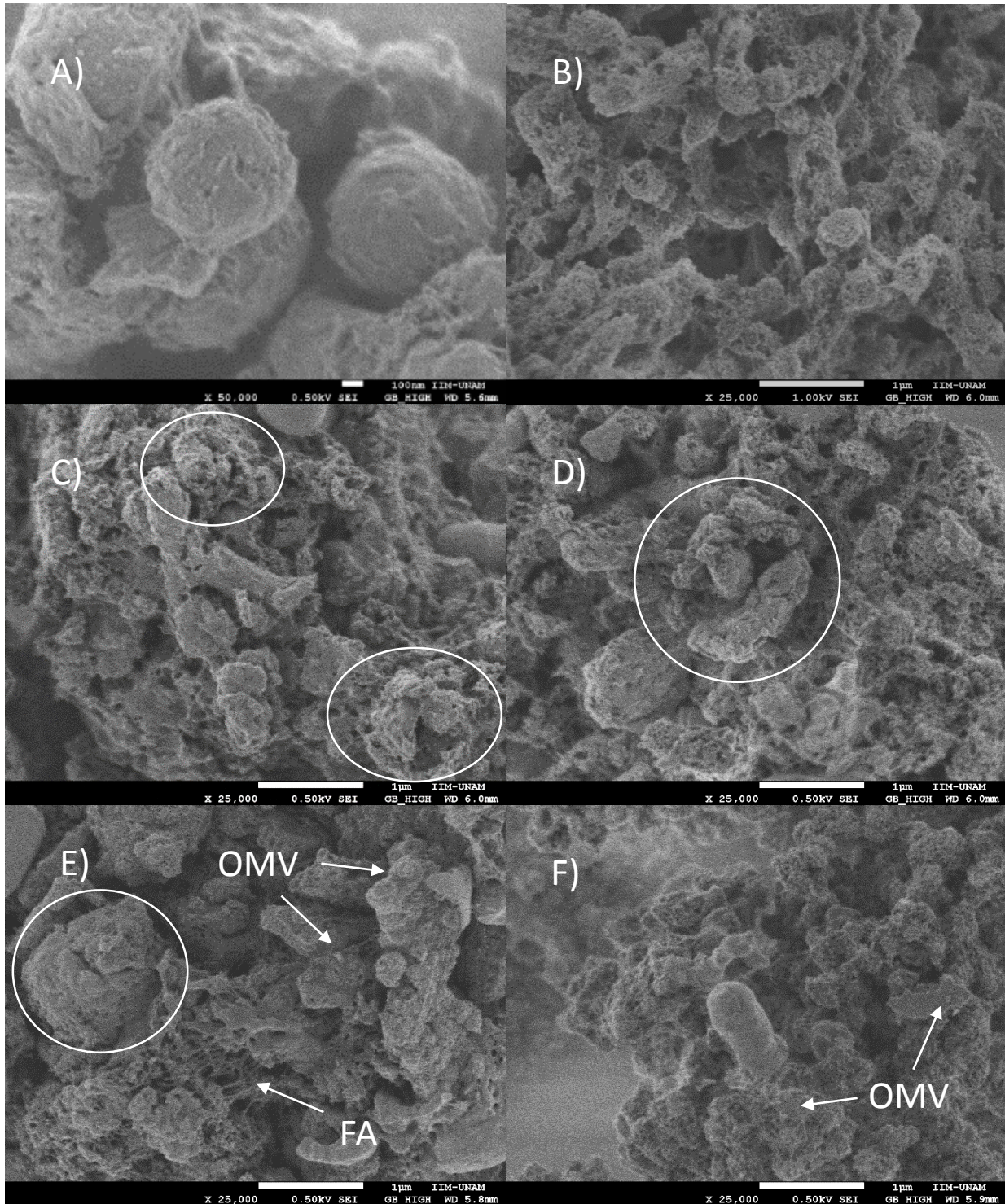


**Figura 14.** *V. cholerae* morfología rugosa APA 2%. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (BP=biopelícula, OMV=vesículas de la membrana externa, CD=célula deformada, CAV=cavidades).



## 9. Resultados y discusión

Los efectos de la desinfección ozono en la morfología cocoide de *V. cholerae* se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** *V. cholerae* morfología cocoide. Desinfección con ozono A) CT=0 B) CT=0.5 C) CT=1 D) CT=1.5 E) CT=7.5 F) CT=18 (OMV=vesículas de la membrana externa, FA=fibrilla de adhesión).

## 9. Resultados y discusión

En la Figura 15A se observa a las células en su morfología cocoide después de la inducción en ASW sin recibir tratamiento con ozono (CT=0). Las micrografías 15B a la 15F muestran los daños causados por el ozono a la bacteria en su morfología cocoide principalmente la lisis y destrucción total del material celular, presencia de restos celulares, vesículas de la membrana externa (OMV) y en algunos casos se observan las fibrillas de adhesión (FA). lo anterior se observa desde el CT 0.5 siendo este el valor más bajo que se utilizó para la desinfección hasta el CT 18.

Resultados similares han sido reportados por Thonamsub *et al.*, (2002) en células cocoides de *Staphylococcus aureus*, en donde al aplicar una concentración baja de ozono (0.167 mg/min/L) y conforme aumentaba el tiempo de exposición las bacterias presentaban deformidades y destrucción celular, seguida de una destrucción aún más severa y la presencia de únicamente escombros celulares. Orta *et al.*, (2017), reporta que células de *Helicobacter pylori* en su estado VBNC tratadas con ozono presentan derrame del material intracelular como resultado de daños visibles en la membrana como vesículas de la membrana externa, sugiriendo que el ozono causa lisis celular.

Las fibrillas de adhesión son el resultado de la respuesta al estrés oxidativo, siendo reportado por Orta *et al.*, (2017) para *H. pylori* VBNC expuesto a cloro y ozono, estas fibrillas de adhesión de igual manera son producidas por la bacteria para adherirse a una superficie y conectar células para lograr agrupaciones (Ishii, 2004).

## 10. Conclusiones

- La inducción de *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar a su variante rugosa se logró al cabo de 12 días, se comprobó que el cambio de morfología es el resultado de la incubación en un medio con poca cantidad de nutrientes.
- La inducción de *V. cholerae* bacilar a su morfología cocoide se concluyó después de 57 días de incubación, comprobando que la bacteria adopta esta morfología a condiciones adversas de nutrientes y temperatura como mecanismo de supervivencia.
- La dosis y tiempo de contacto ideal, utilizados en el proceso de desinfección con ozono para la inactivación de *V. cholerae* para sus tres morfologías en agua, es de 1 mg/L y 18 minutos respectivamente. Esta concentración inicial conserva un residual mayor a 0.4 mg/L de ozono posteriores a los 4 minutos contacto, cumpliendo con los parámetros establecidos por la norma europea EN-1278:2010.
- El proceso de desinfección con ozono en la morfología bacilar de *V. cholerae* aplicando una dosis de 18 mg/L durante 1 minuto, manifiesto deformación celular, formación de vesículas y cavidades en la membrana celular lo que conlleva a una lisis celular. Mediante la técnica de cuantificación por filtro de membrana se obtuvo una inactivación de 7.2 log (99.99%) de unidades bacterianas.
- Las dosis y tiempos de exposición con ozono no fueron suficientes para causar gran daño en la ultraestructura de *V. cholerae* variante rugosa en APA al 1 y 2% mostrando únicamente la destrucción de la biopelícula, formación de pequeñas vesículas, y en pocos casos deformación celular y presencia de cavidades, por lo que es recomendable aumentar las dosis de aplicación de

## 10. Conclusiones

ozono en agua contaminada. La disminución máxima de unidades bacterianas se obtuvo aplicando una dosis de ozono de 1 mg/L durante 18 min, la cual fue de 2.1 (99.21%) y 3.35 (99.95%) log respectivamente, siendo mucho menor que en la morfología bacilar, debido a la presencia de biopelícula, lo cual les confiere mayor resistencia a los efectos oxidativos del ozono.

- En la morfología cocoide se logró en todos los CT, una completa lisis y destrucción total del material celular, presencia de restos celulares, vesículas de la membrana externa y en algunos casos se observan las fibrillas de adhesión. Por lo que el ozono es eficaz para producir daños en la ultraestructura de esta morfología. Se estableció mediante datos del proyecto que al aplicar ozono a una concentración de 1 mg/L durante 18 minutos una disminución de 3.32 (99.95%) log de unidades bacteriana, demostrando tener una mayor supervivencia a la aplicación del ozono comparada con la morfología bacilar.



## 11. Bibliografía

### 11. Bibliografía

1. Alam, M., Sultana, M., Nair, G., Sack, D., Siddique, A., Ali, A., Hug, A. y Colwell, R. (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (4): 2849-2855.
2. Ali, A., Rashid, M. y Karaolis, D. (2002). High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Health Microbiology*. 68 (11): 5773-8.
3. Alyamani, A. and Lemine, O. (2012). FESEM Characterization of Some Nanomaterial. National Nanotechnology Research Centre, KACST, Riyadh. Saudi Arabia.
4. Asakura, H., Ishawa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. e Igimi, S. (2006). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*. 9 (4): 869-879
5. Baker R.M. Singleton F.L. Hood M.A. (1983). Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 930-940.
6. Bataller, L. (2002). Aplicación del ozono en el tratamiento de agua en embotelladoras de agua en Cuba. Centro de investigaciones del ozono, Habana Cuba. Asociación Internacional de ozono-Conferencia Regional México 2002.
7. Berk, V., Fong, J., Dempsey, G., Develioglu, O., Zhuang, X., Liphardt, J., Yildiz, F. y Chu, S. (2012). Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science*. 337 (6091): 236-239.
8. Besnard, V., Federighi, M., Declero, E. Jugiau, F. and Cappelier, J. (2002). Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research*. 33: 359-370.
9. Beyhan, S. y Yildiz, F. (2007). Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Molecular Microbiology*. 63 (4): 995-1007.
10. Cano, C. (2010). Evaluation of the effects of solar ultraviolet radiation on the growth of *Vibrio cholerae* and on the secretion of the cholera toxin. Tesis de maestría. Universidad de Sur África.

## 11. Bibliografía

11. Carrillo, G. (2015). Alerta de cólera en México, enero 2017, recuperado de: <http://www.cucs.udg.mx/principal/noticias/archivo-de-noticias/alerta-de-c-lera-en-m-xico> (11 de febrero de 2019).
12. Casasola, B., Orta, M., Luqueño, V. y Monje, I. (2013). Quantification of *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state by quantitative PCR in water disinfected with ozone. *Water Science and Technology*. 68 (11): 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 de doctorado. Instituto de Ingeniería UNAM. Ciudad de México.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (Sin fecha). Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras fecales. Recuperado de: [https://www.cdc.gov/cholera/pdf/es/Aislamiento-de-Vibrio-cholerae-a-partir-de-muestras-fecales\\_cap%C3%ADtulo-4.pdf](https://www.cdc.gov/cholera/pdf/es/Aislamiento-de-Vibrio-cholerae-a-partir-de-muestras-fecales_cap%C3%ADtulo-4.pdf) (08 de enero de 2019).
15. Centro de Apoyo Científico Tecnológico a la Investigación (CACTI). (2017). Determinación estructural y proteómica. Recuperado de: <http://cactiweb.webs.uvigo.es/Libro%20CACTI%20castellano.pdf> (15 de agosto de 2018).
16. Chaiyanan, S., Grim, C., Mangel, T., Huq, A. y Cowell, R. (2007). Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology*. 9 (2): 393-402.
17. Chulluncuy, N. (2011). Tratamiento de agua para consumo humano. *Ingeniería Industrial*. 39: 153-170.
18. Colwell, R., y Huq. A. (1994). Environmental reservoir of *Vibrio cholerae* the causative agent of cholera. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 740: 44-54.
19. Colwell, R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*. 274 (5295): 2025-2031.
20. Colwell RR. (2009). Viable but non-cultivable bacteria. In: Epstein SS, editor. *Uncultivated Microorganisms*. Berlin: Springer Verlag.

## 11. Bibliografía

21. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2007). Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento, desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento. Edición 2007. México.
22. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2016). Estadísticas del agua en México, edición 2016. México.
23. CONAVE. (2016). Situación epidemiológica de cólera. recuperado de: [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).
24. Cook, K. L., and Bolster, C. H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 573–583.
25. Dominguez, L., Badiola, J., Cepeda, A., Más, A., Rodríguez, E., Zurera, G. y Téllez, S. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista del Comité Científico*. 12: 37-50.
26. Environmental Protection Agency. (2011). Water Treatment Manual: Disinfection, Environmental Protection Agency, Johnstown Castle, Co. Wexford. p 187.
27. Faruque, S. Albert, M. and Mekalanos, J. (1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (4): 1301-1314.
28. Feng, L., Zhang, K., Gao, M., Shi, C., Ge, C. Qu, D., Zhu, J., Shi, Y, y Han, J. (2018). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 (8): 1233-1246.
29. Fernández, M., García, M., Contreras, M., Incani, R., Chirinos, H., Rojas, H. y Suárez, P. (2015). Supervivencia, inducción y resucitación de *Vibrio cholerae* del estado viable no cultivable en el sur del Mar Caribe. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 57 (1): 21-26.
30. Fernández, S. y Alonso, G. (2009). Cólera y *Vibrio cholerae*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 40 (2): 50-69.
31. Furkanur, M., Iqbal, J., Minhui, K., Ki-Hoon, L., Tae K. & Sang-Do H. (2016). Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation. *Biofouling*. 32 (4): 497-509.

## 11. Bibliografía

32. Gonzales-Escalona, N., Fey A., Höfle, M., Espejo, R. y Guzmán, C. (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*. 4 (8): 658-666.
33. Griffith, D., Kelly-Hope, L. y Miller, M. (2006). Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995-2005. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75 (5): 973–977.
34. Guimarães, J. y Nour, E. (2001). Tratando nossos esgotos: processos que imitam a natureza. Química Nova Escola-Cadernos Temáticos, Edición especial-Febrero. pp. 19-30.
35. Hood, M., Guckert, J., White, D. (1986). Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52: 788-793.
36. Huq, A., Small, E., West, P., Huq, M., Rahman, R. y Colwell, R. (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology*. 45 (1): 275-283.
37. Imamura, D., Mizuno, T., Miyoshi, S. y Shinoda, S. (2015). Stepwise changes in viable but nonculturable *Vibrio cholerae* cells. *Microbiology and Immunology*. 59: 305-310.
38. Instituto de Ciencias Materiales de Madrid (ICMM). (2017). Laboratorio de microscopia FESEM.
39. Ishii, A., Sato, T., Wachi, M., Nagai, K. y Kato, C. (2004). Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers *in vivo* and *in vitro*. *Microbiology*. 150: 1965-1972.
40. Islam, M., Drasar, B. y Bradley, D. (1990). Long-term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue-green alga, *Anabaena variabilis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 93 (2): 133-139.
41. Langlais, B., Reckhow, D. y Brink, D. (1991). Ozone in water treatment: application and engineering. Lewis publishers. Paris, Francia. p. 552.
42. Ledón T., Hernández D. D., Marrero K. y Fando R. (2014) *In vitro* modeling of the environmental performance of attenuated strains of *Vibrio cholerae* O139. *Biotecnología Aplicada*. 31 (2): 121-128.

## 11. Bibliografía

43. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. y Faucher, S. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*. 5: 1-20.
44. McBroom, A. y Kuehn, M. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*. 63 (2): 545-558.
45. Mishra, A., Taneja, N. y 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*. 112: 945-953.
46. Mizunoe, Y., Nyunt, S., Takade, A. and Yoshida, S. (1999) Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholera* O139 Strain MO10. *Infection and Immunity*. 67 (2): 958-963.
47. Nakahashi, M., Mawatari, K., Hirata, A., Maetani, M., Shimohata, T., Uebanso, T., Hamada, Y., Akutagawa, M., Kinouchi, Y. and Takahashi, A. (2014). Simultaneous Irradiation with Different Wavelengths of Ultraviolet Light has Synergistic Bactericidal Effect on *Vibrio parahaemolyticus*. *Photochemistry and Photobiology*, 90: 1397-1403.
48. Neira, M. y Padilla, J. (2016). Evaluación de la eficiencia del ozonificador en el tratamiento de agua utilizada para consumo humano en la fundación “María Amor” de la parroquia Sayausí. (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Cuenca. Ecuador.
49. Norma Oficial Mexicana 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. Diario Oficial de la Federación. 3 de febrero de 1995.
50. Organización Mundial de la Salud. (2004). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en Desarrollo.
51. Organización mundial de la salud. (2007). Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*.

## 11. Bibliografía

52. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017a). Cólera. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es/> (14 de diciembre de 2018).
53. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017b). Prevención y control de los brotes de cólera: política y recomendaciones de la OMS. Recuperado de: [www.who.int/topics/cholera/control/es/](http://www.who.int/topics/cholera/control/es/) (14 de diciembre de 2018).
54. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Agua. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>(14 de diciembre de 2018).
55. Orta, M., Díaz, V. y Aparicio G. (1996). Desinfección de agua potable contaminada con *Vibrio cholerae* adaptada al cloro. Instituto de ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
56. Orta, M., Rojas, N. y Ayala, A. (2008). Wastewater disinfection using ozone to remove free-living, highly pathogenic bacteria and amoebae. *Ozone: Science & Engineering*. 30: 367-375.
57. Orta, M., Yáñez, I., Casasola, B. y Román P. (2017). Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental Technology*. 38 (6): 744-753.
58. Páez, L. (2008). Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
59. Palma, R., Ortiz, J., Garnica, E., López, L., Peñaranda, S. y Raad, J. (1999). Análisis de agua para consumo humano. Instituto Nacional de Salud. Santa Fe de Bogotá, D.C.
60. Payne, G., Ledón T. y Fando R. (2017). Modelación in vitro del desempeño ambiental de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 48 (2): 01-11.
61. Percival, S., Yates, M., Williams, D., Chalmers, R. y Gray, N. (2014). Microbiology of waterborne diseases Microbiological Aspects and Risks. 2da edición. Editorial Elsevier. Gran Bretaña, pp. 237-248.

## 11. Bibliografía

62. Pinto, D., Santos, M. y Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 41 (1): 61-76.
63. Pruzzo, C., Tarsl, R., Del Mar, M., Signoretto, C., Zampini, M., Pane, L., Cowell, R. y Canepari, P. (2003). Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environmental Microbiology*. 5 (10): 850-858.
64. Rahman, M., Jubair, M., Alam, M., Weppelmann, T. y Azarian, T. (2014) High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae* strains isolated in Haití. *PLOS ONE*. 9 (11): 01-11.
65. Ramon, S., Rosas, J. y Vargas, W. (2016). Eficiencia desinfectante del peróxido de hidrógeno al 3 y 4 % en el lavado de lechuga romana (*Lactuca sativa* L). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (1): 146-150.
66. Roldan, A. (2014). Caracterización fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae* aislado de zooplancton de los canales de Xochimilco, D. F., en el año 2005. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estados de México.
67. Rosas, G. (2018). Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de elementos del Clúster Científico y Tecnológico BioMimic. Instituto de ecología. Recuperado de: <http://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/723-microscopia-electronica-de-barrido-y-microanalisis-de-elementos-del-cluster-cientifico-y-tecnologico-biomimic>. (20 de noviembre de 2018)
68. Salas, R. (2014). Estudio de Materiales Nanométricos con Microscopio Electrónico de Barrido SEM. (Protocolo de investigación). Centro de Investigación en Materiales Avanzados Departamento de Estudios de Posgrado. Chihuahua. México.
69. Secretaria de Salud (SSA). (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera. Ciudad de México, México.
70. Shikongo-Nambabi, M., Kachigunda, B. y Venter, S. (2010). Evaluation of oxidising disinfectants to control *Vibrio* biofilms in treated seawater used for fish processing. *Water SA*. 36 (3): 215-220.
71. Silva, A. and Benítez, J. (2016). *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10 (21): 01-25.



## 11. Bibliografía

72. Solsona, F. y Mendez, J. (2002). Desinfección del agua. Agencia Ambiental de los Estados Unidos de América.
73. Suzarte, E., Campos, J., Marrero, K. Silva, Y. Rodríguez, B., Martínez, E., Ledón, T., Moreno, A. y Fando, R. (2005). Construcción y caracterización de mutantes de *Vibrio cholerae* incapaces de formar biofilm. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 36 (1): 46-51.
74. Tachikawa, M., Yamanaka, K. y Nakamuro, K. (2009). Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone: Science & Engineering*. 31: 03-09.
75. Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R. y Srisukonth, C. (2002), Effect of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. 48: 193-199.
76. Thompson, F., Iida, T. and Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (3): 403-431.
77. Universidad Autónoma de Chihuahua (UAC). (2009). Ingeniería de Tratamiento y Acondicionamiento de Aguas Potables. Recuperado de: <http://www.oocities.org/edrochac/sanitaria/pagina1.html> (7 de septiembre de 2018).
78. Universidad Politécnica de Valencia (UPV). (2012). Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo. Recuperado de: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html> (7 de septiembre de 2018).
79. Wai, S., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S., Yoshida, S. (1998). *Vibrio cholerae* O1 strain tsi-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10): 3648-3655.
80. Wright, H. y Cairns, W. (1990). Desinfección de agua por medio de luz ultravioleta. Trojan Technologies Inc. Ontario. Canadá.
81. Wu, B., Laing, W. and Kan, B. (2016). Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in microbiology*. 7 (404): 01-09.



## 11. Bibliografía

82. Yildiz, F. y Schoolnik, G. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 4028-4033.
83. Zelada, A., Ledón, T. y Fando, R. (2015). El cólera: una enfermedad infecciosa reemergente. El candidato vacunal cv 638, una herramienta para su prevención. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 46 (2): 131-143.
84. Zhang, Y., Wu, Q., Zhang, J. and Yang, X. (2011). Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 1006-1015.
85. Zhang, S., Chengsog, Y. Lin H., Lv, L and Yu, X. (2015). UV Disinfection induces an environmental state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*. 49: 1721-1728.