



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Instituto de Ingeniería

Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar, rugosa y cocoide mediante FESEM

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ANELLY JACQUELINE LUNA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ISaura YÁÑEZ NOGUEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. GERMAN CALVA VÁSQUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



**FES
ZARAGOZA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 su apoyo y recursos otorgados por 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 mi formación académica como Bióloga.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM (II UNAM) y asimismo al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) y todo su personal por las facilidades brindadas en la experimentación.

A la M. en C. Isaura Yáñez Noguez por su apoyo y orientación a lo largo del trabajo experimental y del escrito de la presente tesis.

Al M. en C. German Calva Vásquez por su apoyo, consejos y paciencia durante el desarrollo y escrito del trabajo.

A la Dra. Maria Teresa Orta Ledesma por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, asimismo por el apoyo recibido durante el desarrollo de la investigación.

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

Al Dr. Omar Novelo Peralta del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME) del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) por el apoyo brindado para la obtención de las micrografías.

A mis sinodales la M. en C. Rocio Espitia Licea, al Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro y a la Dra. Claudia Janette de la Rosa Mera por su tiempo, comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la M. en IA Karina Atengueño Reyes por todas sus atenciones, por su paciencia y por su amistad a lo largo de la realización de la tesis.

DEDICATORIAS

A Dios porque siempre me ha cuidado y ayudado en todo momento. Porque todas las cosas proceden de él y existen por él y para él. ¡A él sea la gloria por siempre! Amén. Romanos 11:36 NVI.

A mis padres, Ana María Hernández Martínez e Ignacio Luna Galicia, gracias por todo el esfuerzo, sacrificio y amor que me han dado, sin ustedes nada de esto sería posible. Los amo y me siento muy orgullosa de ser su hija.

A mi hermana Selene Luna Hernández, que aunque nunca se lo diga, eres una gran amiga, gracias por los buenos y malos momentos que hemos pasado. Serás la mejor comunicóloga del mundo.

A David, Azulón, Marco y Luisito por ser grandes amigos, gracias por las aventuras que hemos vivido, por apoyarme y estar ahí cuando más los necesitaba.

A Angeles, Gaby y Jovana por ser unas muy buenas amigas, que me supieron escuchar, darme consejos y divertirnos.

A mis compañeros del Instituto de Ingeniería Axa, Lidia, Andrea, Isaac y Enrique por hacer mi estancia más agradable y divertida.

A Karina, por su gran amistad dentro y fuera del instituto y por toda la ayuda y paciencia que me brindaste para realizar esta tesis.

A mis amigos de Tiempo Con Dios Lorena, Ebene, Lohami, Ahiezer, Zuri, Dara, Ricardo y Fer por ser excelentes amigos, gracias por las carcajadas. Dios los bendiga.

A mis compañeras de prepa 7, Luz, Ashly y Angelica, por los gratos momentos que pasamos en la prepa, espero que nuestra amistad siga.

A Brenda, por ser una gran amiga y confidente, sabes que te quiero mucho y cuentas conmigo siempre.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico.....	3
Epidemiología.....	4
Mecanismos de transmisión	5
Características de <i>Vibrio cholerae</i>	6
Morfología rugosa de <i>V. cholerae</i>	6
Morfología cocoide, estado Viable No Cultivable.....	8
Importancia de la desinfección.....	9
Métodos físicos.....	10
Métodos químicos.....	11
Desinfección con cloro (Cl ₂)	12
Química de la cloración	14
Demanda de cloro, cloro combinado y punto de quiebre.....	16
Eficacia de la desinfección	18
Observación de bacterias mediante microscopia electrónica	18
Principios generales de la microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, por sus siglas en inglés, SEM)	19
La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	20
Cuantificación de bacterias para desinfección.....	21
Antecedentes	23
Morfología bacilar	23
Morfología rugosa	24
Cocoide, estado Viable No Cultivable	25
Justificación e hipótesis.....	27
Justificación.....	27
Hipótesis	27
Objetivos.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos Particulares	28
Metodología.....	29
Preparación del inóculo <i>V. cholerae</i>	29

Inducción a forma cocoide de <i>V. cholerae</i>	29
Inducción al fenotipo rugoso	30
Preparación de la suspensión de <i>V. cholerae</i> bacilar para la desinfección.....	30
Preparación de la suspensión de <i>V. cholerae</i> en fenotipo rugoso para la desinfección	30
Preparación de la suspensión de <i>V. cholerae</i> para forma cocoide para la desinfección.....	31
Desinfección para morfología bacilar, rugosa y cocoide de <i>V. cholerae</i>	31
Preparación de muestras para observación en FESEM	32
Cuantificación de bacterias mediante filtro de membrana.....	33
Resultados y discusión	35
Inducción de <i>V. cholerae</i> de morfología bacilar a rugosa.	35
Inducción de <i>V. cholerae</i> de morfología bacilar a cocoide.....	38
Seguimiento del cambio de morfología bacilar a cocoide en microscopia óptica	38
Efecto del cloro en las diferentes morfologías de la bacteria <i>V. cholerae</i>	39
<i>V. cholerae</i> morfología bacilar	40
Demanda de cloro morfología bacilar.....	40
Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología bacilar.....	42
Inactivación de la bacteria <i>V. cholerae</i> en morfología bacilar	44
<i>V. cholerae</i> morfología rugosa, cultivada en APA 1%	45
Demanda de cloro morfología rugosa (APA 1%).....	45
Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología rugosa cultivada en APA 1%	46
Inactivación de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología rugosa, cultivada en APA 1%	49
<i>V. cholerae</i> morfología rugosa, cultivada en APA 2%	49
Demanda de cloro morfología rugosa cultivada en APA 2%	49
Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología rugosa cultivada en APA 2%	51
Inactivación de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología rugosa, cultivada en APA 2%	53
<i>V. cholerae</i> en morfología cocoide.	54
Demanda de cloro morfología cocoide	54
Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología cocoide.....	55
Inactivación de la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología cocoide.....	58
Conclusiones	60
Referencias bibliográficas	62

Índice de Figuras

<i>Figura 1</i> Cantidades relativas de HOCl y OCl ⁻ para los valores de pH	16
<i>Figura 2</i> Cantidad de cloro residual en función de la cantidad de cloro introducido	18
<i>Figura 3</i> Principales componentes del microscopio electrónico de barrido obtenido en I.....	20
<i>Figura 4</i> Filtro de membrana.....	34
<i>Figura 5</i> Diferenciación de morfología de <i>V. cholerae</i> bacilar y rugosa.....	36
<i>Figura 6</i> Cambio de morfología de <i>V. cholerae</i> de bacilar a cocoide en el día 17 de inducción (microscopía óptica 100x, tinción Gram).....	39
<i>Figura 7</i> Demanda de cloro de <i>V. cholerae</i> con morfología bacilar.....	41
<i>Figura 8</i> Daño en la ultraestructural en <i>V. cholerae</i> , morfología bacilar con cloro.	42
<i>Figura 9</i> Consumo de cloro de <i>V. cholerae</i> en morfología rugosa, cultivada en APA 1%.....	45
<i>Figura 10.</i> Daño con cloro en la ultraestructura en la bacteria <i>V. cholerae</i> en morfología rugosa, cultivada en APA 1%,	48
<i>Figura 11</i> Consumo de cloro de <i>V. cholerae</i> con morfología rugosa, cultivada en APA 2%	50
<i>Figura 12</i> Daño por el cloro en la ultraestructura en la bacteria <i>V. cholerae</i> morfología rugosa, cultivada en APA 2%	52
<i>Figura 13</i> Consumo de cloro de <i>V. cholerae</i> con morfología cocoide	55
<i>Figura 14</i> Daño por el cloro en la ultraestructura en <i>V. cholerae</i> morfología cocoide.....	iError! Marcador no definido.

Índice de Tablas

<i>Tabla 1</i> Métodos de desinfección de agua	10
<i>Tabla 2</i> Condiciones para la desinfección con cloro <i>V. cholerae</i>	31
<i>Tabla 3</i> Porcentaje de inactivación de <i>Vibrio cholerae</i> en morfología bacilar	44
<i>Tabla 4</i> Demanda de cloro de <i>V. cholerae</i> con morfología rugosa, cultivada en APA 1%.....	41
<i>Tabla 5</i> Porcentaje de inactivación de <i>Vibrio cholerae</i> en morfología rugosa, cultivada en APA 1%	49
<i>Tabla 6</i> Demanda de cloro de <i>V. cholerae</i> con morfología rugosa, cultivada en APA 1%.....	46
<i>Tabla 7</i> Porcentaje de inactivación de <i>V. cholerae</i> en morfología rugosa, cultivada en APA 2%	53
<i>Tabla 8</i> Demanda de cloro de <i>V. cholerae</i> en morfología rugosa APA 2%	51

Resumen

La bacteria *Vibrio cholerae* es el agente causal de importantes pandemias de cólera a nivel mundial. La supervivencia de la bacteria en el ambiente acuático se debe al desarrollo de mecanismos de resistencia que conllevan cambios morfológicos a nivel celular y colonial conocidos como cocoide y rugoso respectivamente. La morfología cocoide cambia de ser un bacilo a un coco y adquiere un estado Viable No Cultivable (pierde capacidad de cultivo). La variante rugosa conserva su capacidad cultivo, pero produce una gran cantidad de exopolisacáridos mostrando un aspecto rugoso en su morfología colonial. Siendo el agua una de las principales vías de transmisión de la bacteria, la presente tesis estuvo encaminada a evaluar mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (Field Emission Scanning Electron Microscopy, por sus siglas en inglés FESEM), el efecto que tiene el cloro (desinfectante común para agua de consumo) en las morfologías resistentes a nivel celular, así como definir los porcentajes de inactivación. El efecto del cloro fue visualizado en las micrografías electrónicas FESEM, se observó que la variante rugosa es más resistente a la desinfección con cloro que la cocoide, los daños observados a nivel celular fueron: deformación, vesículas de membrana externa (lo que representa fuga de material celular debido al daño), fibrillas de adhesión (producto de la excreción de exopolisacáridos). Para la morfología cocoide las micrografías electrónicas evidenciaron lisis celular, vesículas de membrana externa, fibrillas de adhesión y cavidades mostrando mayor daño en su ultraestructura. Respecto al porcentaje de inactivación se comprobó que el cloro a un CT (concentración en mg L^{-1} • tiempo de contacto en min) de 10 mg min L^{-1} logra inactivar el 99.999% (5 unidades logarítmicas) de bacterias en su morfología común (bacilar). Mientras que un CT de 15 mg min L^{-1} fue necesario para inactivar 99.999% de bacterias en su morfología rugosa lo que corresponde a 4.4 log. Para la morfología cocoide y con datos obtenidos dentro del proyecto se estableció una inactivación de 3.6 log correspondiente al 99.97%. El mecanismo de acción del cloro es afectar la integridad de la membrana, obstruye su permeabilidad y altera funciones celulares (daña enzimas y ácidos nucleicos). Se demostró que el cloro es un desinfectante eficaz para inactivar a la bacteria *V. cholerae* en su morfología normal. Sin embargo, aunque se consiguió la inactivación de las morfologías cocoide y rugosa, éstas mostraron mayor resistencia al desinfectante lo que podría derivar en un potencial resurgimiento de la bacteria en el ambiente acuático.

Introducción

Proveer de agua limpia y segura a la población es uno de los principales temas a atender para los gobiernos nacionales e internacionales, ya que permite la prevención y el control de las enfermedades diarreicas agudas (EDA). Entre las EDA, la enfermedad del cólera causado por la bacteria *Vibrio cholerae*, es una de las principales causas de pandemias a nivel mundial, ya que puede ocasionar la muerte en cuestión de horas (OMS, 2017).

Esta bacteria puede desarrollar dos mecanismos de sobrevivencia en el ambiente que son morfología cocoide en el cual adquiere un estado Viable No Cultivable (VNC), y la morfología rugosa con estado Viable Cultivable (VC). Por lo tanto, es necesario tener estrategias de saneamiento de agua, permitiendo establecer las condiciones necesarias de desinfección que permita la inactivación de bacterias resistentes, tales como *V. cholerae* (Orta *et al.*, 2018c).

Como respuesta al agotamiento de nutrientes, las bacterias heterotróficas pueden sufrir considerables cambios morfológicos, fisiológicos y químicos. De hecho, para sobrevivir a condiciones de privación de energía y nutrientes, se sabe que las bacterias como lo es *V. cholerae* O1 puede cambiar a una morfología colonial rugosa como adaptación al estrés ambiental (Mizunoe, 1990). Diversos Autores han realizado estudios que evalúan la desinfección de *V. cholerae* en estado VC, pero hay pocos estudios sobre desinfección de *V. cholerae* en sus morfologías resistentes rugosa y cocoide utilizando cloro. Es por ello que este trabajo evalúa el efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *V. cholerae* en sus tres morfologías bacilar, rugosa y cocoide mediante microscopía FESEM, así como la inactivación de la bacteria.

Marco teórico

La inadecuada calidad del agua para consumo sigue siendo una de las principales causas de enfermedades y muertes en los países en desarrollo como México. Las causas son diversas desde el incremento en la demanda de agua, el aumento de la resistencia de los agentes patógenos a la desinfección, el aumento de la densidad de población y el crecimiento de la actividad económica que resulta en la descarga de residuos agrícolas, industriales y humanos en el agua, así como la creciente incidencia de desastres naturales como: inundaciones, tormentas tropicales y tsunamis, los cuales tienen una enorme repercusión en los sistemas de abastecimiento de agua. Aunado a esto, se encuentra la creciente incidencia de nuevos patógenos emergentes asociados al agua, los cuales no sólo tienen la capacidad de crear nuevos brotes epidémicos si no que han adquirido resistencia a diversos desinfectantes y antibióticos; por lo que el agua limpia y segura es un recurso cada vez más escaso (Orta *et al.*, 2017).

En México las enfermedades gastrointestinales representaron la segunda causa de morbilidad, con más de 5 millones de casos en 2011, lo que la ubicó como un serio problema de salud pública cuya tendencia no parece mostrar cambios significativos en su comportamiento. Se ha relacionado de manera directa la falta de servicios de saneamiento con los casos nuevos de diarreas agudas (Orta *et al.*, 2017b). Uno de los patógenos transmitidos por el agua más importantes y el agente causal de cólera es la bacteria *Vibrio cholerae*.

Las especies del género *Vibrio* varían considerablemente en patogenicidad y aún están indefinidas las causas de su aparición y epidemiología. Esto es relevante debido a que ocasionan numerosos episodios patológicos, casos de mortalidad y grandes pérdidas económicas y alteraciones sociales en la población dedicada a industrias extractivas y procesadoras de productos del mar (Muñoz, 2012).

Son ubicuos en la naturaleza en ambientes acuáticos naturales, capaces de mantenerse virulentos sin multiplicarse en el agua dulce y en el agua de mar durante largo tiempo. Son más frecuentes en aguas templadas y pueden aislarse en

mariscos y pescados, donde pueden alcanzar concentraciones elevadas (García-Lázaro *et al.*, 2010). El género *Vibrio* contiene más de 60 especies que ocupan una amplia gama de hábitats acuáticos, 12 son patógenas para el hombre (West, 1989 y García-Lázaro *et al.*, 2010). De todas las especies de este género, la especie *Vibrio cholerae* es la de mayor interés médico, al ser las cepas toxigénicas O1 y O139 las responsables del cólera epidémico (Franco-Monsreal, 2014).

Epidemiología

La transmisión del cólera está estrechamente ligada a un acceso insuficiente a agua salubre e instalaciones de saneamiento. De manera característica, las zonas de riesgo son las barriadas periurbanas, donde no hay infraestructura básica, así como los campos para personas desplazadas o refugiadas, donde no se cumplen los requisitos mínimos. Las consecuencias de las crisis humanitarias pueden aumentar el riesgo de transmisión del cólera si el bacilo ya está presente o es introducido (OMS, 2018). La dosis mínima de inóculo para la infección de *V. cholerae* O1 es del orden de 1×10^6 células bacterianas. En comparación con otros patógenos como *Shigella* (dosis infectante de 1-10 células bacterianas), el inóculo que se requiere para infectar a un huésped humano es extremadamente alto (Secretaría de Salud, 2012).

En México, el cólera ha estado presente en el país desde la epidemia de los años 90, se han registrado casos aislados en los años 2010, 2011 y 2012, siendo el mismo tipo de bacteria que ha circulado desde la década de los noventa la que continúa presente. En 2013, se originaron brotes y casos en el Ciudad de México, Hidalgo, Veracruz y San Luis Potosí, aunque actualmente, el cólera en el país se mantiene bajo control epidemiológico, es importante controlar la transmisión de la enfermedad con tecnología eficiente de desinfección (Secretaría de Salud, 2016).

Desde el 9 de septiembre y hasta el 18 de octubre del 2013, el Centro Nacional de Enlace para el Reglamento Sanitario Internacional de México ha notificado un total de 171 casos confirmados de infección por *Vibrio cholerae* O1 Ogawa toxigénico, incluido un fallecimiento. Desde la Actualización Epidemiológica del 12 de octubre

del 2013, se registraron 12 casos nuevos, todos ellos en el estado de Hidalgo (OMS, 2018). Durante el 2015 y el 2016, se confirmaron los dos últimos casos de cólera en el país, cuya cepa coincidió con la circulante en los años 90´ (Secretaría de Salud, 2016).

Entre los síntomas de cólera se encuentran diarrea, calambres abdominales y síntomas de fiebre asociados con vómito y náusea que ocurren el 25% de los individuos infectados. Asimismo, un porcentaje similar presenta sangre y moco en las heces fecales. La diarrea puede ser severa en algunos casos durando de 6 a 7 días y presentándose, generalmente, dentro de las 48 horas siguientes a la ingesta del microorganismo. La enfermedad se produce cuando el microorganismo se adhiere al intestino delgado del individuo y es probable que después lo invada. El cólera es una enfermedad generada por la falta de higiene que resulta en la contaminación de las fuentes de agua (Franco-Monsreal *et al.*, 2014).

Mecanismos de transmisión

El cólera se transmite por contaminación del agua con heces y vomito de pacientes y portadores y por la ingestión de alimentos contaminados, por ejemplo, el pescado y mariscos crudos o insuficientemente cocinados, las frutas, verduras crudas y otros productos contaminados durante la preparación o el almacenamiento. La enfermedad, por consiguiente, puede propagarse con rapidez en las zonas donde no se tratan adecuadamente las aguas residuales y las fuentes de agua potable (OMS, 2018).

El cólera sigue representando una amenaza mundial para la salud pública y es un indicador clave de la falta de desarrollo social. Asimismo, existen factores de riesgo asociados, tales como: hacinamiento, desnutrición, bajo nivel socioeconómico, saneamiento precario y falta de higiene (González *et al.*, 2011). Los varones suelen constituir los primeros casos ya que están más expuestos a los diversos factores de riesgo (consumo de agua de río, consumo de alimentos callejeros). Las mujeres enferman en segundo lugar y al ser manejadoras de alimentos se constituyen en fuentes de infección para el resto de los miembros de la familia. Los niños

alimentados al seno materno son más resistentes a enfermarse y a sufrir cuadros diarreicos graves (Secretaría de Salud, 2012).

Características de *Vibrio cholerae*

V. cholerae es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo que mide de 1.5 a 2.5 μm de largo y 0.5 a 0.8 μm de ancho; en cultivos jóvenes (<18 h) se observa en forma de coma y a veces, en forma de S, es catalasa y oxidasa positivo (The Center Food Security and Public Health, 2011).

V. cholerae se clasifica en serogrupos en función del antígeno O del lipopolisacárido. Hay cerca de 200 serogrupos, pero solamente dos de ellos (O1 y O139) se reconocen como los responsables del cólera. A su vez el serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos, clásico y El Tor, y en cada uno se distinguen tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima (Farfán, 2002). En esta tesis se trabajó con *V. cholerae* O1 Ogawa el Tor por ser de importancia epidemiológica.

Si bien existen diferentes escenarios adversos el cual *V. cholerae* puede presentarse, la bacteria desarrolla estrategias de supervivencia, es importante tomar en cuenta que los cambios morfológicos y fisiológicos de estos microorganismos juegan un papel fundamental. Estas respuestas pueden implicar cambios adaptativos, como es la formación de biopelículas, así como al cambio a un estado Viable No Cultivable (VNC) (Casasola, 2018).

Morfología rugosa de *V. cholerae*

Se ha propuesto que los miembros de la familia Vibrionaceae, al cual pertenece *V. cholerae*, en condiciones de nutrientes limitados, pueden sufrir una serie de cambios morfológicos y fisiológicos para hacer frente a las condiciones de inanición (Wai, 1998 y Payne *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que la morfología rugosa de *V. cholerae* O1 El Tor, proporciona protección contra una serie de tensiones ambientales, incluida la limitación de nutrientes, la depredación por eucariotas unicelulares (protozoos) y el ataque por virus bacterianos (bacteriófagos). Esta morfología está asociada con la producción

de un exopolisacárido, que promueven la formación de biopelículas y que es el responsable de la resistencia. En respuesta al estrés ambiental. *V. cholerae* tiene la capacidad de cambiar su morfología de colonia traslúcida a una colonia rugosa debido a la producción de exopolisacaridos (Suzarte *et al.*, 2005 y Teschler *et al.*, 2015).

Una biopelícula es un consorcio funcional de microorganismos organizados dentro de una extensa matriz de exopolímeros compuesta principalmente por polisacáridos hidratados. La producción de biopelícula puede mejorar la supervivencia de las células en entornos dinámicos al permitir la formación de colonias que contienen miles de células, estas son comunidades sésiles derivadas de bacterias que están unidas a un substrato, una interfaz o entre sí; están integrados en una matriz autoproducida; y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y el perfil de transcripción (Silva y Benítez, 2016).

La formación de biopelículas comienza cuando una bacteria alcanza y se adhiere a una superficie. Después de la unión inicial, la formación posterior de microcolonias y estructuras tridimensionales (3-D) está mediada por el movimiento y el crecimiento de bacterias unidas. En muchas bacterias, la motilidad mediada por flagelos promueve las etapas iniciales de formación de biopelículas, generalmente al aumentar el movimiento a lo largo de la superficie (Yildiz y Visick, 2009). Las biopelículas son producidas por una amplia variedad de microorganismos ambientales *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Thermococcus* y *Methanosarcina* (Mizunoe *et al.*, 1999).

Las biopelículas de *V. cholerae* contienen dosis más altas de bacterias y células hiperinfectiosas y, por lo tanto, tienen un papel clave en la transmisión. El estado hiperinfectivo se refiere a una disminución en el número de células necesarias para causar la enfermedad. Las biopelículas están compuestas por agregados de células recubiertas por una matriz extracelular autoproducida o adquirida y, por lo tanto, pueden tener una mayor resistencia a las defensas del huésped (Teschler *et al.*, 2015).

El fenotipo rugoso le confiere a *V. cholerae* una alta resistencia a agentes como el cloro, el peróxido de hidrógeno, la actividad bactericida del suero mediada por el complemento y otras condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Payne *et al.*, 2017). Esta morfología adquiere importancia en los sistemas de distribución ya que se ha probado la permanencia de la bacteria en la biopelícula en diferentes tipos de tuberías en un sistema modelo en agua potable clorada (Teschler *et al.*, 2015).

Por otra parte, la bacteria puede adquirir en estado viable pero no cultivable (VNC), que así, como morfología rugosa, este estado sirve como estrategia de supervivencia por estrés ambiental como puede ser escases de nutrientes.

Morfología cocoide, estado Viable No Cultivable

V. cholerae entra en un estado de Viable No Cultivable (VNC) como una estrategia de supervivencia cuando las condiciones ambientales no son adecuadas para mantener su crecimiento normal, estas condiciones ambientales pueden ser concentraciones bajas de nutrientes, temperaturas subóptimas y descendientes, salinidad elevada, pH extremo o radiación solar (Fernández-Delgado *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las células VNC reducen su tamaño (por ejemplo, las células de *Vibrio vulnificus* tienen una longitud de aproximadamente 2 μm en la fase logarítmica, pero 0.6 μm de diámetro en el estado VNC) y cambiando a morfología cocoide y mantienen ciertas funciones como la actividad metabólica, la expresión de genes específicos, la resistencia a antibióticos y desinfectantes y su potencial patogenicidad por un tiempo prolongado. Además, en estado VNC, ocurren una importante serie de cambios metabólicos, incluidas las reducciones en el transporte de nutrientes, la tasa de respiración, y la síntesis macromolecular, tienen una mayor resistencia al choque en frío, choque térmico y estrés mecánico, contribuyendo a la supervivencia y persistencia en el medio ambiente (Oliver, 2005; Krebs y Taylor 2011; Fernández-Delgado *et al.*, 2015).

A pesar de su incapacidad de cultivo en medios normalmente permisivos, las células VNC no se consideran 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 VNC tienen una membrana intacta que contiene información genética íntegra. Los plásmidos, si los hay, también se retienen en células VNC. Mientras que las células muertas son metabólicamente inactivas, las células VNC son metabólicamente activas y llevan a cabo la respiración. Se encontró un alto nivel de ATP en *Listeria monocytogenes* incluso un año después de ingresar al estado VNC. Además, las células muertas no expresan genes, mientras que las células VNC continúan la transcripción y, por lo tanto, la producción de ARNm. A diferencia de las células muertas que ya no utilizan nutrientes, se demostró que las células VNC tienen una captación continuada y la incorporación de aminoácidos en las proteínas (Li *et al.*, 2014).

Para prevenir la transmisión de patógenos y preservar la calidad microbiológica de los sistemas de agua, se deben llevar a cabo procesos efectivos de desinfección antes de entregar el agua al consumidor. La desinfección mediante cloración es el método más común de inactivación de patógenos en el agua potable (Orta *et al.*, 2018a).

Importancia de la desinfección

El proceso de desinfección del agua es el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la inactivación de microorganismos patógenos presentes en el medio, como *V. cholerae*, minimizando la posibilidad de transmisión de enfermedades. En un proceso de desinfección tradicionalmente se utilizan compuestos químicos oxidantes, como lo es el cloro, relativamente estables, los cuales se denominan desinfectantes (Herrera y García, 2006).

Las características que deben tener los métodos de desinfección (Tabla 1) para ser aplicables son las siguientes:

- Rápido y efectivo
- Fácilmente soluble en agua en las concentraciones requeridas y capaz de proveer una acción residual
- Que no afecte el sabor, olor o color del agua (Organización Panamericana de la Salud, 2007)

Tabla 1. Métodos de desinfección de agua (Organización Panamericana de la Salud, 2007)

MÉTODOS FÍSICOS	COMENTARIO
Radiación ultravioleta	Desinfección UV con lámparas de mercurio de baja presión
MÉTODOS QUÍMICOS	EJEMPLOS
Peróxido de hidrogeno	Peróxido de hidrógeno
Ácidos y bases	Cal, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico
Ozono	Gas ozono generado <i>in situ</i>
Cloro y sus derivados	Compuestos de cloro, cloro gaseoso, dióxido de cloro, dióxido de cloro

Métodos físicos.

Luz Ultravioleta (UV)

El sistema de desinfección con luz ultravioleta (UV) transfiere energía electromagnética desde una lámpara de vapor de mercurio al material genético del organismo (ADN o ARN). Cuando la radiación UV penetra en las paredes de la célula de un organismo, esta destruye la habilidad de reproducción de la célula. La radiación UV, generada por una descarga eléctrica a través de vapor de mercurio, penetra al material genético de los microorganismos y retarda su habilidad de reproducción (EPA, 1999).

La eficacia del sistema de desinfección con luz ultravioleta depende de las características del agua, la intensidad y tiempo de exposición de la radiación a los microorganismos y la configuración del reactor. Para cualquier planta de tratamiento, el éxito de las actividades de desinfección está directamente relacionado con la concentración de componentes coloidales y de partículas en el agua residual (EPA, 1999).

La longitud de onda óptima para desactivar eficazmente los microorganismos se encuentra en el rango de 250 a 270 nm. La intensidad de la radiación emitida por la lámpara se disipa a medida que la distancia de la lámpara aumenta. Las lámparas de baja presión emiten luz monocromática a una longitud de onda de 253.7 nm. Las longitudes estándar de las lámparas de baja presión son de 0.75 y 1.5 metros, y sus diámetros van de 1.5 a 2.0 cm. La temperatura ideal de la pared de la lámpara se encuentra entre 95 y 122 °F (EPA, 1999).

Métodos químicos

Peróxido de hidrogeno

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conocido también como agua oxigenada, es un líquido incoloro a temperatura ambiente con sabor amargo. Pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno gaseoso se encuentran de forma natural en el aire. Es inestable y se descompone rápidamente a oxígeno y agua con liberación de calor lo cual no genera daño en el medio ambiente. Se usa fundamentalmente en presentaciones líquidas para desinfección de alto nivel (DAN) y en formas gaseosas para la desinfección de superficies de los centros sanitarios (Diomedi *et al.*, 2017).

A las concentraciones utilizadas como antiséptico posee una débil acción antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Su acción bactericida se debe a dos motivos: producción de iones hidroxilo y radicales libres, que actúan oxidando componentes esenciales del microorganismo (lípidos, proteínas y ADN) y a la liberación de O_2 por las catalasas tisulares, que actúa impidiendo la germinación de esporas de anaerobios. Además, el O_2 liberado en su descomposición en forma de burbujas favorece la eliminación de detritus celulares, bacterias y tejidos desvitalizados, pero pudiendo también afectar o dañar tejidos sanos. En el interior de la bacteria, por acción de la mieloperoxidasa sobre los cloruros y sobre el peróxido de hidrógeno, se forma hipoclorito (presenta poder oxidante y germicida) (Diomedi *et al.*, 2017).

Ácidos y bases

Los efectos tóxicos de los ácidos y bases inorgánicos llegan a ser notables para pH inferior a 3 y superior a 11. Estos efectos son más bien debido a la concentración de iones hidrogeno o hidróxido que al tipo de ácido y base mineral. Un incremento de la basicidad o de la acidez, generalmente coincide con un incremento de la fuerza iónica y la presión osmótica, lo cual puede ocasionar efectos destructivos en las células bacterianas (Weber, 2003).

Ozono (O_3)

La capacidad oxidante del ozono en una forma alotrópica de oxígeno, se sabe que es eficaz en la inactivación de microorganismos patógenos. Se ha informado que el uso de bajas concentraciones de ozono por períodos cortos de tiempo desinfectará el agua que contiene varias bacterias. Debido a su alto poder oxidante, el ozono, puede utilizarse para eliminar diversos microcontaminantes orgánicos e inorgánicos del agua, aunque la primera aplicación y la más extendida ha sido la desinfección en el tratamiento del agua potable. El espectro de acción del ozono se ha extendido mucho, abarcando otros tipos de aguas, como aguas residuales, aguas industriales (de proceso, de limpieza, etc.), aguas marinas, etcétera (Burleson *et al.*, 1974).

Desinfección con cloro (Cl_2)

El cloro se usó por primera vez con fines sanitarios en 1851 en Londres para desodorizar lodos. En agua, como método continuo de desinfección se empleó hasta 1908 en Bubbley Creck, Chicago. Actualmente, el cloro se aplica en potabilización, para la desinfección, como son el control de sabor y olor (Huebner, 1996).

En todo el mundo, el mecanismo de desinfección con cloro es el más aplicado en los sistemas de abastecimiento de agua es el que emplea el cloro y sus compuestos derivados como agentes desinfectantes (Solsona y Méndez, 2002). La clave de su éxito es su accesibilidad en casi todos los países del mundo, su razonable costo, su alta capacidad oxidante, que es el mecanismo de destrucción de la materia orgánica, y su efecto residual. Todo ello permite en forma bastante simple, asegurar la inocuidad del agua desde que se produce hasta el momento que se usa, lo que

resulta muy beneficioso, tanto en sistemas pequeños como en grandes ciudades con redes de distribución extendidas (Solsona y Méndez, 2002).

Aunque el cloro y sus derivados no son los desinfectantes perfectos, muestran las siguientes características que los hacen sumamente valiosos:

- Tienen una acción germicida de espectro amplio.
- Muestran una buena persistencia en los sistemas de distribución de agua, pues presentan propiedades residuales que pueden medirse fácilmente y vigilarse en las redes después que el agua ha sido tratada o entregada a los usuarios.
- El equipo para la dosificación es sencillo, confiable y de bajo costo. Además, para las pequeñas comunidades hay dosificadores de “tecnología apropiada” que son fáciles de usar por los operadores locales.
- El cloro y sus derivados se consiguen fácilmente, aun en lugares remotos de los países en desarrollo (Solsona y Méndez, 2002).

El cloro (Cl_2) es, en condiciones normales de presión y temperatura (1.033 kg/cm^2 y 0°C) un gas verde, 2.5 veces más pesado que el aire. Se obtiene en forma gaseosa desintegramiento por electrólisis el cloruro de sodio (NaCl) en sodio y cloro, el cual se comprime a 1.74 at y se enfría a -4 y -18°C hasta licuarlo, después se envasa en cilindros metálicos de 100, 150, 200 libras que lo conserven a alta presión. El cloro es un poderoso oxidante y potente germicida. Es eficiente, seguro cuando se usa adecuadamente, es el desinfectante más económico y fácil de aplicar (Cano, 2014).

El mecanismo de acción sobre los microorganismos es poco conocido, pero se postula que actúa inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas. Se ha demostrado que el ácido hipocloroso (HClO) es responsable de la destrucción de los microorganismos. Los hipocloritos tienen un extenso espectro de actividad, son bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, pero con actividad variable frente a micobacterias, según la concentración en que se use (Diomedi *et al.*, 2017).

A continuación, algunos conceptos importantes para validar el proceso de desinfección con cloro:

Cloro residual: es la concentración de cloro presente en el agua, tras la aplicación de la dosis considerada y transcurrido el tiempo de contacto necesario para realizar su acción oxidante, en el que se ha consumido parte del mismo.

Demanda de cloro: es la cantidad de cloro que se emplea para la reacción con los compuestos reductores y orgánicos.

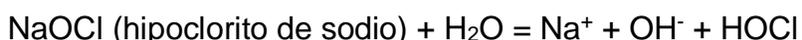
Cloro residual combinado: es el cloro que se usa para la formación de las cloraminas.

Cloración de ruptura: es el cloro que se encarga de la destrucción de las cloraminas.

Cloro residual total: es el resultado de la suma de cloro residual combinado y cloro libre residual (CONAGUA, 1991).

Química de la cloración

La cloración del agua potable se lleva a cabo mediante el burbujeo del cloro mediante la disolución de los compuestos de cloro y su posterior dosificación. El cloro en cualquiera de sus formas, se hidroliza al entrar en contacto con el agua formando ácido hipocloroso (HOCl):



Durante el proceso químico de la desinfección, se producen compuestos como cloraminas, dicloraminas y tricloraminas en presencia de amoníaco en el agua. Las cloraminas sirven igualmente como desinfectante, aunque de una manera sumamente lenta. Asimismo, se forma el ácido clorhídrico y los hidróxidos de sodio,

los cuales no participan en procesos de desinfección (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

La especie desinfectante es el ácido hipocloroso (HOCl), el cual se disocia en iones hidrógenos (H⁺) e hipoclorito (OCl⁻) y adquiere sus propiedades oxidantes:



Ambas fracciones de la especie son microbicidas y actúan inhibiendo la actividad enzimática de las bacterias, produciendo su inactivación.

Tanto el ácido hipocloroso (HOCl) como el ion hipoclorito (OCl⁻) están presentes hasta cierto punto cuanto el pH varía entre 6 y 9 (el rango usual para el agua natural y potable. Cuando el valor de pH del agua clorada es de 7.5 el 50% de la concentración del cloro presente será ácido hipocloroso no asociado y el otro 50% será ión hipocloroso (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

Los porcentajes de HOCl y OCl⁻ a diferentes valores de pH pueden verse en la Figura 1. La concentración de las dos especies significa una considerable diferencia

en la propiedad bacteriana del cloro, ya que el ácido hipocloroso es 80 veces mayor que la del ion hipoclorito (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

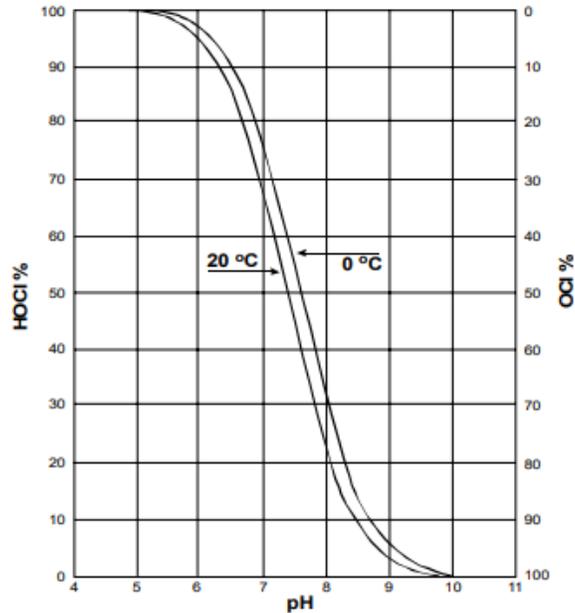


Figura 1 Cantidades relativas de HOCl y OCl⁻ para los valores de pH (Organización Panamericana de la Salud, 2007)

Demanda de cloro, cloro combinado y punto de quiebre

La Figura 2 describe la evolución de la cantidad de cloro residual en función de la cantidad de cloro introducido el cual consiste en:

Fase AB: El cloro introducido en el agua se combina inmediatamente con la materia orgánica. Consecuentemente, el residual medido se mantiene en cero. Mientras no se destruyan estos compuestos, no se producirá la desinfección.

Fase BB: A partir del punto B, el cloro se combina con compuestos nitrogenados. Entonces ya se puede medir una cantidad de cloro residual. Esta concentración no corresponde al cloro realmente activo, sino a cloraminas que reaccionan igual que el cloro con los reactivos de los aparatos de medición. Se trata de productos orgánicos complejos, por lo general de fuerte olor, y muy poco desinfectantes.

Fase B'C: Cuando se añade más cloro, se observa que la cantidad de cloro residual que se mide con los aparatos ordinarios de medición, va en descenso. En realidad,

el cloro introducido ha servido para destruir los compuestos formados durante la fase BB". El agua no huele tan mal, pero sigue sin estar desinfectada.

A partir del punto C, el cloro introducido está finalmente disponible para cumplir su función de desinfectante.

En conclusión, los primeros miligramos de cloro introducidos no garantizan la desinfección. De hecho, antes de que éste pueda garantizar realmente una acción eficaz, se deberá agregar una cantidad variable de desinfectante para que se produzcan todas las reacciones químicas secundarias. Esta cantidad se denomina: demanda de cloro.

La desinfección debe realizarse en aguas de una buena calidad química (en las que la demanda de cloro sea mínima), con objeto de limitar al máximo las reacciones secundarias, generadoras de subproductos. Por otra parte, la presencia de partículas coloidales protege a los microorganismos de la acción desinfectante del cloro.

Antes de iniciar la desinfección, deben realizarse pruebas sistemáticas para determinar la cantidad de cloro que se debe agregar para lograr superar la fase de las reacciones secundarias (Organización Panamericana de la Salud, 2007)

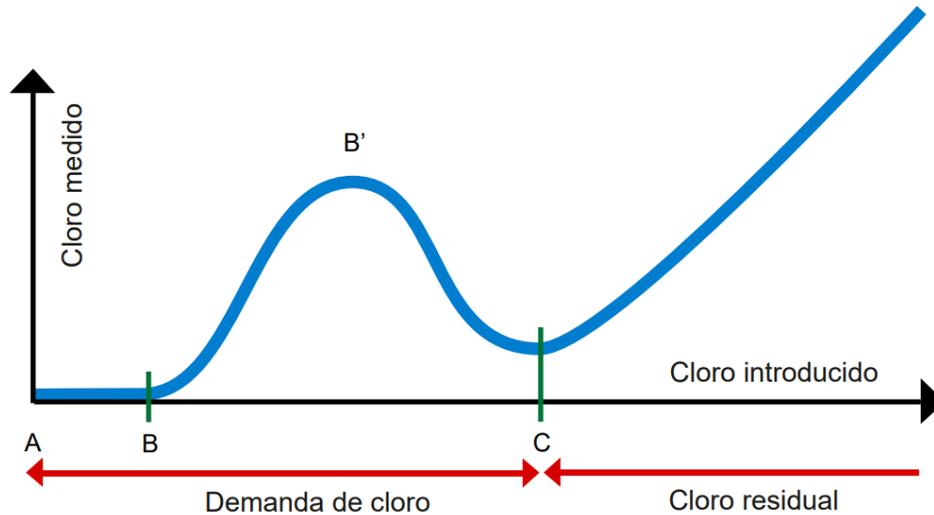


Figura 2 Cantidad de cloro residual en función de la cantidad de cloro introducido (Organización Panamericana de la Salud, 2007)

Eficacia de la desinfección

La eficacia de la desinfección final es máxima cuando el agua ya ha sido tratada para la eliminar toda turbiedad y más exactamente para eliminar toda sustancia que pueda reaccionar o “consumir” el cloro. Si los tratamientos previos no se aplican o no se pueden aplicar, o se aplican de forma errónea en un momento dado, una sobredosis de cloro permitirá obtener una desinfección correcta del agua, si bien, como consecuencia de ello, aparecerán subproductos de desinfección.

La calidad del cloro que hay que añadir el agua para la desinfección depende de:

- De la temperatura del agua.
- El tiempo de contacto (CT, tiempo transcurrido entre la inyección del cloro y el consumo del agua) (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

Observación de bacterias mediante microscopía electrónica

Se han producido muchos avances en un intento por obtener una imagen adecuada de las células y las estructuras intracelulares, que van desde la microscopía óptica hasta las técnicas actuales basadas en la microscopía electrónica (Bogner *et al.*, 2007). La microscopía electrónica ha sido un método popular para identificar

estructuras subcelulares desde 1944, cuando el científico Keith R. Porter y Albert Claude utilizaron por primera vez un microscopio electrónico para observar la morfología y la composición de las células (Havrdova, 2014).

Principios generales de la microcopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, por sus siglas en inglés, SEM)

El principio del sistema SEM consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos.

En la Figura 3, se representa un esquema donde se visualiza los principales componentes de un microscopio electrónico de barrido, la denominada columna de electrones, la cual lleva alojado en su interior un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación por analogía con un sistema óptico (Román, 2013).

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. Los electrones esparcidos y los rayos X proveen información útil sobre el objeto, como se lo resumirá a continuación.

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.

El detector de electrones secundarios está diseñado con una carga ligeramente positiva para atraerlos.

El extremo del detector contiene sistema para hacer que los electrones secundarios atraídos golpeen una placa aluminizada acoplada a un material fosforescente que provoca que se forme una centella o chispa. Esta es convertida a su vez en un

fotoelectrón después de chocar con un fotocátodo y así entra a un tubo fotomultiplicador que incrementará el tamaño de la señal hasta el orden de cien mil o un millón de veces (Amano y Díaz, 2015).

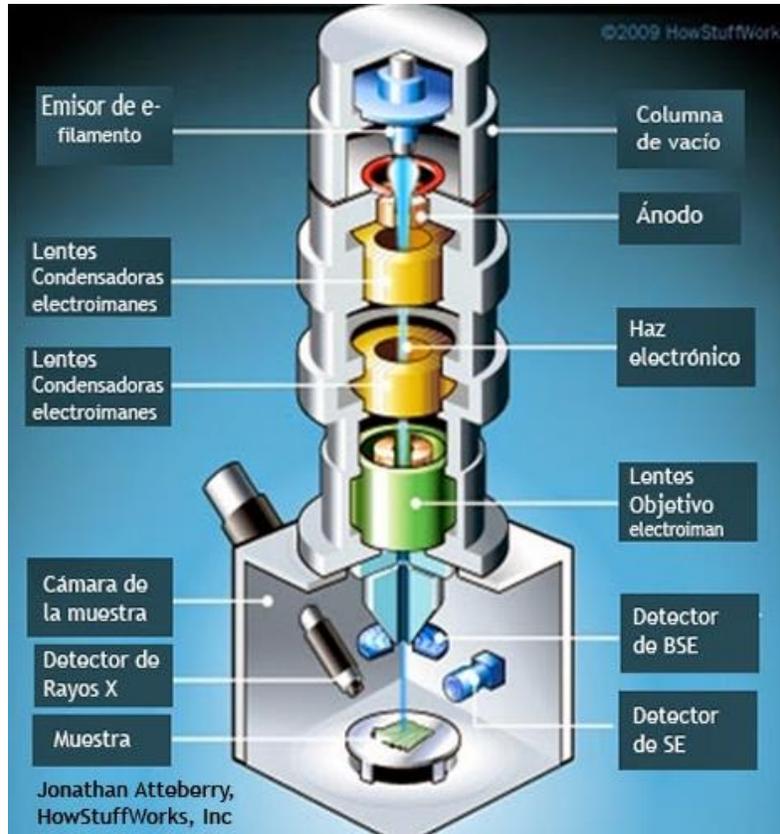


Figura 3 Principales componentes del microscopio electrónico de barrido obtenido en <http://rosellminerals.blogspot.com/2014/05/sem-eds-el-microscopio-electronico-i.html>

La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), es una técnica analítica más avanzada que SEM ideal para caracterizar y visualizar la composición elemental de una muestra. FESEM tiene una resolución espacial de <1 nm y ha permitido que surjan nuevos enfoques para los estudios de ciencias de la vida, basados en imágenes de alta resolución que antes solo podían obtenerse utilizando SEM (Havrdova, 2014).

FESEM es un tipo de microscopio electrónico que toma imágenes de la superficie de la muestra al escanearla con un haz de electrones de alta energía en un patrón

de escaneo ráster. Se utilizan emisores de electrones de pistola de emisión de campo. Estos tipos de emisores de electrones pueden producir hasta 1000x la emisión de un filamento de tungsteno. Sin embargo, requieren condiciones de vacío mucho más altas. Después de que el haz de electrones salga del cañón de electrones, se confinan y enfocan en un haz monocromático delgado enfocado utilizando aberturas metálicas y lentes magnéticas. Finalmente, los detectores de cada tipo de electrones se colocan en los microscopios que recogen señales para producir una imagen de la muestra. La morfología de las partículas de nuestras muestras se investigó utilizando el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Nova 200 NanoLab (FE-SEM) (Alyamani y Lemine, 2012).

FESEM, 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. 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.

FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de 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 (Universidad Politécnica de Valencia, 2012).

Cuantificación de bacterias para desinfección

La cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica. No solo es importante conocer al responsable de un efecto benéfico o identificar al microorganismo potencial de causar alguna infección severa, sino también es importante saber el número de microorganismos implicados, para establecer si éstos serán capaces de desarrollar una función benéfica o perjudicial (Corral-Lugo, 2012).

La metodología de recuento en placa por plaqueo es una metodología ampliamente utilizada (Hoben y Somasegaran, 1982), que consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 100µl de cada dilución en una placa; las placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección (Corral-Lugo *et al.*, 2012).

La filtración por membrana es el mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de la membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor a 0.45 µm, esto gracias a que una bomba eléctrica ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los contaminantes de tamaño menor que el específico del poro atraviesan la membrana o se quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego está es llevada a un medio de enriquecimiento selectivo (Navarro, 2007).

Antecedentes

Morfología bacilar

La cólera es una diarrea infecciosa aguda producida por *V. cholerae*. La transmisión se produce predominantemente a través de agua o alimentos contaminados, catalogada como una “enfermedad emergente y reemergente” que amenaza los países en desarrollo.

Debido a esto se hace necesario el llevar a cabo procesos de desinfección del agua que se destinará para consumo humano y uno de los desinfectantes más utilizados para este fin es el cloro. El cloro se ha atribuido diversas ventajas como potabilizador de agua, entre las que destacan su bajo costo, comodidad de uso y su alta eficacia en la eliminación de bacterias (American Water Works Association, 1973; Gómez *et al.*, 2012).

Varios autores se han enfocado en el estudio de la desinfección de *V. cholerae* con cloro. En el 2002, García y col. evaluaron la desinfección de *V. cholerae* con diferentes concentraciones de cloro cuantificándolo a partir del número de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando la técnica de filtro por membrana (NOM-181-SSA1-1998). Observando que con 2 L de medio acuoso de bacteria agregando 1mg/L de cloro por 45 min obtuvo un 85% de sobrevivencia *V. cholerae*. Asimismo, Sousa *et al.*, (2001) mostraron que las concentraciones de cloro superiores a 7 mg/L dieron como resultado una reducción de población bacteriana del 100% en 5 min. Ledón y col. (2014) realizó un estudio a partir de 10^6 y 10^7 UFC/mL con hipoclorito de sodio (NaCl) al 2 mg/L durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos y se contaron las UFC que sobrevivieron, en donde a los 5 min no se contaron células viables.

Se han hecho estudios sobre desinfección de cloro con otras bacterias, Camper y McFeters (1979) demostraron que con una concentración de 0.5 mg/L era necesario para producir una lesión en la bacteria *E. coli*. Obtuvo una tasa de lesiones aproximada del 90%, según lo determinado por la diferencia entre el medio de las placas con los medios selectivos y no selectivo en 8 minutos de exposición al cloro Wang y col. (2007, citado por Calderón, 2010) demostró que el ácido hipocloroso

tiene un efecto antimicrobiano de amplio espectro en concentraciones que van de 0.1 a 2.8 mg/L en un periodo de tiempo exposición de 2 min, abarcando bacterias clínicamente relevantes, entre los que incluyen *Staphylococcus aureus*, *S. aureus metilino resistente* y *Enterococcus faecium vancomicino* resistente. Asimismo, Diao (2004), con una concentración de 5mg/L de cloro con 60 min se tiene un porcentaje de inactivación de 99.98%, a pesar de este porcentaje por medio de SEM no se observa un efecto en la integridad de las células. Del mismo modo, Arana y col. (1999) teniendo un cloro residual de 2.0 mg/L con un tiempo mínimo de contacto de 15 min se tuvo una pérdida de cultivo de 2 a 2.5 log de *E. coli*.

Morfología rugosa

Se ha demostrado que las células bacilares de *V. cholerae* en condiciones de limitantes de nutrientes pueden exhibir colonias rugosas que son virulentas (Ali, 2002). Esta morfología está asociada con la expresión de un exopolisacárido amorfo (EPS) que promueve la formación de biopelículas, y también indicaron que las cepas rugosas mostraron resistencia al estrés osmótico y oxidativo (Mizunoe, *et. al.* 1999). Las biopelículas de *V. cholerae* contienen tanto densidad más alta de bacterias como de células hiperinfectiosas y, por lo tanto, desempeñan un papel clave en la transmisión (Teschler *et al.*, 2015).

Otros estudios han demostrado que *V. cholerae* es capaz de cambiar de morfología colonial bacilar a rugosa. Yildiz y Schoolnik (1999) demostraron que, bajo condiciones de bajos nutrientes, en un medio mínimo de sales M9 suplementando con 0.02 mg/L de glucosa a 30°C de incubación, las cepas bacilares de El Tor pudieron cambiar a colonias rugosas después de los 20 días. Por otro lado, Morris y col. (1996) indujo a la bacteria *V. cholerae* rugosas mediante las bacterias de colonias bacilares pasaron en Agua con Peptona Alcalina (APA) durante 2 a 4 días y luego se colocaron en placas en agar Luria a 37 ° C. Asimismo, Suzarte y col. (2005) reporta una inducción con APA al 1%, después de 22 días se cultivó la bacteria en placas de LB y pudo detectar el fenotipo rugoso. Del mismo modo, Ledón y col. (2014) y Payne y col. (2017) demostraron que la bacteria se inducía durante 30 días en tubos de 5 mL con APA.

Se han realizado pocos estudios sobre la desinfección de *Vibrio cholerae* con cloro, Orta y col. (1996) demostró que la bacteria utilizando una dosis de 30 mg/L de cloro disponible durante 35 min de tiempo de contacto la bacteria se inhibió un 99.9%. Ledón y col. (2014) mostro que *V. cholerae* en presencia de biopelículas con una densidad bacteriana de 10^6 y 10^7 demostró alta resistencia al cloro, se mantuvo prácticamente constante la cantidad de células viables con 2mg/L a los 30 min del tratamiento el cual se contaron alrededor de 10^5 UFC/mL.

Por otro lado, Shikongo-Nambabi y colaboradores en el año 2010 realizaron desinfecciones con diferentes concentraciones de cloro con otros generos de *Vibrios*, *V. alginolyticus* V. V590 y V595 y *V. parahaemolyticus* LMG 2850 con morfología rugosa. A concentraciones bajas de cloro (1.5mg/L) no hubo reducción significativa en la densidad bacteriana, sin embargo, tuvo una reducción significativa a altas concentraciones de cloro (4mg/L). Las densidades bacterianas de las cepas *V. alginolyticus* V. V590 y V595 y *V. parahaemolyticus* LMG 2850 cayeron a log 3.73, 2.33 y 2.88 log respectivamente. No se tienen estudios sobre la observación de daño ultraestructural posterior a la desinfección mediante microscopia electrónica.

Cocoide, estado Viable No Cultivable

A su vez, se ha observado que las células de *V. cholerae* experimentan grandes alteraciones en la morfología celular a partir de las formas bacilares a células redondas de forma cocoide en estado Viable No Cultivable (VNC). Estudios previos concluyeron que la transición a una morfología cocoide podría transmitir una ventaja selectiva que permitiría una supervivencia prolongada en el ambiente acuático cuando se encuentran concentraciones de nutrientes insuficientes (Ravel *et al.*, 1995)

Se han hecho varios estudios sobre el cambio de morfología que presenta la bacteria *V. cholerae*. Baker y col. (1983) muestra que *V. cholerae* a través de la disminución de los nutrientes, las células entraron en estado VNC posterior a los 30 días. Por otro lado, Sung y col. (2006) mostraron que al incubar en microcosmo de agua de rio (RWM) con un 0.5% de NaCl con una temperatura de 4°C durante 44

días entro en estado VNC. También Krebs y Taylor (2011) menciona que la privación de los nutrientes, la disminución de la temperatura y otras señales ambientales, el cambio de morfología, puede cambiar a morfología cocoide, demostrándolo incubando la bacteria en agua de mar artificial (ASW), con una temperatura de 4°C entrando en estado VNC a los 15 días.

De la misma forma, Ravel y col. (1995) incubo la bacteria en ASW a 4°C y *V. cholerae* entro en morfología cocoide en el día 26. Grim (2007) señaló que el cambio en la morfología de la bacteria de bacilar a cocoide se realizó en un tiempo de 30 a 60 días con una temperatura de 4°C en agua de mar artificial y el cambio de morfología cocoide completo hasta el día 60. Del mismo modo, Casasola y col. (2018) suspendió la bacteria en matraces Erlenmeyer con 50 mL de Agua de Mar Artificial (ASW) y se mantuvieron a 4°C y se estableció una morfología cocoide hasta el día 66.

No se tienen muchos estudios sobre desinfección cloro para la bacteria en estado VNC, pero se han realizado estudios en otras bacterias, un reporte de Orta *et al.*, (2017a) indica que llevaron a cabo pruebas con cloro para desinfección de *H. pylori* en estado VNC utilizando FESEM para la observación del daño estructural en la membrana. Aunque FESEM es una tecnología microscópica muy precisa, el daño a la membrana celular causada por el cloro no era visible. Además de actuar como un oxidante en varios celulares componentes y proceso metabólico en bacterias, cloro también altera la permeabilidad de la membrana después de su desinfección.

Justificación e hipótesis

Justificación

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se siguen reportando casos de la enfermedad del cólera en todo el mundo. Específicamente en América y de acuerdo con el boletín 36 del año 2017 de la OMS, Haití reportó 41 421 casos. En México una problemática severa de cólera se presentó en la pandemia de los años 90's, no obstante, a partir del año 2010 se han presentado casos esporádicos con una incidencia mayor en el año 2014. Específicamente, en el año 2010, 2011 y 2012 en el estado de Sinaloa, en 2013 se originaron brotes y casos en la Ciudad de México, Hidalgo, Veracruz y San Luis Potosí (Secretaría de Salud, 2016). En el 2015 se identificó un caso en el estado de Puebla y en agosto de 2016 en el estado de Nayarit (Carrillo, 2015; CONAVE, 2016).

Debido a que siguen existiendo brotes de cólera a nivel mundial, surge la necesidad de evidenciar los mecanismos de resistencia de la bacteria a procesos comunes de desinfección de agua para consumo humano tales como el cloro. Y siendo el agua el principal vehículo de transmisión de la bacteria *Vibrio cholerae*, la presente tesis contribuye a evidenciar el efecto que el cloro, comúnmente utilizado como desinfectante para agua potable, tiene en la ultraestructura celular de *V. cholerae* en sus morfologías resistente rugosa y cocoide comparado con la morfología bacilar habitual.

Hipótesis

Si la bacteria *V. cholerae* en su morfología bacilar (habitual) desarrolla variantes resistentes para su adaptación a condiciones ambientales adversas; entonces, el cloro como desinfectante común causara menor daño en las células habituales que en las resistentes, lo cual es visualizado mediante microscopía electrónica FESEM.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto causado por el cloro en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en sus tres diferentes morfologías, bacilar (habitual), cocoide y rugosa, mediante la obtención de micrografías electrónicas FESEM.

Objetivos Particulares

- Inducir bajo condiciones de laboratorio las variantes de resistencia de la bacteria *Vibrio cholerae*: morfología rugosa (exposición continua en Agua Peptonada Alcalina) y morfología cocoide (exposición continua en agua de mar artificial estéril).
- Evaluar el efecto de diferentes dosis y tiempos de contacto del cloro como desinfectante en la ultraestructura celular de *Vibrio cholerae* morfologías bacilar, rugosa y cocoide mediante microscopia FESEM.
- Determinar los porcentajes de inactivación de la bacteria en sus tres diferentes morfologías: bacilar (habitual), cocoide y rugosa, usando cloro como desinfectante.

Metodología

Para determinar el efecto causado por el cloro en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en sus tres diferentes morfologías cocoide, bacilar y rugosa, mediante la obtención de micrografías mediante FESEM se realizó la siguiente metodología.

Preparación del inóculo *V. cholerae*

La bacteria *V. cholerae* O1 fue proporcionada por el departamento del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INNSZ). Para obtener colonias de *V. cholerae* se cultivaron placas de medio de cultivo TSA (agar triticasa soya) en condiciones microaerofílicas en una cámara de inoculación a 37°C para obtener colonias aisladas.

Inducción a forma cocoide de *V. cholerae*

Para la inducción a morfología cocoide, se tomó una colonia aislada a partir de la placa con agar TSA y se inoculó a una botella de dilución con 50 mL de caldo LB (Luria-Bertani) y dejando reposar por 24 hrs a temperatura ambiente. De este cultivo se tomaron 100 µL y se adicionaron a 50 mL de caldo LB, el cual se incubó por tres horas a 37 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, el cultivo se traspasó en tubos Corning de 50 mL donde se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. Se agregó 50 mL Agua de Mar Artificial Estéril (ASW), se homogenizó la bacteria en un vórtex y se volvió a centrifugar a 3,500 rpm y decantó el sobrenadante. Este proceso se repitió 3 veces hasta quitar todo resto de caldo LB.

Por último, se adicionaron 6 mL de ASW, se homogenizó la bacteria y se tomó una alícuota de la bacteria de 1000 µL y se suspendió en una botella de dilución con 50 mL de ASW y se dejó en refrigeración a 4°C para su inducción.

Para determinar el tiempo de transformación de la bacteria forma bacilar a cocoide se dio seguimiento mediante tinción de Gram observadas en un microscopio óptico diariamente.

Inducción al fenotipo rugoso

Para inducir la bacteria a morfología rugosa de *V. cholerae* se tomó una ansada de la bacteria de agar TSA y se inoculó en dos tubos de ensayo con 10 mL Agua Peptonada Alcalina (APA) al 1% y 2% respectivamente, ajustando su pH al 7 con NaOH al 1N. Se dejó en la incubadora a 37°C durante 24 hrs, después se tomó una ansada del caldo APA al 1% y 2% donde se cultivó en TSA y se dejó en incubación a 37°C por 24 hrs. Se siguió este procedimiento de alternación de medios APA y TSA por 20 días. Para verificar que la bacteria se encontrara en fenotipo rugoso en un porta muestras se tomó una ansada del cultivo TSA y se mezcló en una gota de solución salina al 2% rotando suavemente durante 2 min y al presenciar grumos la bacteria se encontraba en fenotipo rugoso. Para mantener la bacteria como variedad rugosa se resembró cada 15 días en placas de agar TSA.

Preparación de la suspensión de *V. cholerae* bacilar para la desinfección

Para preparar la suspensión para la desinfección se sembró una colonia aislada de las placas TSA de la bacteria en caldo LB y se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 hrs para su crecimiento. Posteriormente se colocó la bacteria en tubos Corning de 50 mL y se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min, se decantó y se le agregaron 50 mL de Solución Salina Estéril (SSI), este último paso se repitió tres veces para quitar residuos de caldo LB. Finalmente se agregó SSI hasta obtener una densidad celular de 9×10^8 (no. 3 en la escala de McFarland) para realizar la desinfección.

Preparación de la suspensión de *V. cholerae* en fenotipo rugoso para la desinfección

Se realizaron pruebas preliminares con agua de dilución y agua destilada estéril para observar en cual solución se decantaba mejor la biopelícula, esto para no tener turbidez en la medición de cloro residual, se observó que el agua destilada era la más eficiente para la decantación.

Una vez obtenida la bacteria en forma rugosa con un asa bacteriología se raspó la bacteria y se agregó a un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril hasta

llegar obtener una densidad celular de 9×10^8 (no. 3 en la escala de McFarland) para realizar la desinfección.

Preparación de la suspensión de *V. cholerae* para forma cocoide para la desinfección

Una vez observadas las bacterias en tinciones Gram para forma cocoide se colocó la bacteria en tubos Corning de 50 mL y se centrifugó a 3,000 rpm, se decantó y se agregó ASW hasta obtener una densidad celular de 9×10^8 (no. 3 en la escala de McFarland) para alcanzar su dosis infectiva de la bacteria.

Desinfección para morfología bacilar, rugosa y cocoide de *V. cholerae*

Para los experimentos de desinfección con cloro todos los materiales fueron previamente esterilizados. Se utilizó una solución comercial de NaClO al 13%. En una suspensión de *V. cholerae* con una densidad de 9×10^8 UFC/mL de cada una de las morfologías bacilar, rugosa y cocoide de la bacteria se adiciono una alícuota de una disolución de NaClO conforme a cada CT (Tabla 2). Una vez terminado el tiempo de contacto se inactivo el cloro libre adicionando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.1 N estéril. La determinación de cloro libre residual se realizó con un equipo colorimétrico portátil que mide concentraciones de 0 a 2.0 mg/L en una longitud de onda 528 nm, para cuantificar esté parámetro se utilizará el reactivo *DPD* (dietil-p-fenilendeamina) el cual da un color rosado en presencia de cloro libre residual.

Tabla 2. Condiciones para la desinfección con cloro *V. cholerae*.

CT	CONCENTRACIÓN (mg/L)	TIEMPO (min)
0	0	0
1.5	0.5	3
3.5	1	3.5
10	0.5	20
15	1	15
30	1	30

Preparación de muestras para observación en FESEM

Para la observación de las muestras mediante FESEM, después de la desinfección, fue necesario replicar los procedimientos en volúmenes menores de bacteria (0.5 mL) y con la misma densidad (6×10^8 UFC/mL) en tubos Eppendorf. Terminado el tiempo de contacto se desactivó la reacción con $Na_2S_2O_3$ 0.1 N estéril y las muestras se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min en una microcentrifuga, se fijó con glutaraldehído al 3% y se dejaron reposar por 120 min, pasado este tiempo se centrifugaron las muestras por 10 min a 3,000 rpm, retirando el sobrenadante y se consiguió el pellet. Se lavó el pellet celular con disoluciones de etanol-agua en concentraciones crecientes de 10 en 10 al 100% para su deshidratación, en cada lavado se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min. Posteriormente las muestras se llevaron a secado en punto crítico, este procedimiento fue realizado en el Instituto de Biología de la UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias.

El secado en punto crítico consistió en colocar el pellet formado y deshidratado en un pequeño sobre de arroz y cerrado con una grapa, las muestras se mantuvieron en etanol absoluto, el pellet se colocó en la cámara de punto crítico (EMITECH K850), con ayuda de CO_2 se dejó enfriar hasta $0^\circ C$, posteriormente las muestras se lavaron con CO_2 hasta que las burbujas desaparecieron, se calentó hasta $40^\circ C$ 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 min, después se inyectará aire y se esperó hasta que la presión bajara a 0 psi para poder retirar las muestras.

Después del secado en punto crítico, las muestras fueron montadas en un porta muestras cilíndrico de latón para su observación en FESEM utilizando cinta de carbono para fijarla en la parte superior, y bombardeadas por oro ya que la muestra no es conductora y esto ayuda a la conducción de electrones a través de la preparación. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico al alto vacío (JEOL, JSM-7600F), en el Instituto de Materiales de la UNAM con la colaboración del Dr. Omar Novelo Peralta, las técnicas que se utilizarán para la observación fueron electrones secundarios y electrones dispersos. Se tomaron las micrografías

correspondientes, tanto en los fenotipos bacilar, rugosa y cocoide con y sin desinfección.

Cuantificación de bacterias mediante filtro de membrana

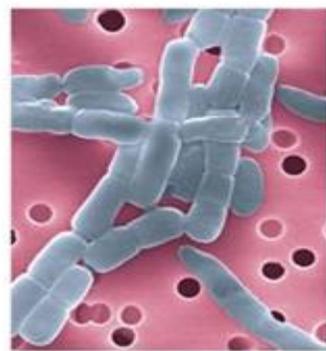
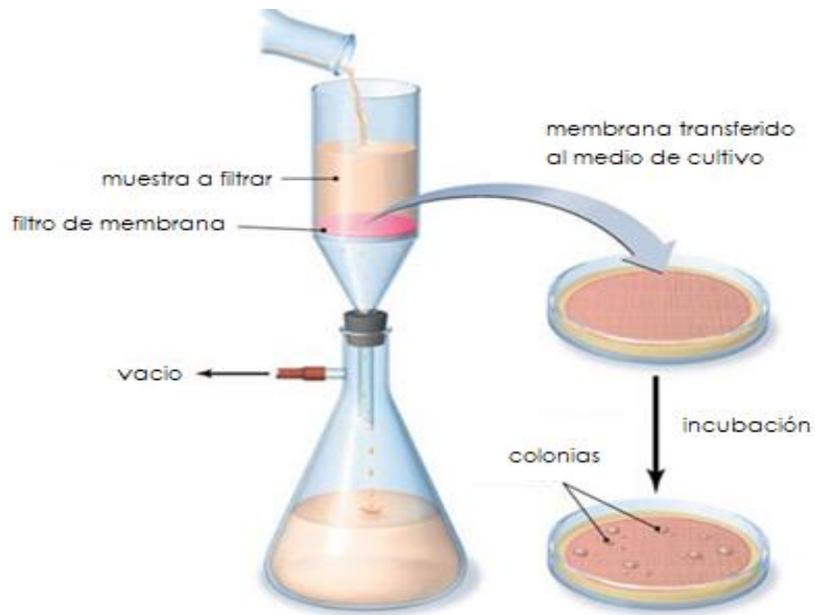
Para determinar la eficacia de la desinfección se utilizó la técnica de cuantificación a partir del método de filtro de membrana para las suspensiones bacterianas bacilar y rugosa APA 1% y APA 2%. La morfología cocoide al estar en estado Viable no cultivable no crece en medios de cultivos no se realizó esta prueba.

Para esta prueba se tomó en cuenta la NOM-AA-102-SCFI-2006 con modificación en el medio TSA para obtener crecimiento de la bacteria.

Se hicieron pruebas preliminares para seleccionar una dilución que diera un conteo representativo de colonias en una membrana de 47 mm de diámetro.

En una botella de dilución se realizó la desinfección en un volumen total de desinfección de 100 mL usando como medio acuoso SSI para morfología bacilar y agua destilada estéril para morfología rugosa APA 1% y 2% con densidad bacteriana de 1×10^4 /mL, se agregó una alícuota de cloro dependiendo de CT (Tabla 2) y al finalizar el tiempo de contacto se le agregó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.1 N estéril para inactivar el cloro libre.

Posteriormente, a partir de la botella de desinfección se tomaron 10 mL y se colocaron en una botella de dilución con 90 mL de SSI estéril para morfología bacilar y agua destilada estéril para rugosa APA 1% y APA 2%, se realizaron diluciones seriadas 1:10, para bacilar 10^{-2} y rugosa 10^{-7} . Respecto a las diluciones, en un matraz Kitazato, se acoplo en la base de equipo de filtración y en esta base se colocó una membrana millipore y se instaló el embudo y se sujetó con pinzas, vertiendo la muestra en el embudo, con ayuda del vacío se filtró la dilución y se realizaron lavados con 15 mL de agua destilada.



© 2012 Pearson Education, Inc.

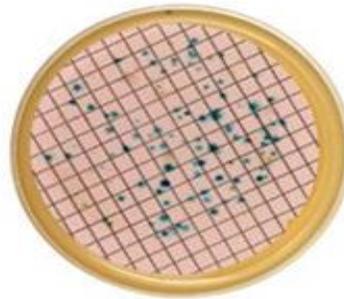


Figura 4 Filtro de membrana

Posterior al lavado se quitará el embudo y con ayuda con pinzas estériles se sobrepondrá la membrana en una caja de Petri 60 x 15 con medio TSA asegurándose que no haya burbujas entre la membrana y el medio. Finalmente dejó incubar las cajas a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se realizó el conteo de las colonias de la bacteria. Las bacterias obtenidas se cuantificaron en UFC/100mL.

Resultados y discusión

Para determinar el efecto causado por el cloro en la ultraestructura en la bacteria *V. cholerae* en sus tres diferentes morfologías: bacilar, rugosa y cocoide mediante la observación de micrografías mediante FESEM.

Inducción de *V. cholerae* de morfología bacilar a rugosa.

Para la inducción de la bacteria *V. cholerae* de bacilar a rugosa se cultivó en placas de agar TSA por 24 hrs a 37°C y posteriormente se cultivó en Agua Peptonada Alcalina al 1 y 2% (APA) en las mismas condiciones y se repitió este procedimiento de alternación de cultivo.

En el día 12 la bacteria había cambiado su morfología en la placa TSA. En la Figura 5 se muestra la diferencia de morfología en placa de la bacteria en su estado bacilar y rugoso, así como sus colonias aisladas. Para verificar que la bacteria se encontrará en fenotipo bacilar rugoso en un portamuestras se tomó una ansada del cultivo TSA y se mezcló en una gota de solución salina al 2% rotando suavemente durante 2 min, se observó aglutinamiento de la bacteria esta se encontraba en su morfología bacilar rugoso.

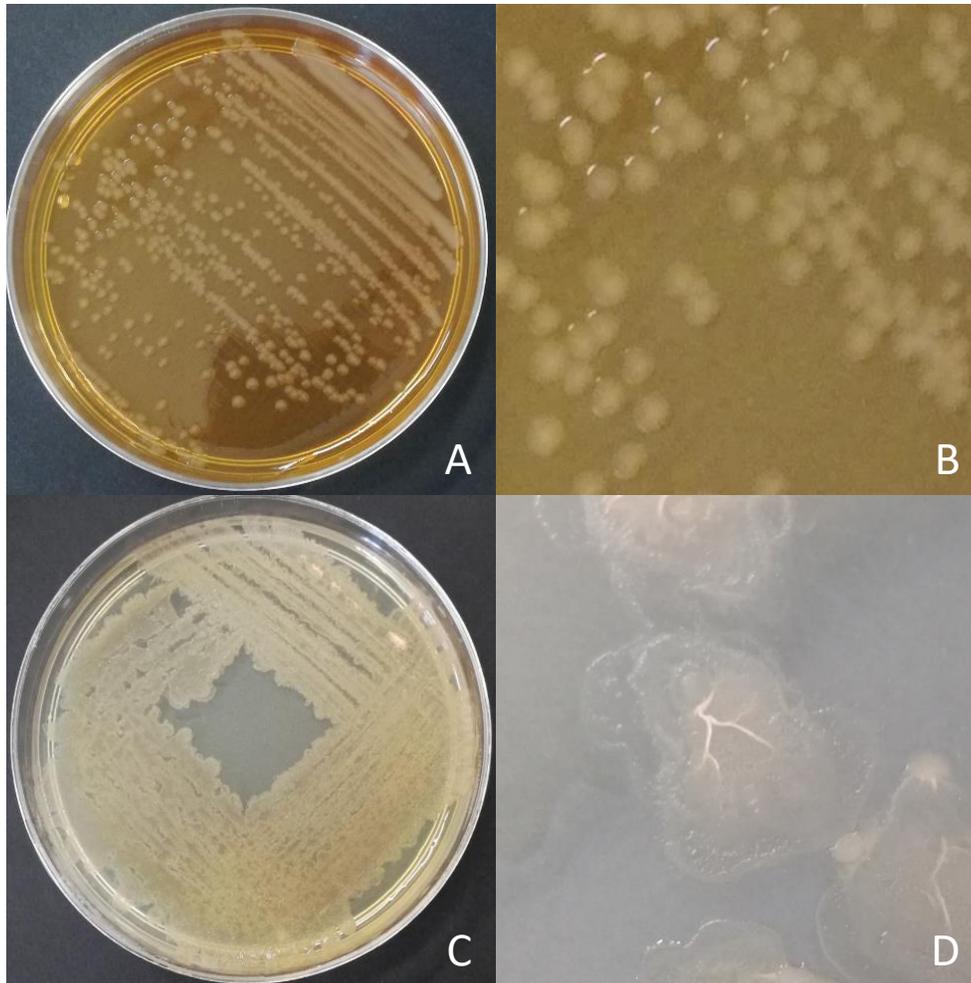


Figura 5 Diferenciación de morfología de *V. cholerae* bacilar y rugosa: A) siembra en placa en medio BHI de *V. cholerae* bacilar, B) colonias aisladas de *V. cholerae* en bacilar C) siembra en placa en medio TSA de *V. cholerae* rugosa D) colonia aislada de *V. cholerae* en rugosa

El tiempo de inducción de la morfología bacilar a rugosa de la bacteria *V. cholerae*, concuerdan con otros autores que reportan haber inducido la morfología rugosa, Suzarte *et al.*, (2002) indujo el cambio al sembrarla en APA al 1% y posterior a los 22 días cultivo la bacteria en LB donde se detectó el fenotipo rugoso. De misma forma Ledón *et al.*, (2014) y Payne *et al.*, (2017) señalaron que la bacteria cambio a morfología rugosa incubada en 5 mL de APA durante 30 días. Por otro lado, Morris *et al.*, (1996) indujeron la bacteria a morfología rugosa después de 2 a 4 días en APA y posteriormente la cultivaron en agar Luria a 37°C.

También se han demostrado que *V. cholerae* es capaz de cambiar de morfología bacilar a rugosa con otras condiciones diferentes a las utilizadas en ésta tesis. Wai *et al.*, (1998) informo que la cepa TSI-4 de *V. cholerae* El Tor O1 cambio de morfología espontáneamente a colonias rugosas en condiciones de inanición, la cepa fue sometida a privación de sales en M9 durante 2 meses a 16°C posteriormente se colocaron en placas de agar L a 37 °C. De igual manera, Yildiz y Schoolnik (1999) demostró que bajo condiciones de limitación de nutrientes en un medio mínimo M9 suplementando con 0.02 de glucosa a 30°C de incubación, las cepas bacilares de *V. cholerae* El Tor cambiaron a colonias rugosas después de los 20 días.

Inducción de *V. cholerae* de morfología bacilar a cocoide

Para la inducción de la bacteria *V. cholerae* a VNC se cultivó la bacteria bacilar en agua de mar artificial estéril (ASW) con una temperatura de 4°C. Para el día 57 se obtuvo el cambio de morfología a cocoide y la pérdida de cultivo. El seguimiento de este cambio de morfología se realizó por microscopía óptica (tinción Gram). Al respecto se ha reportado que varios autores indujeron la bacteria a morfología cocoide en agua de mar artificial (ASW) con temperatura de 4°C con diferentes días de inducción, posterior a los 26 días (Ravel *et al.*, 1995) durante 30 a 60 días (Grim *et al.*, 2007), después de los 15 días (Krebs y Taylor, 2011), sucesivo al día 60 (Casasola *et al.*, 2018). Baker *et al.*, (1983) a partir de la privación de nutrientes y bajas temperatura la bacteria entra a estado VNC los 30 días. Por otro lado, Sung *et al.*, (2006) obtuvo el estado VNC cultivando la bacteria en agua de río (RWM) con 0.5% de NaCl a 4°C posterior al día 44.

Seguimiento del cambio de morfología bacilar a cocoide en microscopía óptica

Para el seguimiento de la inducción de bacilar a cocoide, se utilizó tinción Gram para la observación en microscopía óptica. En el primer día se observaron todas las células en forma bacilar, en el día 10 se empezó a observar las células en forma "U", para el día 23 hubo mayor tendencia de células en forma de "U" y se empezó a observar células con forma anillada, para el día 38 la mayor parte de las células en forma anillada, finalmente el día 57 gran parte de las células tenían forma cocoide.

En la Figura 6, se muestra los cambios de morfología que presenta la bacteria en la inducción de cocoide, se observa la morfología bacilar, que posteriormente se curva y alarga tomando forma de "U", asimismo, se curva hasta tomar forma anillada para así compactarse y obtener su forma cocoide.

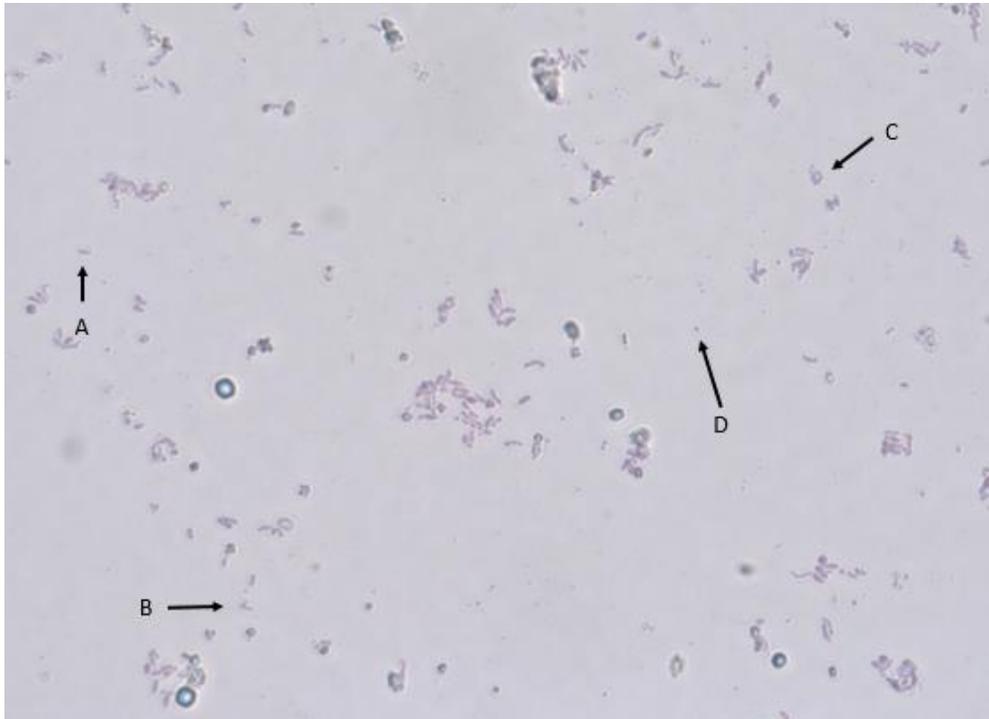


Figura 6 Cambio de morfología de *V. cholerae* de bacilar a cocoide en el día 17 de inducción (microscopía óptica 100x, tinción Gram) A) morfología bacilar, B) Forma de “U”, C) Forma anillada, D) morfología Cocoide.

Efecto del cloro en las diferentes morfologías de la bacteria *V. cholerae*.

El objetivo principal de la desinfección de los suministros públicos de agua es prevenir la propagación de enfermedades transmitidas por el agua. El cloro es usado en forma de cloro libre o como hipoclorito. En cualquiera de las dos formas actúa como un potente agente oxidante y a menudo se disipa en reacciones secundarias tan rápidamente que se realiza poca desinfección hasta que se han añadido cantidades superiores a la demanda de cloro. Es por ello que para cualquier experimento de desinfección o inactivación de microorganismos es necesario determinar la demanda (consumo) de cloro en una solución, en éste caso en las suspensiones bacterianas usadas a partir de las tres diferentes morfologías de la bacteria, es importante decir que se controlaron parámetros cruciales como el pH y la temperatura.

Las suspensiones bacterianas utilizadas en las pruebas de inactivación de la presente tesis se trabajaron a un pH de 6.4 para la disolución de 1 mg/L y de 6.14 para la de 0.5 mg/L esto nos indica que el reactivo que está reaccionando es el ácido hipocloroso (HClO), donde HClO es más eficaz en la reacción de desinfectante, afectando la ultraestructura de la bacteria (Calderón, 2010). Se ha demostrado que el ácido hipocloroso tiene un gran efecto antimicrobiano que van de 0.1 a 2.8 mg/L en un periodo de tiempo exposición de 2 min (Wang *et al.*, 2007, citado por Calderón, 2010).

***V. cholerae* morfología bacilar**

Demanda de cloro morfología bacilar

En la Figura 7 se muestra el consumo de cloro en con el tiempo establecido. Para la dosis de 0.5 mg/L se tiene un cloro residual de 0.48 mg/L a los 3 min y teniendo al final una concentración de 0.32 mg/L con un tiempo de 20 min. Con respecto a la dosis de 1.0 mg/L al inicio se obtuvo un residual de 0.63 mg/L con un tiempo de 3.5 min y al final se tuvo una concentración de 0.4 mg/L con un tiempo de 30 min. Estas concentraciones de cloro residual están dentro del rango de 0.2 a 1.5 mg/L de cloro residual establecido por la NOM-127-SSA1-1994. Comparando la Figura 7 con el porcentaje de inactivación de bacilar se puede observar que a partir de la disolución de cloro de 1.0 mg/L la inactivación es más eficiente. Por lo tanto, si se quiere tener una desinfección más eficiente con un tiempo prolongado se debe de agregar una mayor cantidad de cloro para así tener un cloro residual conforme a la NOM-127-SSA1-1994. Aunque una sobredosis de cloro permitirá obtener una desinfección correcta del agua, como consecuencia de ello, aparecerán subproductos de desinfección, es por eso que se deben dosificar únicamente las concentraciones necesarias de desinfectante (cloro) en el agua (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

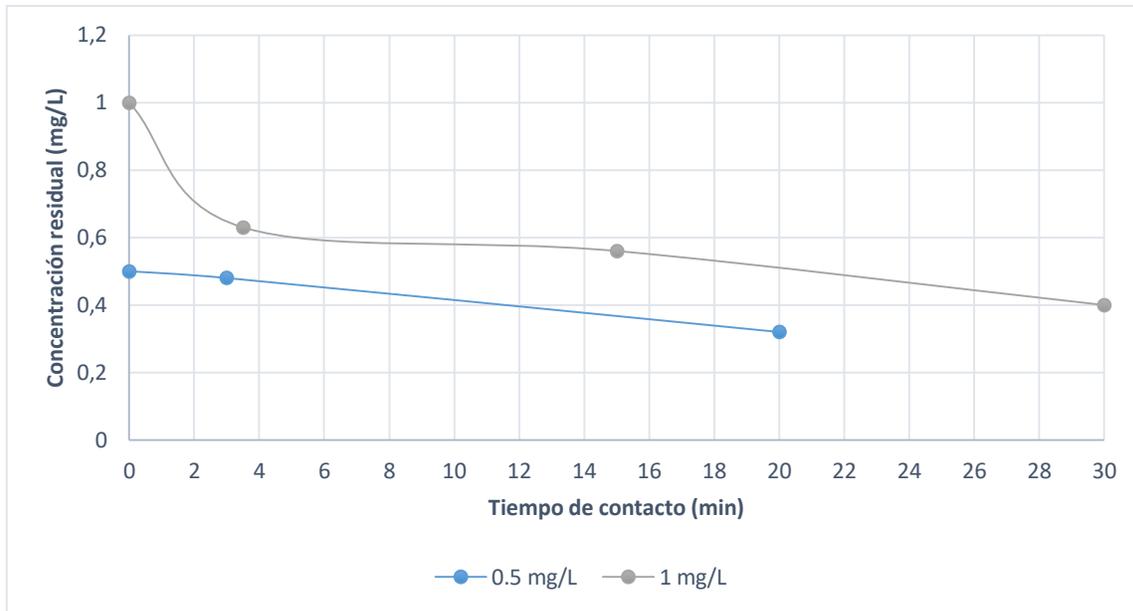


Figura 7 Demanda de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología bacilar

La Tabla 3 muestra que, a mayores concentraciones de cloro (1.0 mg/L) hay un mayor consumo del mismo (0.63 mg/L) y una cantidad residual de 0.40 mg/L y a menor concentraciones de cloro inicial (0.5 mg/L) el consumo de cloro inicial es menor (0.48 mg/L) y un cloro residual de 0.40 mg/L. Por lo tanto, si queremos tener un residual conforme a la normatividad mexicana (NOM-127-SSA1-1994) que establece intervalos de 0.2 mg/L a 1.5 mg/L en un tiempo prolongado se debe agregar una dosis de cloro inicial alta (Atengueño, 2018). Las concentraciones aplicadas en el presente estudio están dentro de la norma y se tiene un porcentaje de inhibición de hasta un 99.9992% por lo tanto el cloro tiene una alta eficacia de desinfección para *V. cholerae* en morfología bacilar.

Tabla 3. Demanda de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología bacilar cultivada en APA 1%

COLORO INICIAL (mg/L)	CONSUMO INICIAL (mg/L)	RESIDUAL (mg/L)
0.5	0.48	0.32
1.0	0.63	0.40

Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *V. cholerae* morfología bacilar

En la Figura 8 se muestra las micrografías de la bacteria *V. cholerae* en morfología bacilar, las cuales representan el efecto que ocasionó el cloro a nivel celular.

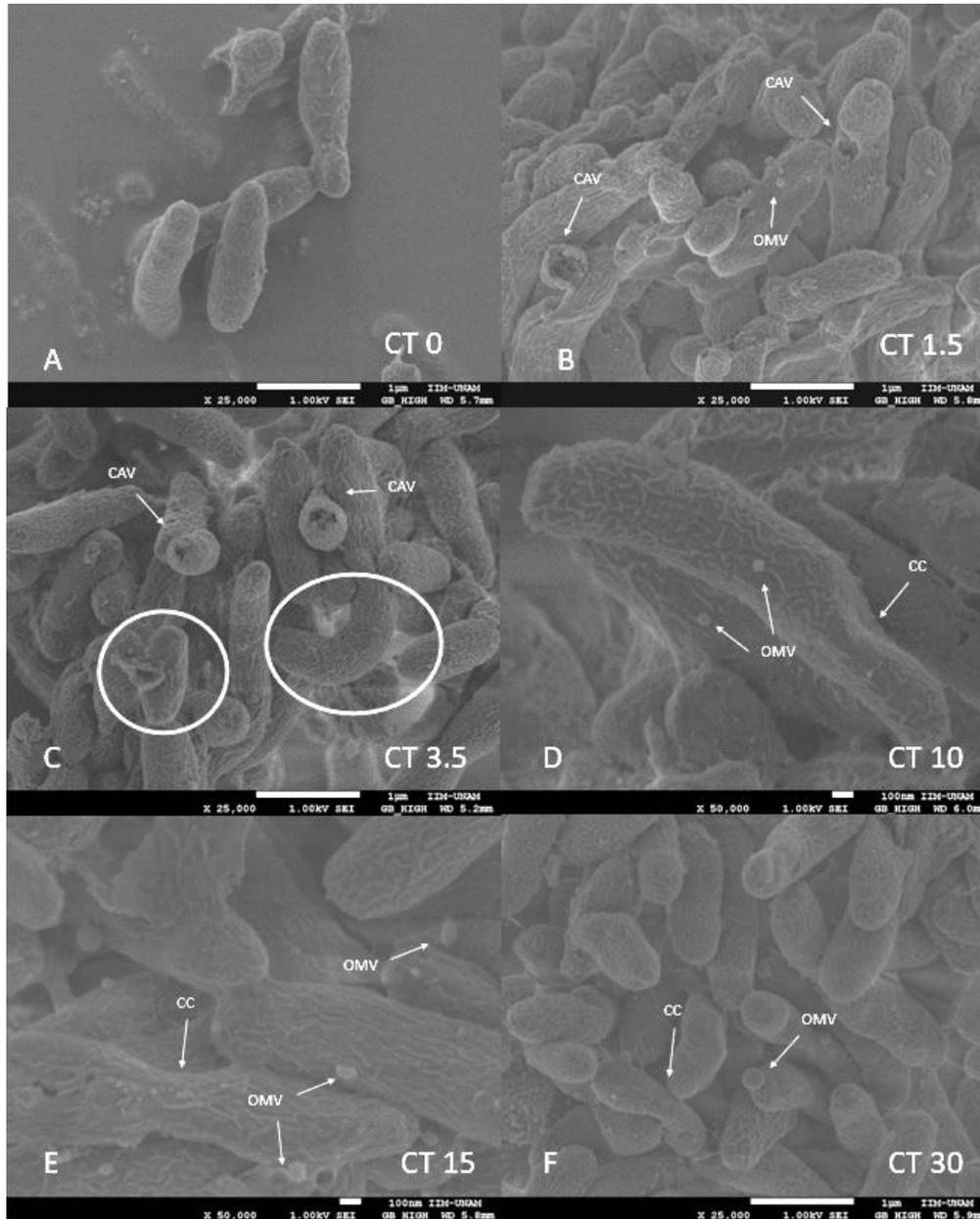


Figura 8 Daño en la ultraestructural en *V. cholerae*, morfología bacilar con cloro, con diferentes tiempos de contacto. OMV: vesículas de membrana externa; CAV: cavidad; CC colapsos celulares, en círculo achatamientos de la célula.

En la Figura 8 micrografía A se representa a la bacteria *V. cholerae* en su morfología bacilar antes del proceso de cloración (CT 0), se observan células intactas incluso en proceso de división celular. En las micrografías B a la F se puede ver el efecto del daño ultraestructural del cloro en la bacteria. Específicamente en la micrografía B se pueden observar cavidades (CAV) y presencia de vesículas de la membrana externa (OMV por sus siglas en inglés), lo que representa fuga de material celular, en micrografía C se observan cavidades de mayor tamaño, con un círculo se marcan bacterias curvadas, esto puede deberse a un probable cambio morfológico a cocoide, ya que se ha demostrado que el cloro puede inducir a la bacteria a otras morfologías (Chaiyanan et. al., 2001). En las micrografías D a la G se pueden ver OMVs y colapsos celulares (CC). Se observa que a mayor tiempo de contacto hay mayor daño ultraestructural en la bacteria y un porcentaje alto de inactivación (hasta 99.999%).

Las OMVs son estructuras membranosas de dos capas esféricas que varían de tamaño de 20 a 300 nm y que durante el crecimiento de bacterias Gram-negativas liberan partes de su membrana externa en forma de vesículas, vesículas de membrana externa, esto puede ser como respuesta de estrés. La regulación de la composición y formación de la vesícula implica que las OMVs puede servir a un propósito que incluyen la promoción de la supervivencia bacteriana, la comunicación bacteriana, el suministro de toxinas y los factores de virulencia, la modulación de la respuesta inmune del huésped y la transferencia de material genético (McBroom y Kuehn, 2007 y Parker y Kennan, 2012). Román (2013) reporto cavidades para *H. pylori* en VBC con desinfección con ozono. Diao *et al.*, (2004) mencionan que el cloro se difunde a través de las paredes celulares, produce una disfunción en los grupos de enzimas internas y, por lo tanto, inactiva las células. También se ha informado que el cloro puede reaccionar con los materiales de la pared celular. Por ejemplo, el cloro podría oxidar los grupos amino N-terminales de proteínas dentro de la pared celular, lo que alteraría la resistencia de la pared y, por lo tanto, destruiría las células.

Inactivación de la bacteria *V. cholerae* en morfología bacilar

Los resultados de la inactivación de la bacteria *V. cholerae* en su morfología bacilar se presentan en la Tabla 4. A partir del método de cuantificación de filtro de membrana se obtuvieron los porcentajes de inactivación, se muestra claramente la disminución del número de UFC/100mL conforme se incrementa el tiempo de contacto. Se puede observar que desde un CT de 1.5 los porcentajes de inactivación superar el 99%. De acuerdo a los resultados, es posible determinar que aplicando un CT de 10 se logra un porcentaje de inactivación de 99.9990%, lo que corresponde a la disminución de 5 unidades logarítmicas. Aplicando CT superiores (15 y 30) se observó que no hubo incremento significativo en los porcentajes de inactivación. Los resultados concuerdan con lo que se demostró por Sousa *et al.*, (2001), quienes reportan que con una concentración superior a los 7 mg/L con un tiempo de 5 min obtuvieron una desinfección del 100%.

Tabla 4. Porcentaje de inactivación de *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar

CT	NO. DE COLONIAS				PROMEDIO	UFC/100mL	LOG INACTIVACIÓN N ₀ /N	% DE INACTIVACIÓN
	A1	A2	A3	A4				
0	55	49	54		52.66	526666.67	0	0
1.5	31	32	10	81	38.5	38.5	4.136	99.9926
3.5	8	5	7	6	6.5	6.5	4.909	99.9987
10	4	3	4	10	5.25	5.25	5.001	99.9990
15	2	4	5	2	3.25	3.25	5.210	99.9993
30	4	4	5	3	4	4	5.119	99.9992

V. cholerae morfología rugosa, cultivada en APA 1%

Demanda de cloro morfología rugosa (APA 1%)

En la Figura 9 se observa el consumo de cloro respecto al tiempo establecido. Para la dosis de 0.5 se tiene un cloro residual de 0.38 mg/L con un tiempo de 3 min y al final se tuvo una concentración de 0.33 mg/L a los 20 min. En lo que respecta a la dosis de 1mg/L de la solución de cloro en el principio se tuvo un cloro residual de 0.78 mg/L en un tiempo de 3.5 min y teniendo al final una concentración de 0.42 mg/L en un tiempo de 30 min. Estas concentraciones se encuentran dentro de la NOM-127-SSA1-1994. Así que si se quiere tener una concentración dentro de la NOM-127-SSA1-1994 con un tiempo prolongado se debe de tener una mayor concentración, ya que los porcentajes de inactivación para *V. cholerae* en morfología al tener biopelícula tiene una mayor resistencia al cloro (Lendón *et al.*, 2014).

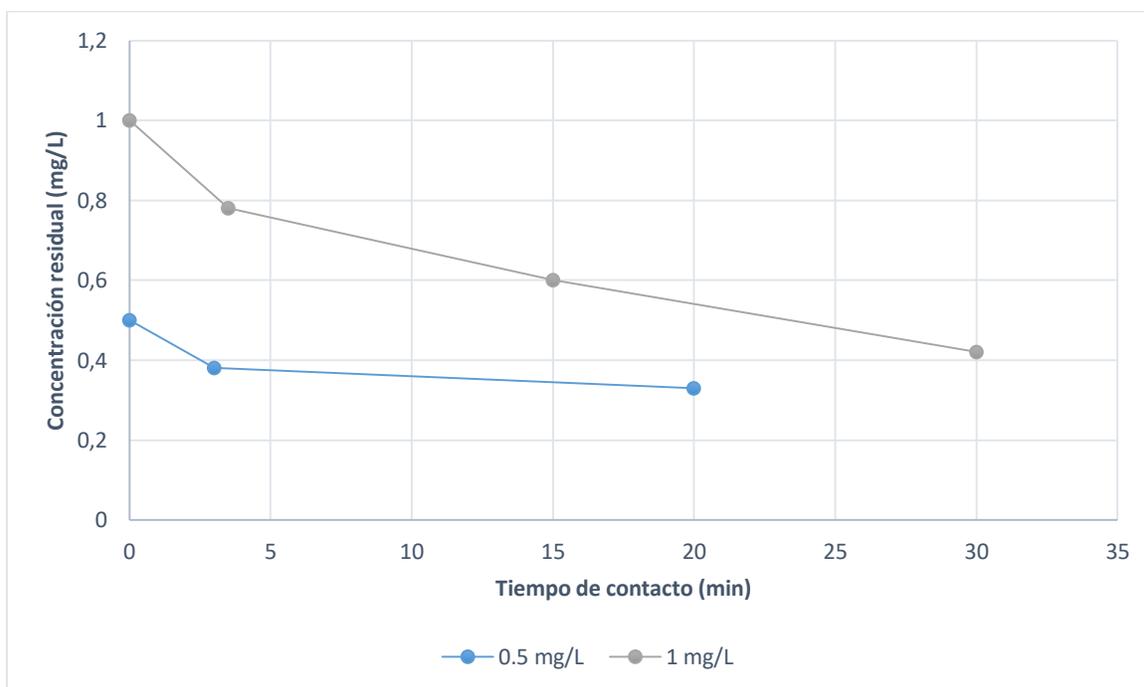


Figura 9 Consumo de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 1%

En la Tabla 5 se puede observar el consumo del cloro en una suspensión bacteriana de *V. cholerae* morfología rugosa cultivada en APA 1%. Para la dosis de cloro inicial de 1.0 mg/L se tiene un consumo de 0.78 mg/L y un cloro residual de 0.42 mg/L. En comparación con la dosis inicial de 0.5 mg/L que tiene un consumo inicial de 0.38 mg/L y un cloro residual de 0.33 mg/L.

Tabla 5. Demanda de cloro en na suspensión de *V. cholerae* morfología rugosa cultivada en APA 1%

COLORO INICIAL (mg/L)	CONSUMO INICIAL (mg/L)	RESIDUAL (mg/L)
0.5	0.38	0.33
1.0	0.78	0.42

Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa cultivada en APA 1%

Las micrografías obtenidas a partir de la aplicación del cloro en la bacteria *V. cholerae* en morfología rugosa cultivada en APA 1% se presentan en la Figura 10. Se muestra la imagen (micrografía A) de la bacteria en su morfología rugosa sin ningún tratamiento, lo que corresponde a un CT 0 y no se observan daño en las células, aunque a diferencia de la morfología bacilar las células se observan con una superficie más lisa y son más alargadas, esto quiere decir que además de cambiar su morfología colonial también hay un cambio en la morfología celular. En comparación con la morfología bacilar, la morfología rugosa no muestra estrías en la ultraestructura, esto se debe probablemente a la elevada excreción de exopolisacáridos que le ayudan a formar biopelícula. A partir de la micrografía B a la F se puede observar el daño ultraestructural debido a la exposición al cloro. Aunque no se observan daños severos, tales como cavidades, en la micrografía B (CT 1.5) se pueden observar algunas OMV, lo que ya representa fuga de material celular y por lo tanto aparente daño en la membrana. La micrografía C que corresponde a un CT 3.5 presenta bacterias con morfología cocoide, esto es un

probable cambio morfológico como adaptación al medio tal y como lo reporta Chaiyanan et. al., 2001; quienes demostraron que células cocoides de *V. cholerae* expuesta a cloro, no solo conservan viabilidad hasta un año, sino que persisten los genes asociados con la patogenicidad junto con la integridad cromosómica. Ésta particularidad también se puede apreciar en las micrografías D a la F, donde se observan bacterias con morfología cocoide y OMV, lo cual puede deberse a un mecanismo de adaptación al cloro. Los resultados concuerdan con lo reportado por Rice *et al.*, (1992), quienes mencionan que la morfología rugosa exhibe una mayor resistencia a la cloración y que además retuvo la virulencia, aunque no fue evidenciado visualmente a nivel celular.

A las vesículas de la membrana externa (OMV) se les atribuyen numerosas funciones biológicas como la liberación de toxinas, la modulación del sistema inmune, el transporte de moléculas de señalización entre células bacterianas y la formación de la biopelícula. Al respecto, Portas 2015 reporta la presencia de OMV en bacterias patógenas Gram negativas al momento de secretar factores de virulencia, lo que mejorarán su supervivencia. En las micrografías B y D pueden visualizarse estas OMV lo que de acuerdo con Portas 2015, podría ser un mecanismo de adaptación a la exposición al cloro. Varios factores, como la presión antibiótica, la temperatura alta / baja, la inanición, la cloración, el cambio en el pH y el estrés por oxígeno pueden inducir el estado de VNC de cualquier bacteria (Ramammyrthy *et al.*, 2014).

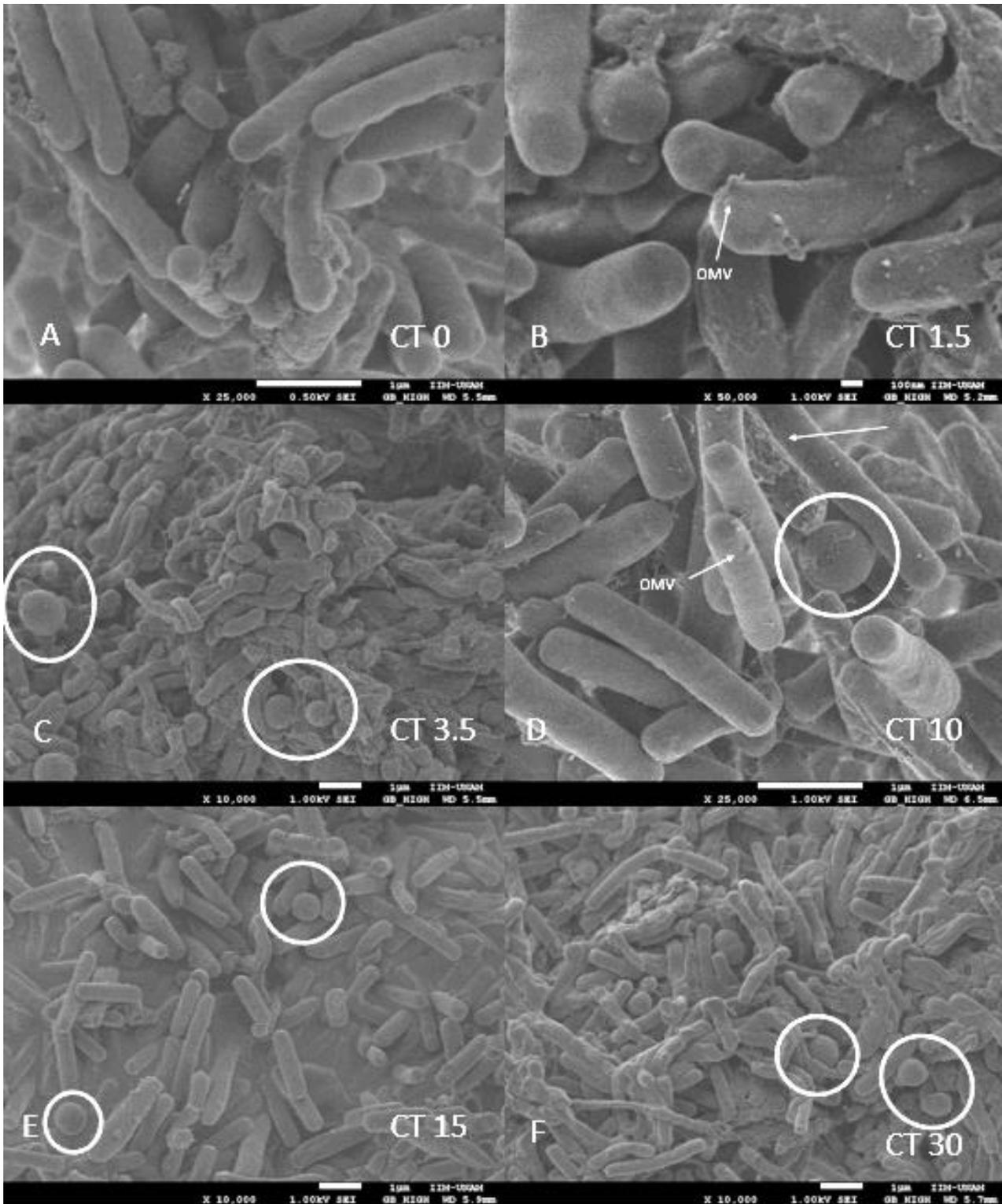


Figura 10. Daño en la ultraestructura en la bacteria *V. cholerae* en morfología rugosa, cultivada en APA 1%, con diferentes tiempos de contacto. OMV: vesicular de membrana externa; en círculo bacterias en morfología coccoid.

Inactivación de la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 1%

Para la morfología rugosa cultivada en APA 1% se determinaron los porcentajes de inactivación por el método de cuantificación, los cuales se muestran en la Tabla 6. Los porcentajes de inactivación van en aumento, de 88.5714% a 92.8571%, mientras aumenta el CT. Los porcentajes de inactivación de ésta morfología en comparación con la morfología bacilar son menores, respecto a ello se ha publicado que la morfología rugosa es un fenotipo altamente resistente a agentes como el cloro, el peróxido de hidrogeno y otras condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Ledón *et al.*, 2014). Por la protección que le proporciona la biopelícula a la bacteria, con la aplicación de cloro no se logran porcentajes altos de inactivación, de tal forma que es necesaria la exposición a concentraciones mayores de cloro tal y como lo han demostrado diversos autores (Orta de Ledesma *et al.*, 1996; Shikongo-Nambabi *et al.*, 2010; Ledón *et al.*, 2014).

Tabla 6. Porcentaje de inactivación de *Vibrio cholerae* en morfología rugosa, cultivada en APA 1%

CT	NO. DE COLONIAS				PROMEDIO	UFC/100mL	LOG INACTIVACIÓN No/N	% DE INACTIVACIÓN
	A1	A2	A3	A4				
0	7	8	6		7	700000	0	0
1.5	7	9	7	9	8	80000	0.942	88.5714
3.5	4	7	6	6	5.75	57500	1.085	91.7857
10	8	7	6	5	6.5	65000	1.032	90.7142
15	7	7	6	6	6.5	65000	1.032	90.7142
30	4	2	7	7	5	50000	1.146	92.8571

V. cholerae morfología rugosa, cultivada en APA 2%

Demanda de cloro morfología rugosa cultivada en APA 2%

La Figura 11 muestra el consumo del cloro de *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2%. Para una concentración de 1 mg/L inicialmente se consumieron 0.79 mg/L a los 3.5 min manteniéndose un residual de cloro de 0.58 mg/L hasta por un tiempo de 30 min. Para la concentración de cloro de 0.5 mg/L el

consumo de cloro inicialmente fue 0.46 conservando un cloro residual de 0.44 mg/L. Estos datos indican que los residuales para éstas condiciones experimentales cumplen con la NOM-127-SSA1-1994.

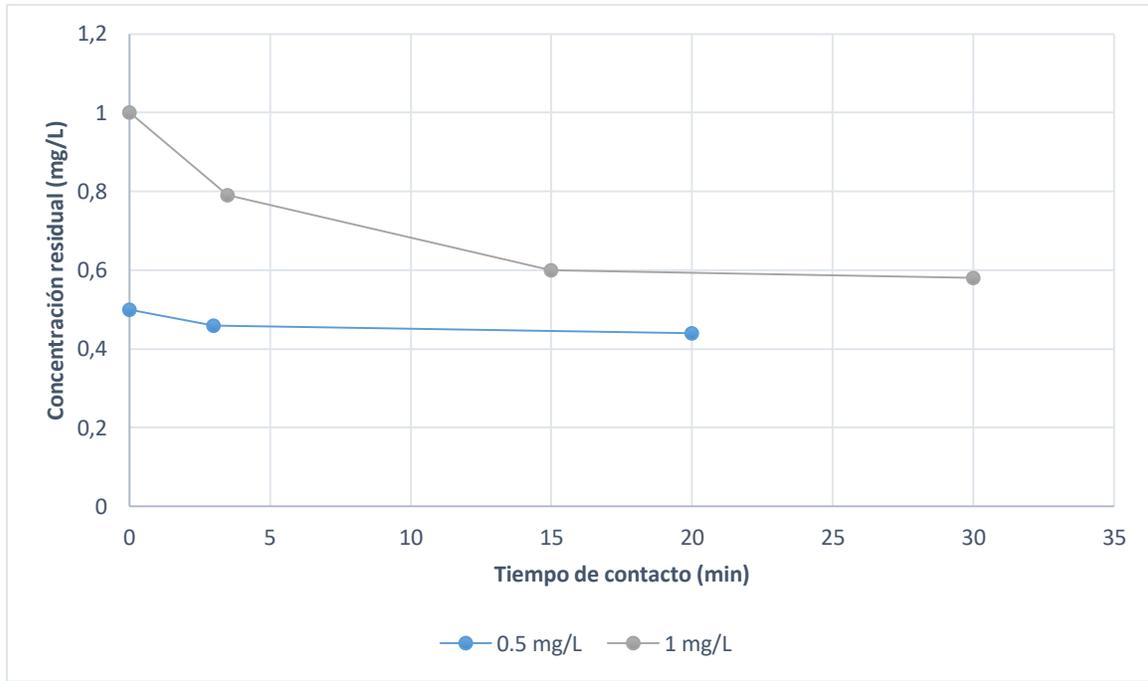


Figura 11 Consumo de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2%

Se puede observar en la Tabla 7, que al aplicar una concentración de cloro de 1 mg/L, se tiene un consumo mayor, 0.79 mg/L, en los primeros minutos; en comparación con la concentración de 0.5 mg/L donde el consumo fue menor 0.46 mg/L. Conforme a lo anterior, se puede decir que si se quiere conseguir un residual de cloro conforme a la NOM-127-SSA1-1994 en un tiempo mayor, es necesario aplicar una mayor concentración.

A pesar de que la morfología rugosa cultivada en APA 2% tiene menor consumo de cloro que rugosa cultivada en 1%, se logran mayores porcentajes de inactivación (hasta un 99.99%) para dicha condición. Esto puede deberse a que la biopelícula de la morfología rugosa cultivada en APA 2% es probablemente menos resistente ya que su medio de crecimiento es menos estresante al estar en condiciones más parecidas al ambiente natural.

Tabla 7 Demanda de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología rugosa cultivada en APA 2%

COLORO INICIAL (mg/L)	CONSUMO INICIAL (mg/L)	RESIDUAL (mg/L)
0.5	0.46	0.44
1.0	0.79	0.58

Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa cultivada en APA 2%

La Figura 12 muestra las micrografías de la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2%. En la micrografía A se muestra la bacteria morfología rugosa cultivada en APA 2% sin desinfección con cloro, y como se dijo anteriormente se observan células sin daño. Posteriormente, las micrografías B a la F, muestran el efecto del cloro conforme a los CT estudiados. En la micrografía B se pueden observar OMV, lo que indica fuga de material celular. Para la micrografía C, marcada en un círculo, se puede ver el encorvamiento de bacteria, esto puede ser indicio de inducción a morfología cocoide, también se logran visualizar algunas fibrillas de adhesión, indicativo de formación de biopelícula. En la micrografía D se puede ver una bacteria con morfología cocoide y célula deformada. Asimismo, para los CT 15 y 30 se observan OMV y fibrillas. Se puede observar un mayor daño en la ultraestructura de la morfología rugosa cultivada en APA 2% en comparación a rugosa cultivada en APA 1. Asimismo, micrografías de la bacteria que fue cultivada en APA 1% muestran mayor cantidad de células con morfología cocoide en comparación con las cultivadas en APA 2%. Esto indica que, al tener pocos nutrientes y presencia de cloro, las bacterias, como mecanismo de resistencia se indujeron a morfología cocoide. Estudios anteriores han demostrado que la transformación a morfología cocoide podría brindar una ventaja selectiva que permite una supervivencia prolongada en el ambiente acuático con bajas concentraciones de nutrientes (Krebs and Taylor, 2011).

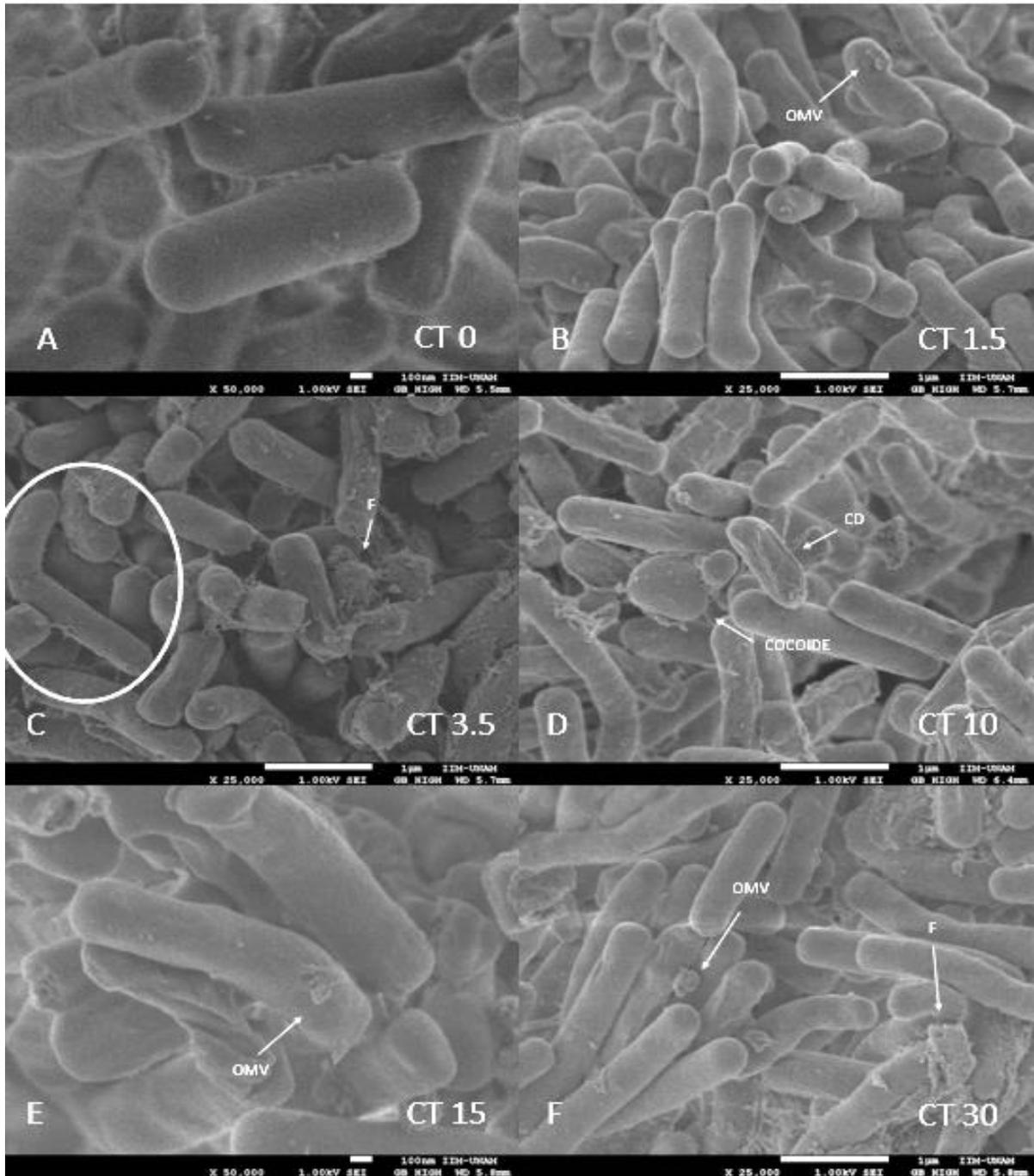


Figura 12 Daño por el cloro en la ultraestructura en la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2% con diferentes tiempos de contacto. OMV: vesículas de membrana externa; CD célula deformada, F: fibrillas; en círculo cambios en la morfología

Inactivación de la bacteria *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2%

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los porcentajes de inactivación para la morfología rugosa de *V. cholerae* cultivada en APA 2%. Los porcentajes de inactivación se fueron incrementándose de 90.31 a 99.99% conforme van aumentando los CT. El mayor porcentaje de inactivación logrado fue del 99.996% aplicando un CT de 15 lo que corresponde a la disminución de 4.4 unidades logarítmicas.

Tabla 8. Porcentaje de inactivación de *V. cholerae* morfología rugosa, cultivada en APA 2%

CT	NO. DE COLONIAS				PROMEDIO	UFC/100mL	LOG INACTIVACIÓN N ₀ /N	% DE INACTIVACIÓN
	A1	A2	A3	A4				
0	8	9	7		8	80000	0	0
1.5	9	7	6	9	7.75	7750	1.014	90.31
3.5	6	5	8	5	6	6000	1.125	92.50
10	2	8	5	4	4.75	475	2.226	99.41
15	2	4	4	1	2.75	2.75	4.464	99.996
30	1	1	2	7	2.75	2.75	4.464	99.996

No obstante, y aunque se obtuvieron porcentajes de inactivación hasta del 99.996% para ésta condición de análisis, los porcentajes de inactivación de hasta el 92.8% para la morfología rugosa cultivada al 1% indicaría que ésta morfología bajo condiciones de estrés puede adquirir resistencia para persistir en el ambiente acuático. Las cepas rugosas al estar presentes en un sistema de agua podrían ser resistentes a la desinfección con cloro ya que puede simplemente disminuir el número de *V. cholerae* pero no erradicarse totalmente. Lo que podría explicar la emergencia de pandemias de cólera, esto fundamentado en el hecho de que el fenotipo rugoso de *V. cholerae* representa una forma de supervivencia completamente virulenta que puede persistir en el ambiente natural al usar su capacidad para formar biopelícula (Wai *et al.*, 1998).

V. cholerae en morfología cocoide.

Demanda de cloro morfología cocoide

El cloro es un importante desinfectante para el agua potable, es el más utilizado por sus bajos costos y porque conserva en el agua un efecto residual que permite que permanezca desinfectada. Sin embargo, para asegurar la desinfección es necesario determinar la demanda de cloro de acuerdo a la calidad del agua o en el caso particular de ésta tesis, de acuerdo a las condiciones de análisis. Particularmente si se está evaluando la eficacia del cloro para la inactivación de bacterias resistentes. La Figura 13 muestra el consumo de cloro en una suspensión bacteriana de *V. cholerae* en su morfología de resistencia cocoide. Para la concentración de 1 mg/L se determinó un consumo inicial de 0.93 mg/L en un tiempo de 3.5 min y se conservó un residual de 0.4 mg/L. Asimismo para la concentración inicial de cloro se determinó un consumo de 0.45 con una concentración residual de 0.35 mg/L. Estas cantidades de cloro residual están dentro de lo estipulado por la NOM-127-SSA1-1994 (2000) que establece un rango de cloro residual de 0.2 a 2 mg/L, con lo que se asegura que la aplicación de las concentraciones y tiempos de contacto son las adecuadas para un proceso de desinfección.

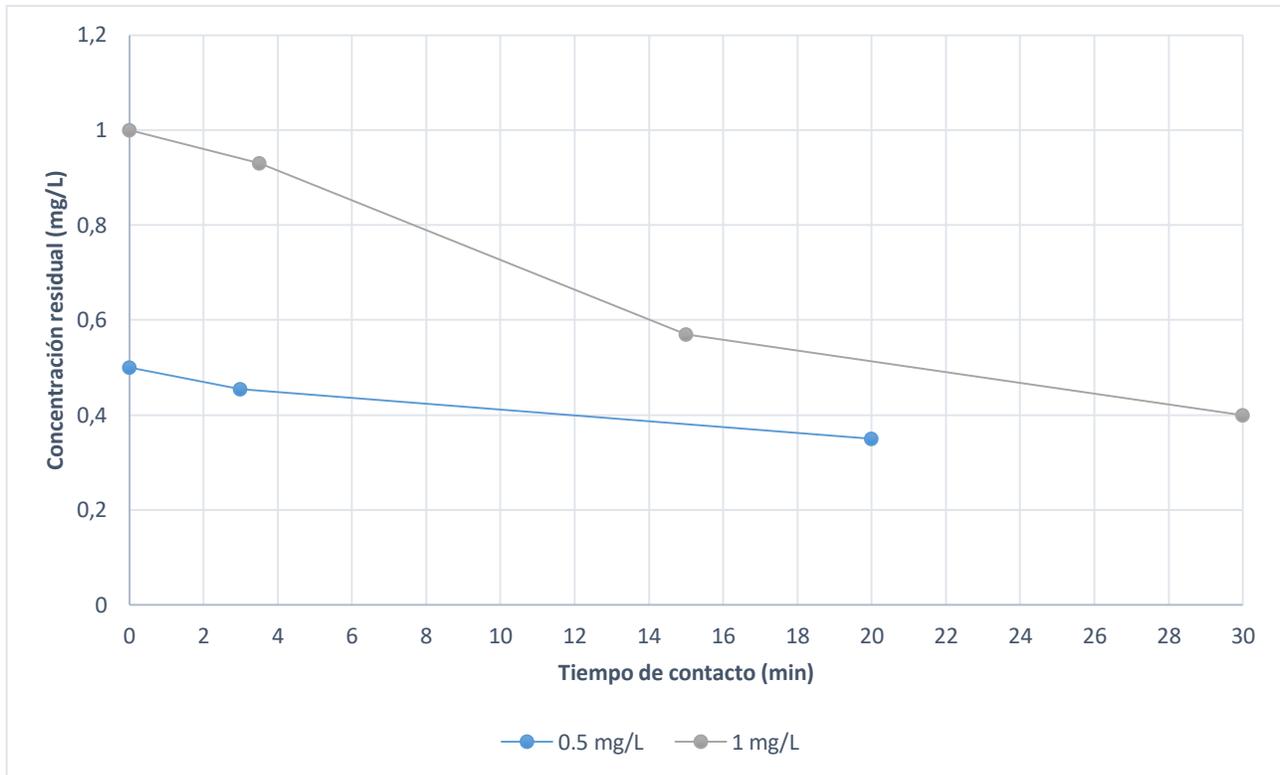


Figura 13 Consumo de cloro en una suspensión de *V. cholerae* morfología cocoide

Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *V. cholerae* morfología cocoide.

El estado viable pero no cultivable (VNC) es una estrategia de supervivencia única adoptada por muchas bacterias en respuesta a condiciones ambientales adversas como estrategia adaptativa hecha por las bacterias para enfrentar las condiciones estresantes (Ramammyrthy *et al.*, 2014). Dicho estado se indujo a nivel laboratorio después de someter a la bacteria a estrés fisiológico, se sometieron a un proceso de desinfección con cloro y se determinó su efecto a nivel celular. En la Figura 14 se muestra las micrografías obtenidas después del proceso de cloración bajo diferentes condiciones de concentración y tiempo de contacto (CT). En la micrografía A se observa la bacteria en su morfología cocoide sin tratamiento, lo que corresponde a un CT 0, se observan células cocoides y células bacilares, no obstante, se aseguró que el mayor porcentaje (>90%) de células hubieran cambiado su morfología a cocoide. De la micrografía B a la F se muestran las bacterias con sus respectivos CT. Con un CT de 1.5, se observa la deformación de la célula,

aunque no se encontró daño en la membrana. Aplicando un CT de 3.5 se observó una cavidad como parte del daño estructural, así como OMV. Con un valor CT de 15 la célula cocoide presenta hundimiento total y cavidades, también se observan OMV como parte del material celular liberado del citoplasma. Esto es más evidente cuando se aplicó un CT de 30, el grupo de cocos en la imagen presenta contenido celular que fue expulsado de la bacteria, así como cavidades y OMV. No obstante, aunque se observa fuga de material celular no se observa la destrucción total de las células. Al respecto, algunos autores muestran que, aunque las bajas concentraciones residuales de cloro (0.05-0.2 mg/L) no son suficientes para causar daño a las bacterias, pueden disminuir ciertas expresiones genéticas en estos organismos (Lin et al., 2016). Sin embargo, Chaiyanan et. al., 2001, reporta que *V. cholerae* VNC 01 y 0139 sometidas a cloración no sólo conservan su viabilidad hasta un año, sino que los genes asociados a la patogenicidad se conservan, junto con la integridad cromosómica. Lo cual quiere decir que, bajo las condiciones estudiadas, el cloro puede no ser eficaz para inactivar totalmente a la bacteria en su morfología cocoide.

En relación a ello, se ha demostrado que, con otros desinfectantes, como el ozono, la mayoría de las células mantienen su forma intacta, pero con vesículas en la superficie, lo que indica permeabilidad de la membrana (Zhang, 2011).

Orta *et al.*, (2017) ha reportado las fibrillas de adhesión como resultados de estrés oxidativo en la bacteria *Helicobacter pylori* expuesta a concentraciones de cloro y ozono, estas fibrillas de adhesión son producidas por la bacteria adherirse a la superficie o conectar con otras células para lograr agrupaciones. Asimismo, se observan cavidades en las bacterias por efecto oxidante del cloro.

A pesar de entrar dentro de los rangos de la NOM-127-SSA1-1994 de cloro residual no se tienen daños ultraestructurales por el mecanismo resistencia que tiene la bacteria. Por lo tanto, si la bacteria en estado VNC está presente sistemas hídricos aun posterior a la desinfección y no se tiene ningún daño, surge la necesidad de realizar un tratamiento más efectivo para la inhibición de este agente patógeno en las redes de distribución de agua (Román, 2013).

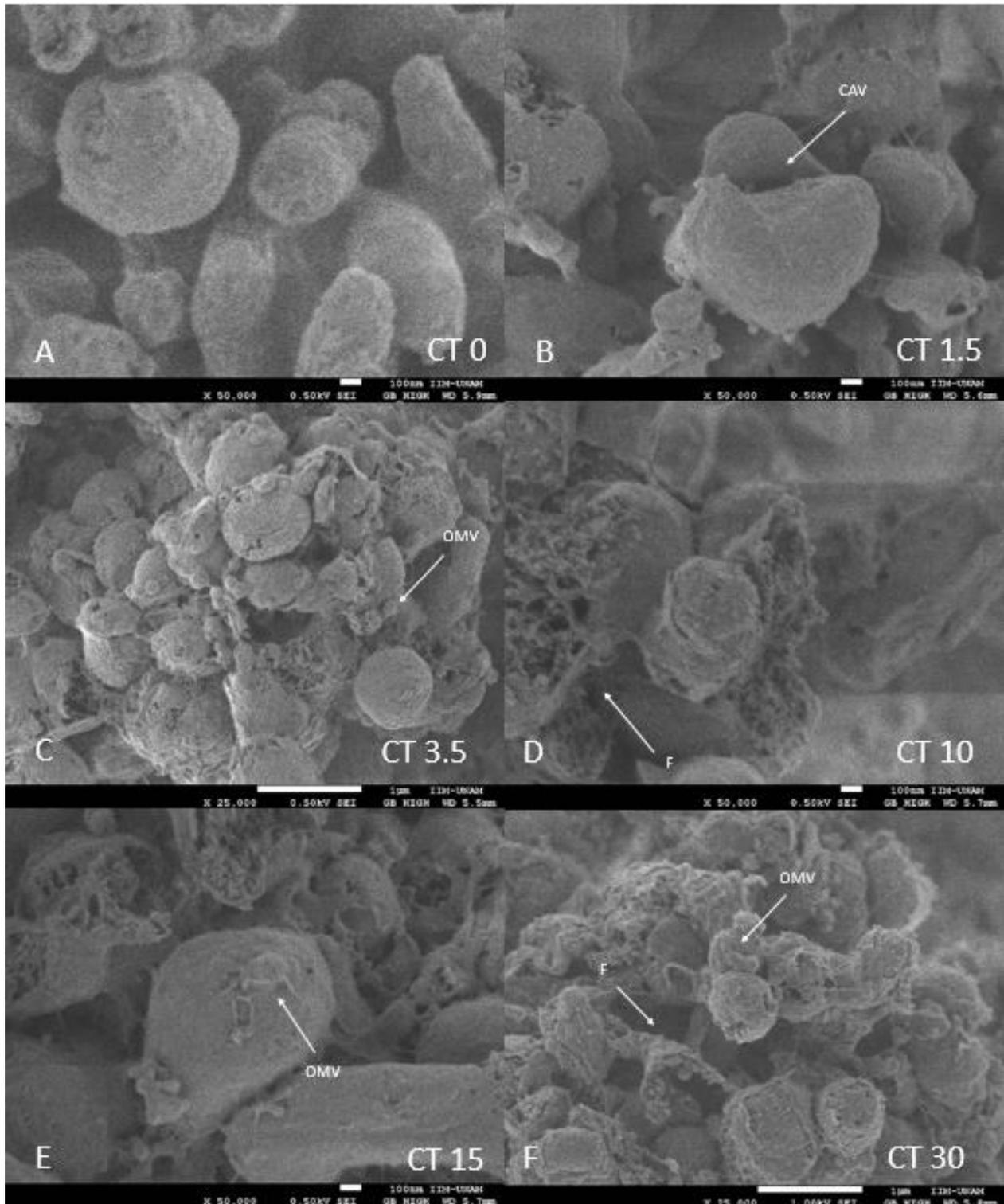


Figura 14 Efecto del cloro en la ultraestructura de *V. cholerae* morfología cocoide con diferentes tiempos de contacto. OMV: vesículas de membrana externa; F: fibrillas; CAV: cavidad

Inactivación de la bacteria *V. cholerae* morfología cocoide.

Para las morfologías bacilar y rugosa de la bacteria los porcentajes de inactivación se determinaron a partir de la cuantificación de colonias en medio de cultivo usando la técnica de filtro de membrana. Los cambios asociados con la transformación cocoide representan una respuesta típica en *V. cholerae* y puede constituir una estrategia de supervivencia para condiciones ambientales adversas, lo que limita su aislamiento y su cultivo (Chaiyanan et. al., 2007). Por lo que en el caso de la morfología cocoide era necesario llevar a cabo metodologías altamente especializadas como la biología molecular, por lo que no fue un objetivo particular de la tesis. No obstante, para complementar la información obtenida mediante las micrografías electrónicas FESEM, se recurrió a los datos generados dentro del proyecto para determinar la inactivación de la bacteria en su forma cocoide. Para ello se usó de 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 (Fittipaldi et al., 2012). Se reportó que para el caso de la desinfección con cloro las pruebas de viabilidad usando qPCR-PMA mostraron que para lograr una reducción de 3.35 log (N0/N) se requiere un valor Ct de 15. Sin embargo, algunos reportes han indicado que células VNC de *V. cholerae* expuesta a cloro, no solo conservan viabilidad hasta un año, sino que persisten los genes asociados con la patogenicidad junto con la integridad cromosómica (Chaiyanan et. al., 2001). Incluso se habla de que la cloración puede inducir el estado VNC de algunas bacterias, tal es el caso de *E. coli* para la cual se ha reportado que 0.5 mg/L de cloro puede reducir efectivamente el desarrollo de la bacteria en medios de cultivo, es decir en estado VC pero que se induce un estado VNC. Otras bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* sometidas a lavado con cloro (hasta 50 y 100 mg/L) adquirieron el estado VNC (Highmorea, 2018). Al respecto, algunos autores concuerdan en que *H. pylori* puede formar biopelícula como respuesta a la exposición al cloro (Moreno et. al., 2007; Giao et al., 2010; Casasola et. al., 2013;

Santiago et, al., 2015 y Orta et. al., 2017). Esto lleva a ahondar en estudios respecto al efecto de los desinfectantes en el material genético de la bacteria, ya que se podría dar un mecanismo de resucitación (Orta et al., 2018).

Conclusiones

- A partir de cultivos de la bacteria *V. cholerae* en su morfología bacilar (habitual) se logró la inducción de sus dos morfologías resistentes. La inducción de la variante rugosa se obtuvo a los 12 días y la morfología cocoide se logró a los 57 días, ambas bajo condiciones de estrés fisiológico (escases de nutrientes y/o baja temperatura) en laboratorio.
- El cloro causa diferentes efectos a nivel celular dependiendo del estado morfológico en el que se encuentre la bacteria. Para las cuatro condiciones estudiadas (bacilar, cocoide, rugosa APA 1% y rugosa APA 2%) se observaron cavidades en las células, sin embargo, fueron más evidentes en la morfología cocoide. Las vesículas de la membrana externa fueron observadas en todos los experimentos indicando fuga de material celular. Sin embargo, debido a que de acuerdo con la bibliografía las formas resistentes de la bacteria conservan su material genético después de procesos de desinfección como el cloro, es preciso ahondar en estudios al respecto.
- Mediante las micrografías electrónicas FESEM, se comprobó la formación de células cocoides en cultivos de la morfología rugosa al ser sometidos a cloración, por lo que el cloro está provocando un cambio morfológico y además un estado viable no cultivable.
- Bajo las mismas condiciones de análisis (CT 15), para la morfología bacilar (habitual) se determinó que el cloro causa una inactivación de hasta 5.2 unidades logarítmicas lo que corresponde al 99.999%. Para la morfología cocoide, se calculó una inactivación de 3.35 log con un porcentaje de 99.996%. Para la morfología rugosa cultivada en APA 1% se inactivaron 1.03 unidades logarítmicas correspondiente a un 90.714%. Un dato relevante que fue encontrado es que para la morfología rugosa cultivada en APA 2% se inactivaron hasta 4.46 unidades logarítmicas con un porcentaje de 99.996% (incluso mayor que la morfología bacilar); lo que indicaría que efectivamente cuando la bacteria se somete a mayor estrés fisiológico crea mayor

resistencia. Es decir, APA 1% tiene menor cantidad de sales que APA 2% y siendo *V. cholerae* una bacteria autóctona de aguas salobres, al someterla a concentraciones bajas de sal crea mayor resistencia en el ambiente y por lo tanto se inactiva menor porcentaje de células.

- De las tres morfologías estudiadas, la morfología rugosa fue la que presentó mayor resistencia a la desinfección con cloro.

Referencias bibliográficas

1. Ali, A., Rashid, M. y Karaolis, D. (2002). High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *American Society for Microbiology*. 68 (11): 5773-5778.
2. Alyamani, A. y Lemine O. (2012) FE-SEM Characterization of Some Nanomaterial, Scanning Electron Microscopy, *Intech* 463-471. <https://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/fe-sem-characterization-of-some-nanomaterials->
3. Amano, Y. y Díaz L. MD, (2015) Introducción a la microscopía electrónica principios y aplicaciones. *Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública*. INSPI. Tercera edición.
4. American Water Works Association (several), (1973). Manual of water supply practices, Water chlorination, Principles and Practices. . 2da Edicion. *American Water Works Association (AWWA)*. USA Recuperado de <http://arco-hvac.ir/wp-content/uploads/2018/04/AWWA-M20-2nd-2006.pdf> (3 de febrero 2019)
5. Arana, I., Santorum, P., Muela, A. y Barcina, I. (1999) Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *Journal of Applied Microbiology*. 88:882-888.
6. Atengueño, K. (2018) Desinfección mediante cloro y ozono para inactivar *V. cholerae* en su estado Viable No Cultivable, utilizando microscopía FESEM para evaluar los daños en la bacteria. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
7. Atengueño, K., Yañez, I. y Orta, M. (2018a) Daños estructurales a la bacteria *Vibrio cholerae* viable no cultivable sometida a procesos de desinfección mediante ozono y cloro. En el Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, del 28 al 31 de octubre del 2018, Guayaquil, Ecuador.
8. Baker, R., Singleton, F. y Hood, M. (1983) Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 46(4): 930–940.

9. Borgner, A., Jouneau, P., Thollet, G., Basset, D. y Gauthier, C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. *Micron*. 38: 390-401.
10. Burleson, G., Murray, T. y Pollard, M., (1974). Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *American Society for Microbiology*. 29(3): 340-344
11. Calderón, J. (2010) Acido hipocloroso “Una nueva desinfección en atisepsia y desinfección desarrollada en Colombia”. *Laboratorio actual*. 42: 27-31.
12. Camper, A. y McFeters G. (1979). Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(3): 633-641.
13. Cano, A. (2014). Tratamiento de efluentes residuales municipales, mediante oxidación electroquímica para su desinfección empleando una configuración de electrodos del tipo DDB- FE, DDB-DDB”. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México.
14. Casasola, 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. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
15. 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> (13 de febrero 2019)
16. Chatterjee, S. y Das, J. (1967) Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-wall Material by *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 49: 1-11
17. Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T. y Colwell, R. (2001) Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Systematic and Applied Microbiology* 24(3), 331-341.
18. CONAGUA (1991) Determinación de cloro residual. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Recuperado de <https://www.ircwash.org/sites/default/files/245.11-91AD-9089.pdf> (20 de octubre de 2018).

19. CONAVE (2016) Situación epidemiológica de cólera. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225120/AE_Colera_191016.pdf (13 de febrero de 2019).
20. Corral-Lugo, A. Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras y Muñoz-Rojas, J. (2012) Cuantificación de bacterias mediante el método de “Goteo en placa por sellado (o estampado) masivo” *Revista Colombiana de Biotecnología* (12)2: 147-156.
21. Diao, H. Li, X., Gu, J., Sho, H. y Xie, Z. (2004) Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochemistry*. 39(11): 1421-1426.
22. Diomedi, A., Chacon, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G. Tinoco, J. y Cifuentes, M. (2017) Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista Chilena Infectología*. 14(2): 156-174.
23. EPA (1999) Folleto informativo de tecnología de aguas residuales Desinfección con luz ultravioleta. Estados Unidos. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/cs-99-064.pdf> (11 noviembre 2018)
24. Farfán, S. (2002) Estudio de la estructura genética de poblaciones de *V. cholerae* Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, España.
25. Fernández-Delgado, M., García-Amado, M., Contreras, M., Incani, R., Chirinos, H., Rojas, H. y Suárez, P. (2015). Survival, induction and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the southern caribbean sea. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57(1): 21-26
26. Franco-Mosreal, J., Lara-Zaragoza, B., Villa-Ruano, N., Mota-Magaña, L., Serralta-Peraza, L., Cuevas-Albarrán, Valeria y Sosa-Castilla F. (2014) Especia de importancia clínica del genero *Vibrio* en alimentos marinos de

- origen animal de establecimientos de Puerto Ángel, Oaxaca, México. *Ciencias y Mar* 20(52): 3-30. <http://www.umar.mx/revistas/52/5200101.pdf>
27. García, J., Cortés, J. y Córdova M. (2002) Evaluación de compuestos desinfectantes en la eliminación de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* presentes en agua. *AIDIS*. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Recuperado de <http://studyres.es/doc/1232996/evaluaci%C3%B3n-de-compuestos-desinfectantes-en-la?page=2> (26 de septiembre de 2018).
28. García-Lozano, M., Almodóvar, M., Rivero, A. y Torre- Cisneros, T. Cólera (2010) y otras infecciones del género *Vibrio*. *Medicine*, 10(52): 3489-3496.
29. Gómez, L., Jaimes, S. y Montes, J. (2012) Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos frente a *E. coli* y *Salmonella spp*, en la desinfección de lechuga fresca. *Lasallista de Investigación*. 9(2): 122-131
30. González, L., Casanova, M. y Labrador J. (2011) Cólera: historia y actualidad. *Ciencias Médicas* 15(4): 280-294.
31. Grim, C., Mangel, T., Huq, A. y Colwell, R., (2007) Ultrastructure of coccoid but non-culturable *Vibrio cholera*. *Environmental Microbiology* 9(2)393-402.
32. Havrdova, M., Polakova, K., Skopalik, J., Vujtek, M., Mokdad, A., Homolkova, M., Tucek, J., Nebesarova, J. y Zboril, R. (2014) Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) as an approach for nanoparticle detection inside cells. *Micron* 64: 149-156.
33. Herrera, F. y García, R. (2006) Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *BISTUA*. 4(2): 13-19. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90340202>
34. Hoben, H. y Somasegaran, P. (1982) Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium spp*. in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5): 1246-1247.
35. Huebner, W. (1996). "Desinfección de Aguas de Desecho Humano". Seminario, Agua de México: Abril. pp. 29- 35.

36. Ingeniería de Tratamiento y Acontecimiento de Agua (2007). Desinfección y métodos de desinfección del agua. Recuperado de: <http://www.oocities.org/edrochac/sanitaria/desinfeccion5.pdf> (25 de mayo de 2018)
37. Krebs, A. y Taylor R. (2011). Nutrient-dependent, rapid transition of *Vibrio cholerae* to coccoid morphology and expression of the toxin co-regulated pilus in this form. *Microbiology*. 157 (10). 2942-2953.
38. Ledón T., Hernández, D., Marrero K. y Fando, R. (2014) Modelación in vitro del comportamiento ambiental de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139 *Biotecnología Aplicada*. 31: 121-128.
39. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., y Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-20.
40. 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.
41. 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.
42. Morris, J., Sztein, M., Rice, E., Nataro, J., Losonsky, A., Panigrahi, P., Tacket, O. y Johnson J. (1996). *Vibrio cholerae* O1 Can Assume a Chlorine Resistant Rugose Survival Form that Is Virulent for Humans. *The Journal of Infectious Disease* 174(6): 1364-1368.
43. Muñoz, D., Graü de Marín, C., Marval, H. y Martínez, C. (2012) Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*. 22(5): 459-467.
44. Navarro, M. (2007) Determinación de *Escherichia coli* y coliformes totales en agua por el método de filtración por membrana en agar chromocult. *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales*. Recuperado de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E>.

- [+coli+en+Agua+Filtraci%C3%B3n+por+Membrana.pdf/5414795c-370e-48ef-9818-ec54a0f01174](#) (20 de agosto 2018).
45. 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. (modificada el 20 de junio de 2000). Secretaria de Salud. Recuperada de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html> (20 julio de 2018).
46. NOM-181-SSA1-1998, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua, de tipo doméstico. Obtenido en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/181ssa18.html> (20 de julio de 2019)
47. Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43(1): 93-100.
48. OMS (2017) Epidemias mundiales e impacto del cólera. Recuperado de <https://www.who.int/topics/cholera/impact/es/> (1 de diciembre de 2018).
49. OMS (2018) Preguntas más frecuentes e información para los viajeros acerca del cólera. Organización Mundial de la Salud 8 en Recuperado de <http://www.who.int/topics/cholera/faq/es/> (21 de junio de 2018)
50. Organización Panamericana de la Salud (2007). La desinfección del agua. Obtenido en <http://www.bvsde.paho.org/tecapro/documentos/agua/quiaseleccsistdesinf.pdf> (12 de febrero de 2019).
51. Orta de Velásquez, M. T., Díaz P. V., Aparicio, G. (1996) Desinfección de agua potable contaminada con *Vibrio cholerae* adaptada al cloro. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/mexico/02392e14.pdf> (14 de junio de 2018).
52. Orta de Velásquez, M. T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B., Román Román, P. I., (2017a) Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC

- Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental Technology*. 38 (6): 744 – 753
53. Orta de Velasquez, M., Yañez, I., Casasola, B. y Román, P. (2017b) Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental technology*. 38: 744-753.
54. Orta, M., Yañez, I. y Atengueño, K. (2018b). Cinética de desinfección con cloro y ozono para inactivar las formas resistentes de *Vibrio cholerae* en agua. En el Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, del 28 al 31 de octubre del 2018, Guayaquil, Ecuador.
55. Parker, H. y Keenan J. (2012) Composition and function *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. *Microbes and Infection* 14(1): 9-16.
56. Payne, G., Ledón T. y Fando R. (2017) Modelación in vitro del desempeño ambiental de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638. *CENIC Ciencias Biológicas* 48(2). <https://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/articulos/modelaci%C3%B3n-vitro-del-desempe%C3%B1o-ambiental-de-la-cepa-vacunal-vibrio-cholerae-638-vitro>
57. Portas, I. (2015) Implicación de las vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en la Resistencia frente a péptidos antimicrobianos. Tesis de licenciatura. Universitat de les Illes Balears. Recuperado de <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/1717> (19 de enero de 2019)
58. Ramammyrthy, T. Ghosh, A. Pazhani, G. Shinoda, S. (2014) Current perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health* 2, 103.
59. Ravel, J., Knight, I., Monahan, C., Hill, R., y Colwell, R. (1995) Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology* 141: 377-383.
60. Rice, E., Johnson, C., Clark, R., Fox, K., Reasoner, D., Dunnigan, M., Panigrahi, P., Johnson, J. y Morris, J. G. Jr. (1992). Chlorine and survival of —rugose *Vibrio cholerae*. *Lancet* 340:740.

61. Román, P. (2013) Efecto sobre la estructura celular de *Helicobacter pylori* presente en agua por acción de cloro y ozono. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
62. Secretaria de Salud (2012) Manual de procedimiento estandarizados para la vigilancia epidemiológica de cólera. Secretaria de Salud. Distrito Federal, México Recuperado de http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/06_Manual_Coleira.pdf (7 febrero 2019)
63. Secretaria de Salud (2016) Cólera Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/colera> (11 de diciembre de 2018)
64. 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.
65. Silva, A. J., & Benítez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2).
66. Solsona, F. y Méndez, J. (2002) Desinfección del agua. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente*. Lima, Perú. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/present.pdf> (21 de abril de 2019)
67. Sousa, V., Vieira, R., Patel R., Hofer, E. y Mesquita, V. (2001). Effects of chlorine on cells of *Vibrio cholera*. *Food Microbiology*. 18: 355-359.
68. Sung, H., Chen, C., Shih, P. y Hsu, P. (2006) Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio cholerae* O139 by temperature and its pathogenicity. *Journal of Food and Drug Analysis*. 14(3): 265-272.
69. 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 *CENIC Ciencias Biológicas*, 36 (1): 46-51.

70. Teschler, K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A., Warner, C., Wong, G, Linington, R., y Yildiz, F. (2015). Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 255–268.
71. The Center Food Security and Public Health. (2011) Cólera Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/cholera-es.pdf> (02 de Agosto 2018)
72. Universidad Politécnica de Valencia (2012) Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. España. Recuperado de <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html> (5 de agosto 2018)
73. Wai, S., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S., y 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.
74. Weber, W. J. (2003). Control de la calidad del agua: procesos fisicoquímicos. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.
75. West, P.A. (1989). The human pathogenic vibrios--a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*. 103(1): 1-34 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2249492/>
76. Yañez, I., Atengueño, K. Perez, D., Luna, A. y Orta, M. (2018). Efecto del cloro y el ozono en la ultraestructura celular de *Vibrio cholerae* variante rugosa En el Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, del 28 al 31 de octubre del 2018, Guayaquil, Ecuador.
77. 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 of the United States of America* 96 (7): 4028–4033.
78. Zhang, T., Wu, Q., Zhang, J. y Zhang, X. (2011) Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 111(4): 1006-1015.