



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CAMBIOS EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE  
*Vibrio cholerae* EN SUS MORFOLOGÍAS DE  
RESISTENCIA SOMETIDAS A TRATAMIENTO CON  
CLORO Y OZONO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

AURA NALLELY ESPINOSA MILLAN

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ISAURA YÁÑEZ NOGUEZ

ASESORES INTERNOS:

Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

Q.F.B. BEATRIZ ELENA ARELLANO PIMENTEL



CIUDAD DE MÉXICO, 2021



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.

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser la segunda casa que me albergó y me enseñó los valores y conocimientos necesarios para realizar mi sueño de terminar la carrera de Q.F.B.

A mi directora M. en C. Isaura Yáñez Noguez, por tenerme mucha paciencia, dirigirme, apoyarme y ayudarme a lo largo de la realización de esta tesis.

A mis asesores internos González Moreno José Óscar y Arellano Pimentel Beatriz Elena por el tiempo para revisar y complementar esta tesis.

A mis sinodales Hernández Reyes Adriana y Manuel

A la Dra. María Teresa Orta Ledesma por formar parte de su proyecto y sus observaciones para la realización de la tesis.

A todos los doctores, maestros, licenciados y personal del LIA del edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la UNAM por ayudarme, brindarme y estar al pendiente de las necesidades que requería para poder realizar mi trabajo experimental.

A mis profesores quienes me inculcaron perseverancia, paciencia y los conocimientos necesarios para realizar mis estudios.

A mis amigos de la FES Zaragoza por seguir siendo mis amigos, y por siempre pasarme energía positiva a lo largo de la carrera.

---

## *Dedicatorias*

*La presente tesis es dedicada a mi familia, que gracias a ella logré cumplir una de mis metas que me propuse de niña.*

*A mis mascotas, que estuvieron conmigo toda mi vida escolar y animando mis días grises con sus travesuras.*

*A mis cuñados Masha y Roberto, que me han ayudado a mis estudios con conocimientos y momentos divertidos.*

*A mi abuelita Juanis, gracias a ella eh adquirido una personalidad fuerte, decidida y de trabajar al 100% en todo momento y a mis tíos Saul y María y sus hijos que de una o de otra forma estuvieron apoyándome a lo largo de mi formación académica y brindándome momentos divertidos.*

*A mis primos Vicky, Brenda y Lalo y mi sobrina Aketza, que me han enseñado grandes valores, me ayudaron y apoyaron en momentos difíciles y soportaron mis indecisiones y mal humor.*

*Y especialmente*

*A mis queridos sobrinos Adrián, un regalo travieso que llegó a mi vida y Aarón, que es como un hermano, soportando mis berrinches, cambios de humor y, aun así, cuidándome y alegrando mis días.*

*A mis queridos hermanos Liz y Adán, que son como padres que me han guiado a lo largo de mi educación y que, a pesar de mi mal humor, berrinches y enojos, ellos siempre me mostraron comprensión y cariño. Me han apoyado en todo lo que decida y siempre están ahí en mis momentos más difíciles. Son uno de los pilares de mi vida y siempre serán mis modelos a seguir. Gracias.*

*A mi padre, aunque estuvo conmigo poco tiempo, él fue una de las razones por las que deseaba superarme, pensando que estaría orgulloso cada vez que realizaba un logro más. Extraño mucho su presencia y, sé que siempre está conmigo.*

*Y a mi madre, que ha sido la mayor razón por la logre realizar este gran paso de mi vida. Por sus amorosas atenciones y su comprensión me ha resultado menos difícil realizar mis propósitos. Y cada vez que me decía que no importaba lo que hiciera o a que me dedicara, siempre y cuando fuera lo correcto y estuviera feliz estaría orgullosa de mí. Me ha enseñado que debo ser perseverante ya que nada es fácil y agradecer lo que tengo. Te amo mamá y gracias por estar en esta vida conmigo.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. CÓLERA.....	3
2.1.1. ¿QUÉ ES?, TRANSMISIÓN Y CUADRO CLÍNICO.....	3
2.1.2. COLERA A NIVEL INTERNACIONAL Y NACIONAL.....	6
2.2. <i>VIBRIO SP.</i> .....	9
2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>V. CHOLERAE</i> .....	9
2.2.2. TINCIÓN GRAM Y MEDIOS DE CULTIVOS.....	11
2.2.3. ADAPTACIONES AMBIENTALES DE LA BACTERIA <i>V. CHOLERAE</i> .....	12
2.2.3.1. <i>V. cholerae</i> rugosa.....	13
2.2.3.2. Estado Viable No Cultivable (cocoide).....	15
2.3. ÁCIDOS GRASOS.....	17
2.3.1. ÁCIDOS GRASOS BACTERIANOS.....	18
2.3.1.1. Nomenclatura de los ácidos grasos.....	19
2.3.2. MEMBRANA Y PARED CELULAR EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.....	21
2.3.3. FUNCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	25
2.3.4. EJEMPLOS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS.....	26
2.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (GC/MS).....	27
2.5. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS GRASOS CELULARES.....	30
2.6. EFECTO DEL CLORO EN LA BACTERIA.....	31
2.7. EFECTO DEL OZONO EN LA BACTERIA.....	32
ANTECEDENTES.....	35
<i>V. CHOLERAE</i> Y SUS ADAPTACIONES A LAS VARIANTES RUGOSA Y COCOIDE.....	35
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>V. CHOLERAE</i> EN SUS TRES DISTINTOS FENOTIPOS LISA, RUGOSA Y COCOIDE.....	40
CAMBIOS EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS BACTERIANOS SOMETIDOS A ALGÚN DESINFECTANTE.....	41
JUSTIFICACIÓN.....	45
OBJETIVOS.....	47
HIPÓTESIS Y TIPO DE ESTUDIO.....	48
MATERIAL.....	49
DIAGRAMA DE FLUJO.....	51

<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>53</b>
INDUCCIÓN DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE LISA A COCOIDE.....	53
INDUCCIÓN DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE LISA A RUGOSA.....	54
SUSPENSIÓN PARA EL TRATAMIENTO CON CLORO Y OZONO DE <i>V. CHOLERAE</i> .....	55
SUSPENSIÓN DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE LISA.....	55
SUSPENSIÓN DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE RUGOSA.....	55
SUSPENSIÓN DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE COCOIDE.....	55
TRATAMIENTO CON CLORO.....	56
SOLUCIÓN DE NaClO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORO LIBRE.....	56
PROCESO DE TRATAMIENTO CON CLORO.....	57
TRATAMIENTO CON OZONO.....	58
PRODUCCIÓN DE OZONO BURBUJEANTE Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OZONO EN LÍQUIDO.....	58
PROCESO DE TRATAMIENTO CON OZONO.....	59
DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS BACTERIANOS.....	59
OBTENCIÓN DE LA BIOMASA DE <i>V. CHOLERAE</i> ANTES DEL TRATAMIENTO CON CLORO Y OZONO.....	60
Cultivo de muestra control de <i>V. cholerae</i> lisa y rugosa (sin tratamiento).....	60
Cultivo de <i>V. cholerae</i> cocoide (sin tratamiento).....	61
OBTENCIÓN DE LA BIOMASA DE <i>V. CHOLERAE</i> (LISA, RUGOSA Y COCOIDE) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON CLORO Y OZONO.....	61
SAPONIFICACIÓN.....	61
METILACIÓN.....	62
EXTRACCIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS.....	62
LAVADO.....	62
ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	62
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
INDUCCIÓN A <i>V. CHOLERAE</i> MORFOLOGÍA RUGOSA.....	64
INDUCCIÓN A <i>V. CHOLERAE</i> MORFOLOGÍA COCOIDE.....	67
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS TRES MORFOLOGÍAS DE <i>V. CHOLERAE</i> .....	71
EFFECTO DEL CLORO Y EL OZONO EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE LISA.....	77
EFFECTO DEL CLORO Y EL OZONO EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE RUGOSA.....	84
EFFECTO DEL CLORO Y EL OZONO EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>V. CHOLERAE</i> VARIANTE COCOIDE.....	91
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>97</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>111</b>

### INTRODUCCIÓN

La distribución de las enfermedades infecciosas en el mundo está variando continuamente, debido a los cambios que se producen en el patógeno, el ambiente y la población. El incremento de la resistencia a los antibióticos, el sobrecalentamiento del planeta, la globalización de los mercados y las migraciones de poblaciones, son los principales factores que intervienen en el desarrollo y proliferación de este grupo de enfermedades.<sup>1</sup>

Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra el cólera, que presenta una mayor incidencia en los países en proceso de desarrollo especialmente de clima tropical, llegando a adquirir características epidémicas.<sup>1</sup> El cólera, ha afectado a la humanidad a lo largo de su historia y ha generado al menos siete pandemias en los últimos 200 años;<sup>2</sup> de allí la importancia que los protocolos de vigilancia en salud pública internacional indiquen su reporte de carácter obligatorio e inmediato.<sup>3</sup>

El agente causal del cólera es la bacteria *Vibrio cholerae*, este microorganismo es de difícil aislamiento en las aguas en periodos interepidémicos, tras los cuales suele resurgir en múltiples focos dando lugar a posibles epidemias. Se ha sugerido que en estos periodos interepidémicos la bacteria se encuentra en estado viable pero no cultivable o es capaz de unirse a superficies abióticas como bióticas formando una estructura tridimensional denominada biofilm.<sup>4</sup> La inducción natural de *V. cholerae* a estas dos adaptaciones ambientales pueden ser un factor importante en la supervivencia de *V. cholerae* en el ambiente acuático.

En este contexto, el cólera es una infección intestinal aguda, que sigue amenazando a la salud pública y está relacionado con problemas de abastecimiento de agua

## *INTRODUCCIÓN*

---

potable y saneamiento. Debido a ello, el presente trabajo se enfoca en evaluar los cambios que muestra el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae*, incluyendo sus adaptaciones morfológicas ambientales, a dos sustancias oxidantes (cloro y ozono) que se utilizan en el tratamiento de agua potable. La finalidad es determinar los posibles daños en los ácidos grasos como componentes principales de la membrana y pared celular de la bacteria *V. cholerae*; los cuales son primordiales para su supervivencia.

## MARCO TEÓRICO

### 2.1. Cólera

#### 2.1.1. ¿Qué es?, transmisión y cuadro clínico

El cólera es una infección intestinal aguda causada por la ingesta de alimentos o agua contaminada por la bacteria *V. cholerae* serogrupos O1 u O139 y que puede causar la muerte en horas.<sup>5</sup>

Se ha considerado al hombre como único reservorio de *V. cholerae*, pero también tenemos reservorios acuáticos como moluscos, cangrejos y ostras. Por otra parte, existen factores de riesgo para contraer más fácilmente la enfermedad como: hacinamiento, desnutrición, bajo nivel socioeconómico, falta de higiene, inadecuado tratamiento de agua potable, entre otros.<sup>6</sup>

La vía de entrada de la bacteria es oral y es transmitida por agua contaminada con heces o vómito de pacientes o portadores y, por la ingestión de alimentos contaminados por el bacilo.<sup>6</sup> La dosis requerida para infectar a un ser humano es aproximadamente de  $10^{12}$  bacilos de *V. cholerae*, debe ser una dosis alta, ya que la mayor parte de los microorganismos mueren por la acción de los ácidos del estómago.<sup>7</sup> Pacientes sin tratamiento excretan el bacilo hasta por 5 días; pero las personas asintomáticas pueden eliminarlos por periodos de dos semanas.<sup>6</sup>

En ocasiones no son detectados los síntomas de un cuadro colérico si solamente es portador de la enfermedad, pero cuando se presentan es necesario diagnosticar a tiempo y tratarlo de inmediato.

El periodo de incubación varía desde 6 horas hasta 5 días, aunque la media es entre 2 a 3 días. El cuadro clínico que se divide en tres tipos: leves, moderadas y graves (Figura 1).<sup>6,7</sup>

En el cuadro clínico leve no muestra deshidratación, presenta menos de cuatro evacuaciones líquidas en 24h, con o sin vómito y sin pérdida de peso. En el moderado el paciente presenta de 5 o más evacuaciones en 24h, con deshidratación moderada (ojos hundidos, mucosas secas, sed aumentada), vómito escaso, pérdida de peso corporal menor al 5%, orina escasa, somnolencia e irritabilidad. Los pacientes con cuadros clínicos graves tienen más de 10 evacuaciones diarias y vómitos (>5) en 24h, temperatura >38°C, pérdida de más de 5% del peso corporal y los datos de deshidratación son aparentes como ausencia de orina, mucosas secas, inconsciencia, convulsiones, incapacidad para beber y pulso débil.<sup>7,8</sup>

Su principal manifestación clínica es el inicio brusco de una diarrea acuosa y de vómito, conforme se van perdiendo líquidos, las heces se vuelven incoloras e inodoras, libres de proteínas y moteadas de mucosidad, también conocidas como heces en agua de arroz.<sup>7</sup> La diarrea alcanza su máxima expresión en unas 24h, excediendo 1L por hora con 6 a 10 evacuaciones diarias o más.<sup>9</sup>

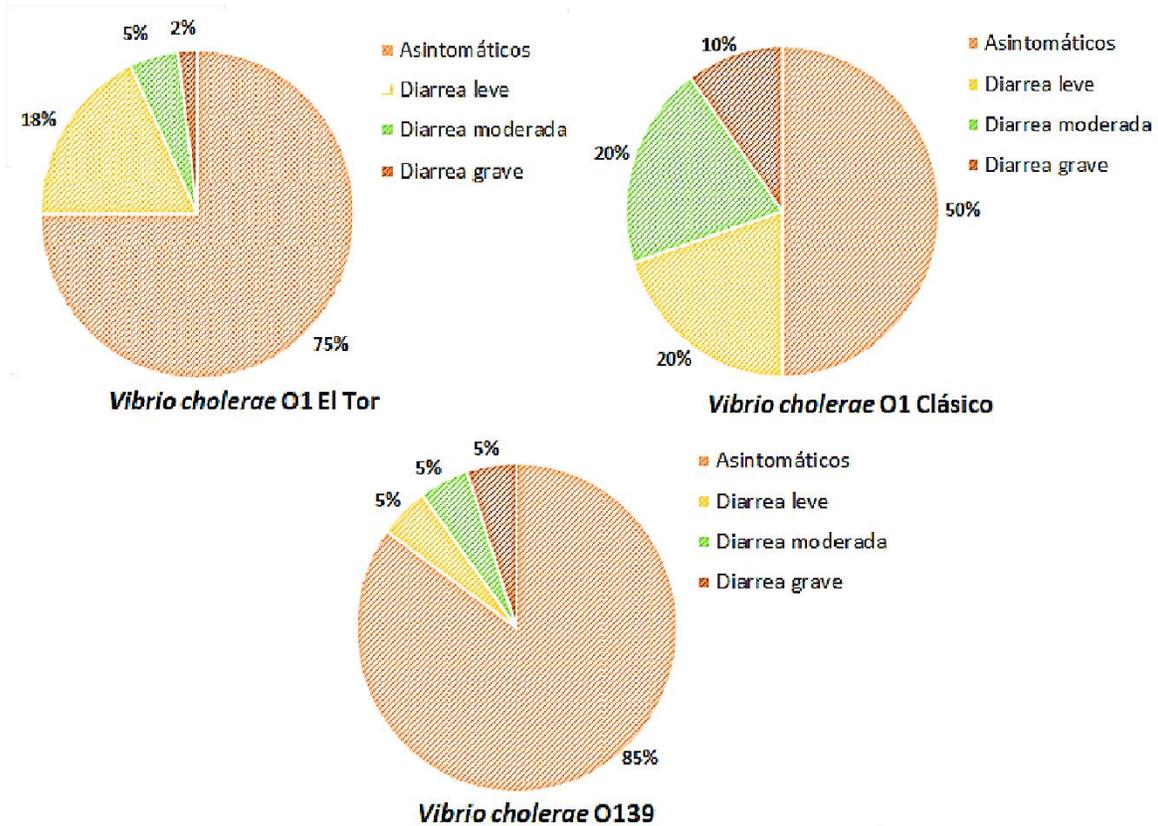


Figura 1. Clasificación del cuadro clínico de *V. cholerae*

Fuente: (Modificación) Secretaría de Salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica del cólera. México: Dirección General de Epidemiología; 2015

Según la OMS, hasta el 80% de los casos pueden tratarse con soluciones de rehidratación salina,<sup>10</sup> El tratamiento del cólera consiste en la rehidratación rápida mediante la administración de sales de rehidratación oral (SRO) o líquidos intravenosos en pacientes con cuadros clínicos graves, como el lactato de Ringer.<sup>6</sup>

Los investigadores calculan que cada año hay en el mundo entre 1.3 y 4 millones de casos de cólera, y entre 21 000 y 143 000 defunciones por esta causa. El cólera representa aún una amenaza mundial y es un indicador fundamental del grado de desarrollo social.<sup>10</sup>

Los brotes de cólera se deben a que el abastecimiento de agua, el saneamiento, la inocuidad de los alimentos o la higiene son inadecuados,<sup>6</sup> debido a estos factores se han producido varias epidemias a nivel mundial y en México.

### 2.1.2. Colera a nivel internacional y nacional

Antes de la primera pandemia de 1817 el padre de la Medicina, Hipócrates, dejó algunas descripciones del padecimiento e incluso propuso la reposición de líquidos como tratamiento de la enfermedad que nombró “cólera”.<sup>5</sup> El cólera comenzó en Asia y su cuna se considera la región delta del Ganges en la India.<sup>11</sup> Hasta el momento han surgido ocho pandemias definitivas.<sup>6</sup> En 1817 se presentó la primera pandemia iniciando en Asia, duró seis años causando gran mortalidad en la India, y se extendió en parte a los demás continentes. Tres años después en 1826 comenzó la segunda pandemia, iniciando en India y extendiéndose a Europa, Asia y África, en 1830 llega a Moscú, Berlín, y Londres, para 1831 y 1832 cruza el Atlántico llegando a América del Norte, Central (Cuba, México, Guatemala, Nicaragua, Panamá y Jamaica) y América del Sur (Guyana, Brasil y Uruguay).<sup>11</sup> La tercera pandemia comenzó en 1852 a 1859 y afectó a Europa, América, Asia (1852 en Indonesia y 1854 en China y Japón) y África (en Zanzibar, Mozambique, Madagascar, Islas Comores, Uganda y en 1853, 1855 y 1858 en Etiopía).<sup>6</sup>

En 1854 el bacteriólogo italiano Filippo Paccini examinó el contenido intestinal de fallecidos por cólera e identificó la presencia de una bacteria en forma de coma que llamó *Vibrion cholerae*; pero no fue hasta 1965 que se le dio el reconocimiento del descubrimiento, ya que la revista donde publicó no era conocida y se le atribuyó tiempo antes a Koch.<sup>5</sup>

La Cuarta pandemia inició en 1863 y duró 16 años afectando a Asia, Europa y América. Entre 1865 a 1870 se presentó en forma epidémica en varias islas del Oeste, en 1868 una importación de Nueva Orleans llevó a Nicaragua y Honduras Británicas el cólera, y desde Argentina llegó a Bolivia y Perú. La Quinta pandemia inició en 1881, duró 15 años y afectó a Europa (Francia, Italia y España), Asia, América y África. Su comienzo fue en la India diseminando en La Meca y llegando a Arabia en 1881 y 1882, posteriormente llegó a Egipto por peregrinaciones. La Sexta pandemia comenzó en 1899 duró 24 años, iniciando en la India, y expandiéndose a África, Asia menor y Europa. En 1905 Gotschild descubrió *V. cholerae* O1 el Tor. La séptima pandemia comenzó en las Islas Célebes de Indonesia, posteriormente afectó el sur de Asia en 1961, África en 1971 y América Latina en 1991. Las primeras cinco pandemias y parte de la sexta fueron causadas por el biotipo clásico, la sexta pandemia y la séptima por biotipo Tor. La octava pandemia, fue producida por *V. cholerae* O139 Bengal, se inició en 1992 en Madrás y Bangladesh, se extendió al subcontinente indio y ocurrieron epidemias en China, Tailandia y Malasia.<sup>6</sup> Durante el año 2004, 56 países han notificado a la OMS un total de 101.383 casos de cólera y 2.345 muertes. Esto supone una letalidad un 2,3% superior a la del año anterior. Ocurrieron en África el 94% de todos los casos declarados, y el resto en Asia y América Latina.<sup>12</sup> Durante 2017 se han notificado casos confirmados de cólera de Angola, Burundi, Kenia, Malawi, Mozambique, República Democrática del Congo, Sudán del sur, Somalia, Tanzania y Yemen.<sup>13</sup>

Específicamente en México se cree que el cólera entró en el transcurso de la segunda pandemia, por la frontera con E.U.A. En julio-agosto de 1833 se presentó el primer caso de cólera en Saltillo, Coahuila, falleciendo 1 200 personas.<sup>5</sup>

El 13 de junio de 1991 en la pequeña comunidad rural de San Miguel Totolmaloya, ubicada en la Sierra de Goleta en el Estado de México se detectó el primer caso de cólera que no se había presentado desde finales del siglo XIX. La epidemia afectó un 97% del territorio mexicano, con una letalidad de 1.12 por cada 100 casos.<sup>14</sup> De 1991 a 2001 se notificaron 45 062 casos, con 505 defunciones, siendo 1998 el año con mayor número de casos de 16 430.<sup>15</sup> En 2010 se reportó un caso en Navolato, Sinaloa; en 2011 se detectó un caso en Badiraguato, Sinaloa; en 2012 hubo dos casos más en Culiacán y Escuinapa, Sinaloa.<sup>14</sup> En el 2013 se introdujo en México la nueva cepa de cólera circulante en los brotes de Haití y otros países de América, dando origen a la ocurrencia de 187 casos en Cd. de México, Hidalgo, Estado de México, Veracruz y San Luis Potosí. En 2014 se identificaron 14 casos, 13 en Hidalgo y uno en Querétaro, en 2015 un caso en Puebla, en 2016 un caso en Nayarit<sup>13</sup> y, el último caso reportado fue en abril de 2019 en Tabasco por *V. cholerae* O1 Ogawa.<sup>16</sup>

Debido a que el cólera es una enfermedad gastrointestinal aguda, es necesario enfatizar las características del agente causal *V. cholerae*, de tal manera que se puedan buscar alternativas para su erradicación.

## 2.2. *Vibrio sp.*

El género *Vibrio sp.* fue inicialmente propuesto por Verón en 1965, se compone de más de 60 especies y son habitantes naturales del agua salobre y salada en todo el mundo.<sup>17</sup> Cerca de la tercera parte de las especies son patógenas para el humano y la enfermedad es por lo general, el resultado de la ingestión de agua o alimentos contaminados.<sup>1</sup> La mezcla de agua marina con agua dulce y, en condiciones homogéneas de salinidad, temperatura o movimiento del agua, entre otros factores, pueden incluso ser los microorganismos predominantes.<sup>18</sup>

*Vibrio sp.* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, de forma recta o curva, no producen esporas, presentan un diámetro entre 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  y entre 1.4 a 2.4  $\mu\text{m}$  de largo y son móviles por medio de un único flagelo polar.<sup>1</sup>

Las especies patógenas para los humanos son: *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio fluvialis* causantes de la gastroenteritis aguda, *Vibrio vulnificus* produce infecciones extraintestinales y *V. cholerae*, el agente causal del cólera.<sup>7,19</sup>

### 2.2.1. Características de *V. cholerae*

La etiología del cólera fue confirmada por Robert Koch en 1833, cuando aisló el “*Bacillus cholera*” del agua durante un brote de cólera en Egipto.<sup>1</sup>

*V. cholerae* es de crecimiento rápido con una temperatura óptima de 37°C y pH óptimo de 7.8 a 8.0,<sup>20</sup> es un bacilo gramnegativo, con un tamaño entre 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.4-2.6  $\mu\text{m}$  de largo, anaerobio facultativo, no produce esporas, y presenta movilidad rápida debido a un único flagelo polar.<sup>18</sup> Es oxidasa positiva, reduce el nitrato a nitrito, fermenta azúcares como glucosa y sacarosa, pero sin

producir gas.<sup>21</sup> Las altas temperaturas, pH ácidos (ej. ácidos gástricos), desinfectantes y la desecación matan a los vibriones.<sup>20</sup>

La presencia de antígenos somáticos O, ha permitido determinar más de 200 serogrupos de *V. cholerae*, pero solamente dos de ellos se reconocen como responsables de las epidemias de cólera, el O1 y el O139. Los aislamientos del serogrupo O1 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, siendo este último muy raro, también pueden dividirse en dos biotipos, El Tor y Clásico (Figura 2). Los serogrupos no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones gastrointestinales. *V. cholerae* O1 es considerado el serogrupo virulento y epidémico por excelencia.<sup>1</sup>

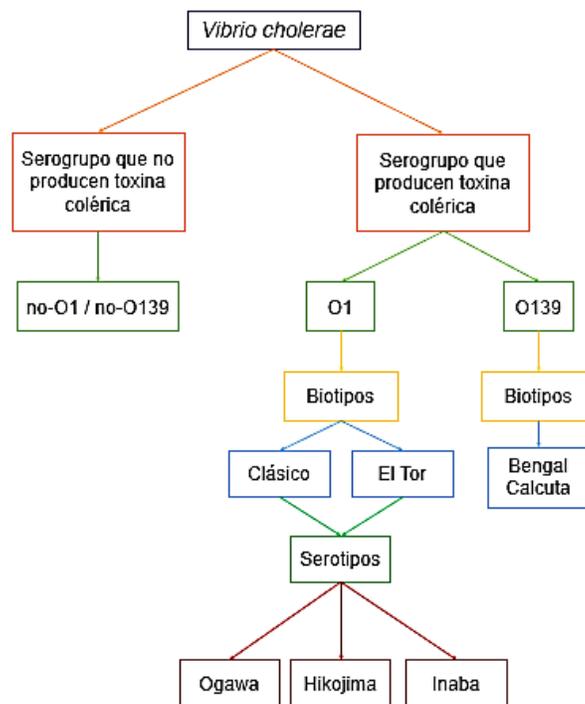


Figura 2. Clasificación antigénica de *V. cholerae*

Otras características de *V. cholerae* están basadas en la tinción de Gram que es una tinción diferencial y en los medios de cultivos.

### 2.2.2. Tinción Gram y medios de cultivos

En la tinción de Gram se muestran bacilos cortos rectos gramnegativos en forma de coma en aislamiento inicial menor de 18 horas (Figura 3), con un tamaño entre 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.4 a 2.6  $\mu\text{m}$  de largo, pueden presentarse individuales o en cadenas, con un aspecto en forma de S (dos células juntas).<sup>18</sup>



Figura 3. Micrografía electrónica de *V. cholerae* O1

Fuente: Chaiyanan S, Hug A, Mangel T, Colwell R. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. Sys. Appl. Mic. 2001;24(1): p 395

En cuanto a los medios de cultivo, el medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) es un agar selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *V. cholerae* y otras especies de *Vibrio sp.* El medio tiene citrato sódico, tiosulfato sódico, bilis de buey y colato, que son agentes que proporcionan un pH alcalino para inhibir organismos grampositivos y suprimir los organismos coliformes. Tiene altas concentraciones de sodio para favorecer el crecimiento de *V. cholerae*, la sacarosa

es el carbohidrato y como indicadores de pH son el azul de bromotimol y el azul de timol, que en un ambiente alcalino le otorga al medio un color verde y vira a color amarillo en medio ácido.<sup>19</sup>

Las colonias de *V. cholerae* en TCBS se observan amarillas planas o poco convexas, aspecto liso opaco de aproximadamente 2–4 mm de diámetro, consistencia pegajosa con zonas amarillas alrededor de la colonia.<sup>19</sup>

Otro medio es el Agua Peptonada Alcalina (APA), se usa para el enriquecimiento de *V. cholerae* y otras especies de *Vibrio sp.*, a partir de alimento, agua, heces y estudios clínicos. La peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para su crecimiento, el pH relativamente alto del medio (aproximadamente de 8.4) proporciona un entorno favorable para su crecimiento.<sup>22</sup>

La historia del cólera se ha caracterizado por oleadas epidémicas, hasta principios de 1980 se pensaba que *V. cholerae* era un microorganismo altamente adaptado a su huésped y que no sobrevivía más de pocas horas o días fuera del intestino,<sup>1</sup> sin embargo, *V. cholera* sí puede sobrevivir fuera del huésped, en respuesta a tensiones medioambientales tiene la capacidad de someterse a un evento de variación de fase que resulta en la generación de dos variantes de colonias morfológicas distintas, muy diferentes a niveles fenotípicos.<sup>23</sup>

### **2.2.3. Adaptaciones ambientales de la bacteria *V. cholerae***

La incidencia de los brotes de cólera está muy vinculada con factores ambientales y ecológicos, que a su vez se controlan por la variabilidad del clima a gran escala. La persistencia del microorganismo depende mucho de su capacidad para

adaptarse y desarrollar estrategias de supervivencia. Entre ellas, la formación de biofilms, la adquisición de fenotipo rugoso o alcanzar un estado viable no cultivable.<sup>23,24</sup>

### **2.2.3.1. *V. cholerae* rugosa**

La hipótesis de cambiar entre la morfología de colonias lisas a rugosas fue propuesta por Balteanu en 1926 y por Bruce White en 1938 como una capacidad de la bacteria para contribuir a su supervivencia y persistencia ambiental.<sup>23</sup>

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.<sup>23</sup> Una estrategia bacteriana para sobrevivir en el ambiente, es la formación de biofilms o biopelículas.<sup>1</sup> En 2002 Donlan conceptualizó la definición de biofilm como “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”.<sup>25</sup>

Estas estructuras son comunidades microbianas que se forman por la adherencia de una bacteria a una superficie a la que posteriormente se adicionan múltiples capas de interacciones células–células, que están rodeados por canales de agua y permite la entrada de nutrientes a las células y salida de metabolitos tóxicos o productos de desecho.<sup>1,4</sup> Se han determinado tres fases distintivas en su formación, que incluyen la unión inicial a una superficie, seguida por la formación de

microcolonias y finalmente la maduración de estas microcolonias dentro de una biopelícula madura cubierta de exopolisacáridos.<sup>26</sup>

Las biofilms proporcionan un microentorno que, probablemente, favorece la supervivencia y persistencia del microorganismo durante periodos interepidémicos, debido a que le permiten establecer transacciones metabólicas favorables con otros miembros de esta estructura. Además, le confiere protección frente a varios agentes estresantes y predadores del ambiente.<sup>24</sup>

La formación de biofilm es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biopelículas ofrece cuatro ventajas importantes: (i) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (ii) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (iii) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (iv) posibilita la transferencia de material genético DNA. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm.<sup>27</sup> El establecimiento del biofilm pudiera ser un factor importante en la supervivencia de *V. cholerae* en el ambiente acuático, pues dentro de esta estructura el microorganismo puede establecer transacciones metabólicas favorables con otros miembros del biofilm y a su vez, protegerse de predadores y agentes oxidantes que se encuentren en el ambiente. Además, la unión de la bacteria a superficies bióticas como el exoesqueleto de crustáceos puede constituir una forma de nutrición, pues *V. cholerae* es capaz de metabolizar la quitina. De esta forma, el biofilm puede ser una ventaja adaptativa importante en la supervivencia

de este microorganismo en los ecosistemas acuáticos y especialmente, en las aguas tratadas.<sup>4</sup>

La presencia de variantes fenotípicas también se ha informado en *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, indicando que este proceso es común entre las especies del género *Vibrio sp.* de importancia clínica.<sup>23</sup>

#### **2.2.3.2. Estado Viable No Cultivable (cocoide)**

La morfología cocoide también es conocida como estado viable pero no cultivable (en inglés Viable But Non-Culturable, VBNC) y se define como un estado donde la bacteria es metabólicamente activa, pero carece de la capacidad para reproducirse en medios de cultivo rutinarios.<sup>28</sup>

Para que un microorganismo sobreviva en un ambiente acuático, debe tener la capacidad de hacer frente a la privación transitoria de nutrientes, fluctuaciones en parámetros físicos y químicos, y factores microbianos antagónicos. Se ha demostrado que la exposición de ciertas bacterias gramnegativas a la privación de nutrientes da como resultado (i) división celular continua y aumentos en el número de células y (ii) la formación de célula cocoides. Ha sido propuesto que estas respuestas representan estrategias porque mejora la supervivencia de un organismo cuando se enfrenta a una privación exógena de nutrientes.<sup>29</sup>

Las células de la morfología cocoide no son consideradas muertas debido a diversas diferencias: las células muertas tienen una membrana dañada que no puede retener el ADN cromosómico y plasmídico, son metabólicamente inactivas, no expresan genes. Mientras las células cocoides tienen una membrana intacta que

contiene información genética no dañada, son metabólicamente activas y llevan a cabo la respiración, y continúan la transcripción, especialmente las correspondientes a los genes de respuesta al estrés.<sup>30,31,32</sup>

Se ha reportado la existencia de *V. cholerae* viable no cultivable, en respuesta al agotamiento de nutrientes u otras condiciones ambientales desfavorables,<sup>1</sup> se reduce en tamaño y adopta una forma cocoide, sostiene ciertas funciones como actividad metabólica, expresión génica específicas, resistencia a antibióticos, virulencia y su potencial patogénico durante un tiempo prolongado en concentraciones bajas de nutrientes, las temperaturas subóptimas, la salinidad elevada, el pH extremo o la radiación solar.<sup>33</sup> También se ha mostrado que *V. cholerae* viable pero no cultivable es capaz de transformarse al estado cultivable cuando las condiciones le son favorables.<sup>1</sup>

Debido entonces a la supervivencia que *V. cholerae* puede tener en el ambiente, y al potencial peligro que ello representa cuando se sabe que es posible su presencia en las fuentes de abastecimiento de agua potable. Es necesario buscar alternativas de desinfección que inactiven a la bacteria. Pero además dilucidar la manera en que los tratamientos utilizados para potabilización del agua, como el cloro y el ozono, actúan en componentes esenciales, tales como los ácidos grasos, de células bacterianas que han desarrollado cierta resistencia en el ambiente.

Se sabe que *V. cholerae*, al ser una bacteria Gram negativa, la mayor parte de los lípidos se localiza en la "pared y membrana" celular,<sup>34</sup> uno de los principales componentes de los lípidos son los ácidos grasos, y son característicos de cada especie, por lo que son estructural y metabólicamente importantes.

### 2.3. Ácidos grasos

Los lípidos son componentes esenciales de todos los organismos vivos, son un conjunto de biomoléculas cuya característica distintiva es la insolubilidad en agua y solubilidad en componentes orgánicos. Los principales lípidos que forman las membranas son los fosfolípidos, los cuales tienen una región hidrofóbica y una hidrofílica. La región hidrofílica es el grupo fosfato y el glicerol, mientras que la región hidrofóbica es la representada por los ácidos grasos (AGs), (Figura 4).<sup>35</sup>

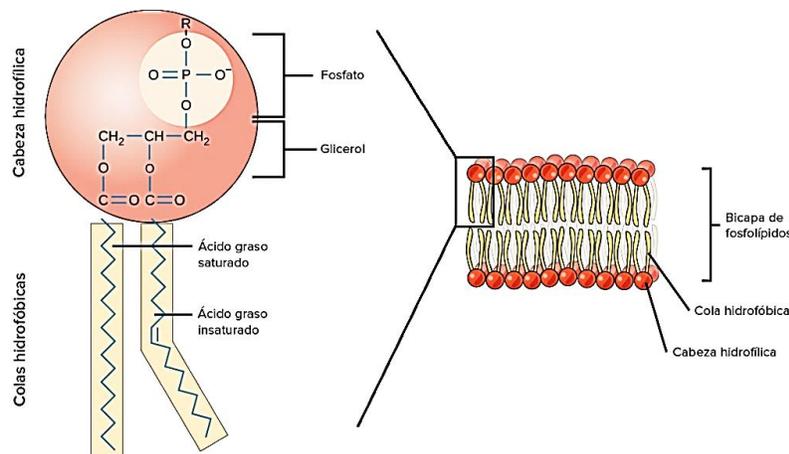


Figura 4. Estructura del fosfolípido

Fuente: Khan Academy. Lípidos [Internet]. [consultado el 14 de mayo de 2020] Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/lipids/a/lipids>

Un ácido graso se define como una biomolécula formada por una cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, con un grupo carboxilo en un extremo (Figura 5). Los ácidos grasos se pueden clasificar según el número de enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada en: saturados (SFA, saturated fatty acid), monoinsaturados (MUFA, monounsaturated fatty acid) y poliinsaturados (PUFA, poliunsaturated fatty acid).<sup>36</sup>

ESTRUCTURA DE UN ÁCIDO GRASO

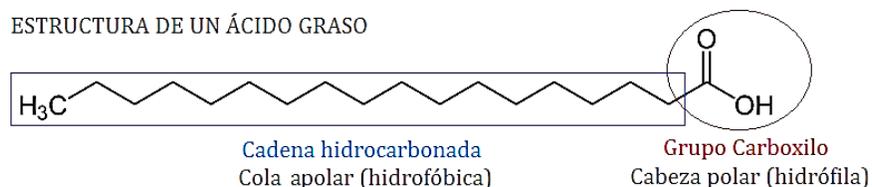


Figura 5. Estructura de un ácido graso saturado

Fuente: Castaños E. Ciencia on the crest. [Internet]. 2015 [consultado el 14 de mayo de 2020].  
Disponble en: <https://cienciaonthecrest.com/2015/07/02/los-acidos-grasos/>

En general, una célula bacteriana tiene más del 95% de su contenido total de lípidos asociado a la membrana celular; el 5% restante está distribuido entre el citoplasma y la pared celular. Las células bacterianas se distinguen debido a la ausencia completa de esteroides en sus células; dichas células son incapaces de sintetizar la estructura del anillo esteroide, aunque son capaces de formar grandes polímeros lineales de isoprenoide. A excepción de las micobacterias, los triacil glicerol faltan en las bacterias, salvo el género *Bacillus sp.*, que contiene algunos ácidos grasos poliinsaturados de las fórmulas C16:2 y C16:2.<sup>37</sup>

### 2.3.1. Ácidos grasos bacterianos

El contenido de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentra distribuido en la pared celular, membrana celular e inclusiones citoplasmáticas, se sintetizan por separado y luego son esterificados para formar lípidos más complejos.<sup>38</sup> Las células alteran la composición de los ácidos grasos de sus lípidos para mantener la fluidez de la membrana en condiciones ambientales variables.<sup>39</sup>

Las bacterias carecen de la capacidad para sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados no conjugados convencionales. Es por esta razón que las bacterias muestran cierta limitación en cuanto a capacidad para sintetizar un amplio espectro de ácidos grasos y solo producen ciclopropano monoenoico saturado o ácidos grasos de cadena ramificada. En realidad, algunos géneros como *Mycoplasma sp.* y ciertos mutantes de *E. coli* han perdido la capacidad de sintetizar ácidos grasos monoenoicos y requieren para crecer una fuente externa de estas moléculas.<sup>37</sup>

Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos son componentes de varios lípidos más complejos y estos se utilizan para el almacenamiento de energía, así como para elementos estructurales en la construcción de membranas celulares.<sup>40</sup>

Se han encontrado muchas clases de ácidos grasos en las bacterias que pueden contener un número diferente de átomos de carbono, tener cadena lineal o cadena ramificada, por esta razón para identificarlos es necesaria la nomenclatura para los ácidos grasos.<sup>38</sup>

#### **2.3.1.1. Nomenclatura de los ácidos grasos**

La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), establece que la nomenclatura de los ácidos grasos debe indicar: el número de carbonos, la cantidad y la posición de los enlaces, si existen, y el tipo de isomería geométrica de los enlaces. Por ejemplo, C18 indica un ácido graso de 18 carbonos. El grado de saturación o insaturación se indica por un número separado por dos puntos, si es saturado (sin dobles enlaces), se designa como C18:0, y si es insaturado, posterior a los dos puntos es seguido por un número dependiendo el número de los enlaces,

será C18:1, C18:2 o C18:3, cuando es mono, di o tri-insaturado, respectivamente. Para los ácidos grasos insaturados, se indica la posición de doble enlace mediante la letra griega  $\Delta$ . Por ejemplo; C18:1 $\Delta^9$  si el doble enlace se encuentra entre el carbono 9 y 10, contabilizando desde el grupo ácido funcional (grupo carboxilo) o en pocos casos el más cerca del alifático final ( $\omega$ ) (Figura 6). Si es un isómero cis, se indica como C18:1 $\Delta^9$ c. Si la isomería es trans, será C18:1 $\Delta^9$ t. En ciertas ocasiones ya no es necesario utilizar el  $\Delta$ , inmediatamente se coloca la c o t: C18:1 9t.<sup>41</sup> Los prefijos a, i, cy y d se refieren a ácidos grasos con ramificaciones anteiso, iso, ciclopropil y dicarboxílicos respectivamente. Las letras br indican que el tipo de ramificación es desconocida, mientras que un número seguido de ME indica la posición de un grupo metilo. Los prefijos  $\alpha$  y  $\beta$  indican que el grupo OH se localiza en la posición 2 y 3 respectivamente.<sup>42,43</sup> (ver Tabla 1)

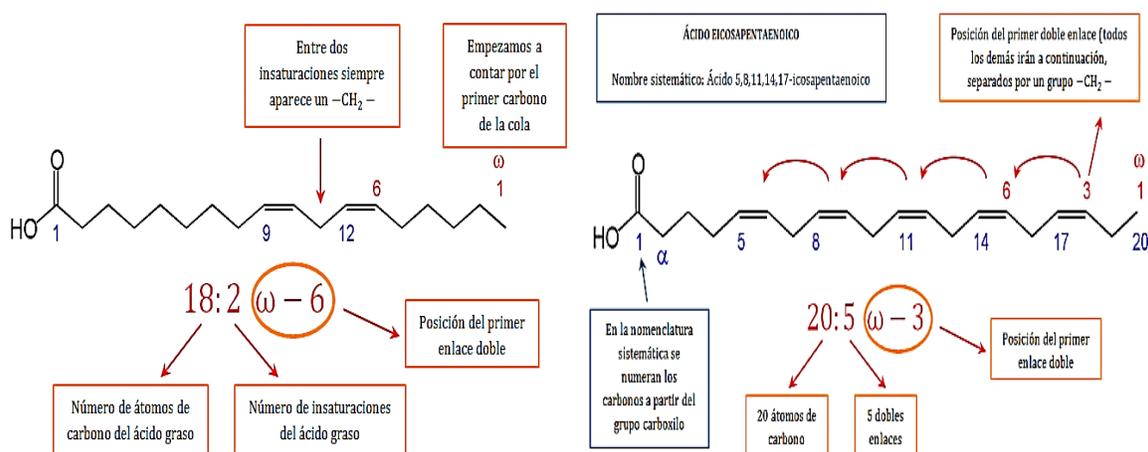


Figura 6. Ejemplos de nomenclatura de ácidos grasos.

Fuente: Castaños E. Ciencia on the crest. [Internet]. 2015 [consultado el 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://cienciaonthecrest.com/2015/07/02/los-acidos-grasos/>

Tabla 1. Nomenclatura de ácidos grasos

Símbolo	Nombre sistemático	Nombre común	Estructura
<b>Ácidos grasos saturados</b>			
12:0	Ácido dodecanoico	Ácido láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20:0	Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22:0	Ácido docosanoico	Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24:0	Ácido tetracosanoico	Ác. lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
<b>Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)</b>			
16:1 $\Delta^9$	Ácido 9-hexadecenoico	Ác. palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1 $\Delta^9$	Ácido 9-octadecenoico	Ác. oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2 $\Delta^9,12$	Ácido 9,12-octadecadienoico	Ác. linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 $\Delta^9,12,15$	Ác. 9,12,15-octadecatrienoico	Ác. $\alpha$ -linolénico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 $\Delta^6,9,12$	Ác. 6,9,12-octadecatrienoico	Ác. $\gamma$ -linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:4 $\Delta^5,8,11,14$	Ác. 5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ác. araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24:1 $\Delta^{15}$	Ácido 15-tetracosenoico	Ác. nervónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

### 2.3.2. Membrana y pared celular en bacterias gramnegativas

Las bacterias gramnegativas están compuestas principalmente de ácidos grasos de cadena lineal.<sup>44</sup> (Figura 7)

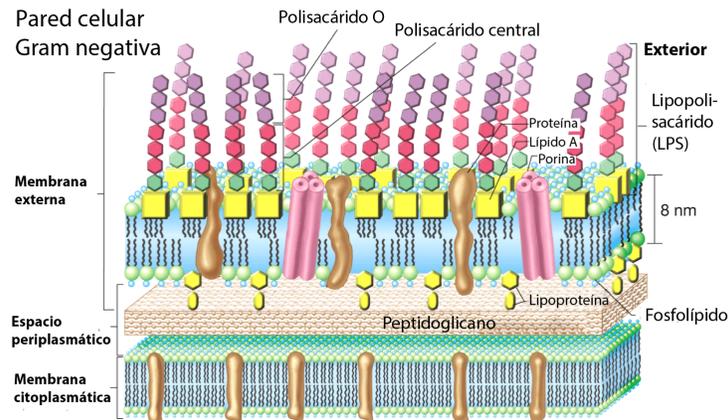


Figura 7. Estructura de membrana y pared celular de una bacteria gramnegativa

Fuente: Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock, biología de los microorganismos. 12th ed. México: editorial Pearson educación; 2009.

La membrana bacteriana de *V. cholerae* está formada principalmente por fosfolípidos, pero al ser una bacteria gramnegativa su membrana externa tiene como principal constituyente a los lipopolisacáridos (LPS),<sup>44</sup> también llamado históricamente como endotoxina.<sup>45</sup>

Los LPS es una molécula glicolípida anclada a la membrana externa y considerada como el antígeno de superficie más importante de las bacterias gramnegativa, se estima que una bacteria gramnegativa posee unas  $3.5 \times 10^6$  moléculas de LPS que ocupan un área de  $4,9 \mu\text{m}^2$ , si la superficie aproximada de una bacteria oscila entre  $6-9 \mu\text{m}^2$ , los LPS corresponderían a las  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie bacteriana, siendo así el mayor componente de la membrana externa en este tipo de microorganismos.<sup>46</sup> Los LPS también son considerados una molécula anfifílica, es decir, que poseen una parte hidrofóbica y una hidrofílica.

La molécula se compone de dos regiones principalmente, un glucolípido llamado lípido A (parte hidrofóbica) y un heteropolisacárido conocido como el núcleo o core (parte hidrofílica) unidos entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO) y una tercera región llamada antígeno O conocida como polisacárido específico O y varía dependiendo de la especie bacteriana.<sup>45,46</sup>

El lípido A se le reconoce como la fracción biológicamente activa de la molécula, se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos por enlaces  $\beta$  (1-6), fosforiladas en la posición 1 y 4 del disacárido y unidas a ácidos grasos en la posición 2 y 3 de cada monosacárido, usualmente tiene 6 cadenas de ácidos grasos de diferente longitud, que por lo general son ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertados en la membrana externa de la

bacteria. Cuando estas cadenas de ácidos grasos se unen directamente al azúcar se habla de cadenas primarias, si se unen por enlaces éster a los grupos hidroxilo de las cadenas primarias se llaman cadenas secundarias, (Figura 8b).<sup>45,46</sup>

El core se subdivide en core externo (formado por hexosas) y en core interno (formado por heptosas). En algunos microorganismos el LPS presenta una región sacárida adicional conocida como antígeno O el cual es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos altamente variable entre especies bacterianas. Dada esta variabilidad se designa a un LPS como lipopolisacárido (LPS) cuando presenta las fracciones lipídicas, core y antígeno O, y como lipooligosacárido (LOS) cuando presenta únicamente las fracciones lipídicas y core, al LPS además se le conoce con el nombre de LPS liso porque al sembrar en agar gel bacterias con este tipo de LPS sus colonias crecen con bordes lisos; y al LOS con el nombre de LPS rugoso porque sus colonias crecen con bordes irregulares de apariencia rugosa (Figura 8a).<sup>46</sup>

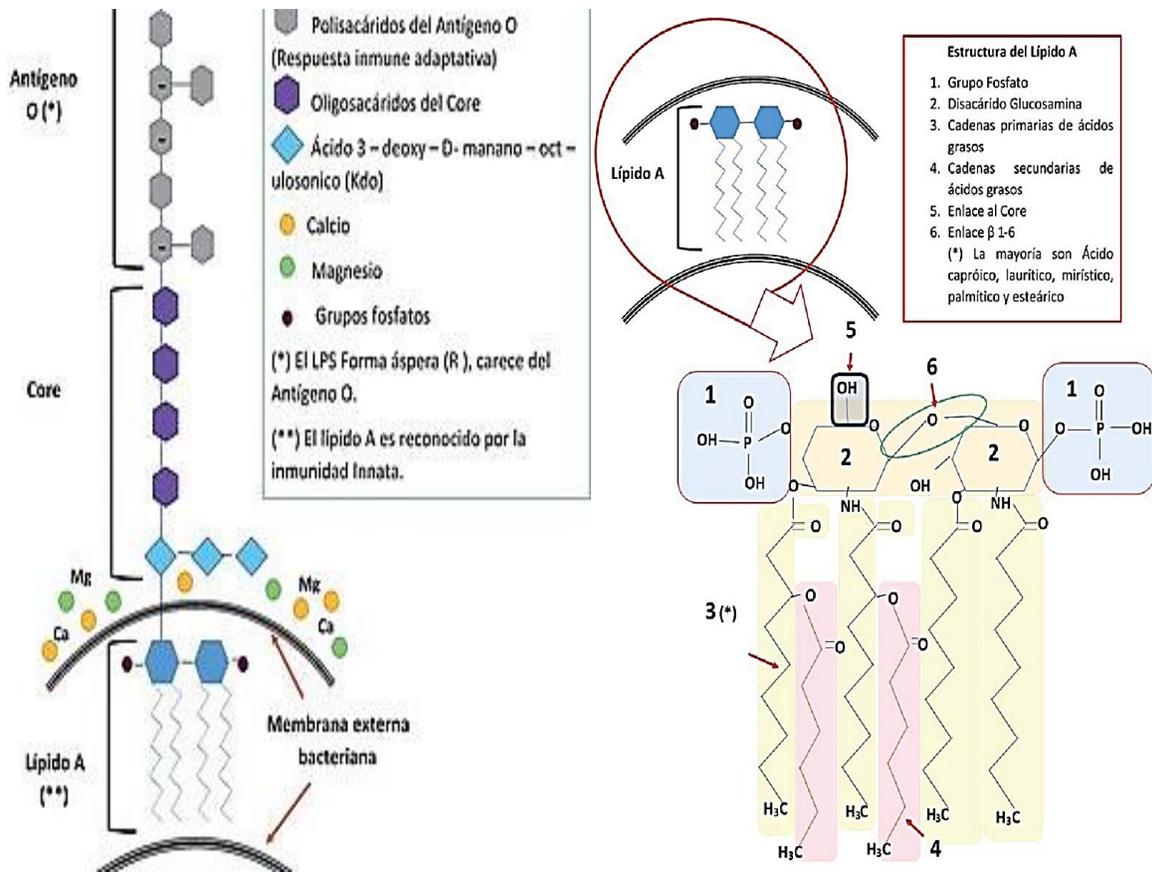


Figura 8. Estructura de LPS y estructura del Lípido A”.

Fuente: Romero S, Carlos H, Iregui A. El Lipopolisacárido 1. Rev Med Vet (Bogota). 2010;19(1)

Algunas de las funciones de los LPS se incluyen, mantenimiento y organización de la membrana externa, mimetismo molecular, inhibición de anticuerpos, variaciones antigénicas, activador del sistema inmune y mediación en la adherencia a las células y tejidos hospederos, entre otras.<sup>46</sup>

El LPS da lugar a la presencia de ácidos grasos hidroxilados en esos géneros. Por lo tanto, la presencia de los ácidos grasos C 3-OH 10:0; C 3-OH 12:0 y/o C 3-OH 14:0, indican que el microorganismo es gramnegativo.<sup>44</sup>

### 2.3.3. Función de los ácidos grasos

Los lípidos de las membranas y pared celular bacterianos no solo son componentes estructurales de las membranas, sino que también tienen una función reguladora en los procesos metabólicos en las células bacterianas. Por ejemplo, algunas isoenzimas de la proteína quinasa C son activadas por fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, que permite abrir el centro activo de la subunidad catalítica responsable de completar la fosforilación de proteínas. El fosfatidilinositol desempeña un papel clave en las vías de señalización celular del transporte de calcio. La fosfatidilserina con carga negativa regula la interacción electrostática entre proteínas y membranas, y algunos dominios lipídicos de las membranas de los sensores de temperatura durante la reacción celular sobre el estrés por calor permiten su supervivencia.<sup>47</sup>

El ADN bacteriano está conectado a la membrana celular bacteriana. Por lo tanto, el crecimiento de la célula bacteriana (síntesis primaria y replicación del ADN) depende de la condición de la membrana. Los fosfolípidos son componentes principales de las membranas celulares que definen sus propiedades fisicoquímicas, la permeabilidad de las partículas de bajo peso molecular, la actividad de las enzimas unidas a la membrana y la señalización celular.<sup>47</sup>

Los ácidos grasos se incluyen en grasas complejas como los fosfolípidos que son parte fundamental en la composición de la membrana bacteriana. Los metabolitos de los ácidos grasos juegan un papel clave en la expresión de los factores de transcripción. Estos factores de transcripción con actividad regulada de ácidos grasos interactúan con promotores específicos de genes debido a la conexión

directa con el ADN o la interacción proteína-proteína no covalente. El logro fundamental de la última década fue el descubrimiento de que la composición química del ácido graso es un regulador clave del control de la expresión génica.<sup>47</sup>

#### 2.3.4. Ejemplos de ácidos grasos en bacterias

Algunos informes de contenidos de ácidos grasos y lípidos de muchas especies bacterianas han sido ampliamente revisados. Los ácidos grasos bacterianos consisten principalmente en compuestos saturados de cadena recta o de cadena ramificada, monoenos, ácidos que contienen anillo de hidroxilo o ciclopropano.<sup>48</sup>

Los compuestos de cadena ramificada (iso, anteiso) se encuentran en grandes cantidades en *Sarcina lutea*, especies de *Bacillus sp.* y *Staphylococcus aureus*. Los ácidos grasos que contienen anillos de ciclopropano fueron reportados en *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Lactobacillus*, *Aqrobacterium tumefaciens*, especies de *Streptococcus*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Klebsiella pneumoniae*, variantes rugosas de *V. cholerae* y una cepa de *V. fetus*.<sup>48</sup>

Los ácidos grasos ciclopropanos más frecuentemente reportados son cis-9,10-metil hexadecanoato y cis-11,12-metil octadecanoato. Los ácidos grasos hidroxilo se encontraron como componentes principales en los lipopolisacáridos en *E. coli* y *Proteus sp.*<sup>48</sup>

Además, las diferencias encontradas en el contenido de ácidos grasos de especies bacterianas han llevado a algunos investigadores a sugerir que tales datos podrían resultar valiosos para la identificación de bacterias. La introducción de la

cromatografía de gases a químicos lipídicos microbianos comenzó una oleada de investigación sobre el contenido de ácidos grasos de las bacterias.<sup>48</sup>

#### **2.4. Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS)**

La cromatografía de gases ha sido hasta la fecha un invaluable auxiliar en muchos campos de la investigación científica. Dentro de las aplicaciones que tiene dicha técnica, se encuentran las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente ácidos grasos.

La cromatografía es un método de separación basado en las diferentes afinidades de los diferentes analitos, donde interactúan entre dos fases, una estacionaria (sólida o líquida) y una móvil (gas o líquido). Dado que cada analito tiene una afinidad específica en relación con estas fases, la migración entre las fases es diferente para cada uno, dando una separación a lo largo del desarrollo del proceso cromatográfico.<sup>49</sup>

Un gas inerte, como el helio, nombrado fase móvil fluye continuamente de un cilindro de gas a través del puerto de inyección, la columna y el detector. Se inyecta la muestra con una microjeringa en el puerto de inyección caliente, donde se vaporiza y se lleva a la columna, típicamente columnas de 15 a 30 m de largo y recubiertas en su interior con una delgada película líquida sólida llamada fase estacionaria.<sup>50</sup>

La muestra se distribuye en la fase estacionaria, se separa en sus componentes individuales con base en la afinidad relativa con la fase y sus presiones de vapor relativos. Después de la columna, la muestra pasa a través de un detector. Este

dispositivo mide la cantidad de la muestra, y se genera una señal eléctrica. Esta señal va a un sistema de datos que genera un cromatograma (Figura 9).<sup>50</sup>

El analito debe ser volátil a temperaturas inferiores de 350-400°C. El compuesto tiene que estar en estado gaseoso o de vapor a temperaturas inferiores de 350-400°C. Otra característica es que el compuesto debe de ser capaz de soportar altas temperaturas y ser transformado rápidamente en vapor son degradación o reacción con otro compuesto.<sup>51</sup>

Fase móvil: Puede utilizarse como gas acarreador hidrógeno, nitrógeno o helio. Este debe ser inerte y no puede ser adsorbido por la fase estacionaria.<sup>52</sup> El propósito principal del gas portador es transportar la muestra a través de la columna.<sup>50</sup>

Inducción de muestra: Es un dispositivo que permite la inducción de la muestra en la corriente del gas portador.<sup>52</sup> La muestra es inyectada en un tubo que está fabricado de vidrio o cuarzo llamado inserto. Se utiliza desactivado con un agente químico para prevenir la degradación o la adsorción de los analitos, a su paso por este. Para sellar la entrada del inyector y facilitar la introducción de la aguja se cuenta con un septum el cual está hecho de diferentes polímeros de silicona. Que soportan diferentes temperaturas de trabajo.<sup>53</sup>

Columna: componente del sistema donde ocurre el proceso de separación. La columna se encuentra en un horno cuya temperatura es controlada con precisión. Las paredes interiores de la columna están recubiertas con una película delgada de material polimérico llamado fase estacionaria.<sup>51</sup>

Fase estacionaria: es la encargada de realizar la separación de los componentes de la mezcla y esto depende de los reactivos coeficientes de reparto, o bien, de los coeficientes de actividad de dicha fase.<sup>52</sup>

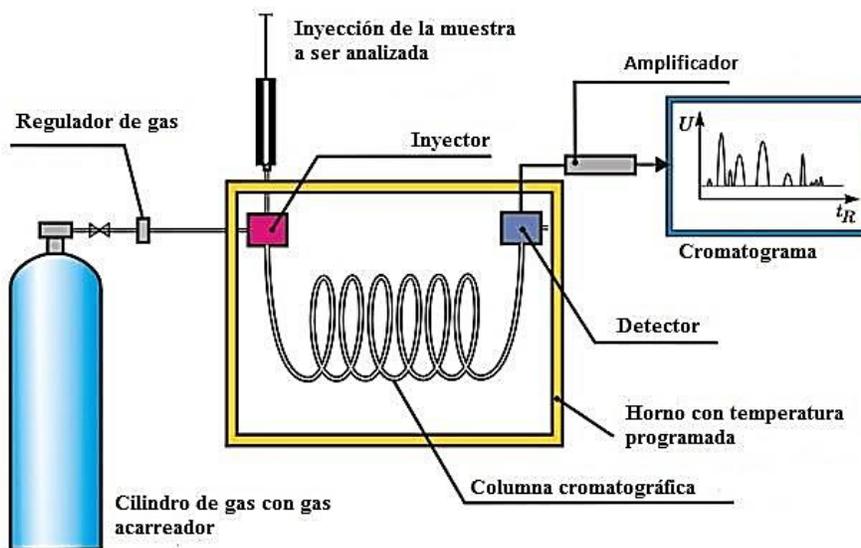


Figura 9. Esquema de cromatógrafo de gases

Fuente: Bolívar G. Cromatografía de gases: cómo funciona, tipos, partes, usos [Internet]. [consultado el 15 de mayo de 2020] Disponible en: <https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases/>

Para la identificación de los analitos se utiliza un detector; entre los detectores más utilizados en la actualidad se encuentra el espectrofotómetro de masas, en éste los componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas y líquidas. La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinadas en un único componente.

En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas.<sup>54</sup>

Es una técnica analítica que se puede utilizar selectivamente para detectar y caracterizar un compuesto. También se utiliza para determinar la composición elemental y algunos aspectos de la estructura molecular de un analito.<sup>55</sup>

## **2.5. Perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares**

El perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares, comúnmente se realiza con el método comercial llamado Sherlock Microbial Identification System (MIDI), es un sistema analítico automatizado que puede identificar bacterias en base a su perfil único de ácidos grasos celulares y únicamente se utiliza para identificar cepas puras.<sup>56</sup> Las ventajas de utilizar la técnica del perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares son:

- a. Los ácidos grasos son moléculas que se encuentran en todas las membranas celulares de las bacterias.<sup>57</sup>
- b. Los ácidos grasos se encuentren en cantidades constantes. Por lo tanto, si existen cambios en estas cantidades se puede determinar viabilidad y actividad de los microorganismos.<sup>58</sup>
- c. La presencia y cantidad de los ácidos grasos son constantes para cada especie particular de bacterias.<sup>59</sup>
- d. Es una técnica sencilla y de alta sensibilidad.<sup>54</sup>
- e. En pocos días se pueden tener datos cualitativos y cuantitativos.<sup>59</sup>

Aunque los métodos cromatográficos de gases por sí solos no pueden utilizarse para la identificación absoluta de compuestos, se pueden hacer identificaciones tentativas de componentes separados y se pueden utilizar los cromatogramas como criterios taxonómicos bioquímicos.<sup>40</sup>

En el presente estudio una metodología usando GC/MS fue aplicada para evaluar el efecto que el cloro y el ozono (desinfectantes principales para agua potable), tienen sobre el perfil de ácidos grasos de la bacteria *V. cholerae* en sus variantes lisa, rugosa y cocoide.

## 2.6. Efecto del cloro en la bacteria

El cloro es la sustancia más utilizada para el tratamiento de aguas potables, destruye los organismos objetivo por oxidación del material celular. Se puede aplicar como gas de cloro, soluciones de hipoclorito y otros compuestos de cloro en forma sólida o líquida.<sup>60</sup>

El ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito (OCl<sup>-</sup>), son los dos tipos de moléculas que conforman el llamado cloro libre. Estos dos compuestos se forman cuando los hipocloritos entran en contacto con el agua.<sup>61</sup>



Aunque ambas sustancias realizan la acción de desinfección, su comportamiento y eficacia es extremadamente distinta. El ácido hipocloroso por su parte tiene 100 veces mayor potencia que el ion hipoclorito, por lo tanto, si tuviéramos en el agua

una mayor concentración de hipoclorito que hipocloroso necesitaríamos una mayor cantidad de tiempo de contacto del producto para desinfectarlo adecuadamente.<sup>61</sup>

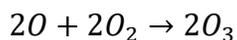
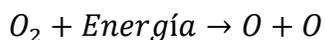
La menor eficacia de hipoclorito se debe a un hecho muy simple. Las bacterias tienen cargada negativamente la pared que las protege, y al ser el hipoclorito un ion cargado negativamente se repela, lo que dificulta la penetración de la pared bacteriana y por lo tanto la muerte de la bacteria con dificultad. En contraste el ácido hipocloroso es una molécula neutra, al no tener carga puede penetrar capas limosas, paredes celulares y capas protectoras de microorganismos matando de manera efectiva los patógenos.<sup>61</sup>

En la actualidad no se conoce bien el mecanismo de acción del cloro, pero se cree que, por su alto poder oxidante causa daños irreversibles al entrar en contacto con las células microbianas, el cloro produce dos tipos de daño en las células. Por un lado, afecta, modifica y destruye la pared celular y la integridad de la membrana y ocluye su permeabilidad, y por otro lado altera funciones celulares modificando y dañando enzimas y DNA de los microorganismos impidiendo su reproducción. Por ello, la reacción de los microorganismos ante el cloro está determinada por la resistencia de sus membranas, así como por la relativa afinidad química de este compuesto con las sustancias vitales del organismo.<sup>62,63</sup>

## **2.7. Efecto del ozono en la bacteria**

El ozono se conoce desde hace años como un fuerte agente germicida.<sup>64</sup> Se produce cuando las moléculas de oxígeno son disociadas por una fuente de

energía, los átomos de oxígeno subsecuentemente colisionan con una molécula de oxígeno para formar un gas inestable.<sup>60</sup>



El ozono es un oxidante muy fuerte. La inactivación de bacterias por ozono puede ser considerada como una reacción de oxidación. La oxidación es causada por el alto potencial redox, por la capacidad del ozono de difundirse a los sitios a ser desactivados, y por especies químicas como los radicales libres, que son reactivos por los productos de la ozonización.<sup>65</sup>

El mecanismo general de la ozonización se basa en el alto poder del ozono como oxidante protoplasmático general. Algunos mecanismos propuestos del ozono son:<sup>60</sup>

- Oxidación/destrucción directa de la pared celular con fugas de componentes celulares fuera de la célula. Este proceso es conocido como destrucción de células por lisis.<sup>60</sup>
- Reacción con subproductos radicales de la descomposición del ozono (hidroxilo: HO·, hidroperoxilo: HO<sub>2</sub>·).<sup>60</sup>
- Daño a los componentes de los ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas).<sup>60</sup>
- Ruptura de los enlaces carbono-nitrógeno que llevan a la despolimerización.<sup>60</sup>

La membrana bacteriana y la pared celular son los principales sitios de ataque del ozono<sup>65</sup>, ya sea por medio de las glicoproteínas o los glicolípidos o a través de

ciertos aminoácidos, lo que hace que el contenido celular se filtre a través de las rupturas causadas en la superficie. Luego, los radicales libres producidos durante la descomposición del ozono reaccionan con los ácidos nucleicos causando daño suficiente al ADN o ARN para lograr la inactivación.<sup>66</sup> La muerte bacteriana podría ser directamente a cambios en la permeabilidad celular, posiblemente seguido por la lisis celular. Sin embargo, es probable que la lisis no sea el principal mecanismo de inactivación, sino que sea el resultado de una concentración de oxidantes extremadamente alta o de una ozonización prolongada.<sup>65</sup>

El ozono también interrumpe la actividad enzimática de las bacterias por la acción del ozono sobre los grupos sulfhidrilo en ciertas enzimas. Vrochinskii señaló que las bacterias ozonizadas perdieron su capacidad de degradar el azúcar y producir gases.<sup>65</sup>

Más allá de la membrana y pared celular, el ozono puede actuar sobre el material nuclear. Christensen & Giese y Scott & Lesher muestran que el ozono afecta tanto a las purinas como a las pirimidinas en los ácidos nucleicos. Más recientemente, Prat et al. mostraron que las bases de pirimidina de los ácidos nucleicos de *E. coli* fueron modificadas por el tratamiento de ozono, siendo la timina más sensible que la citosina y el uracilo. También se ha encontrado el ozono causa una disminución del contenido de ácidos grasos insaturados de la bacteria.<sup>65</sup>

La efectividad de la desinfección depende sobre la susceptibilidad de los organismos blanco, el tiempo de contacto, y la concentración del ozono.<sup>60</sup>

## ANTECEDENTES

El cólera es una enfermedad diarreica producida por una infección con la bacteria *V. cholerae* de los serogrupos O1 y O139<sup>24</sup> y ha sido catalogado como una “enfermedad emergente y reemergente” que amenaza a los países en desarrollo.<sup>1</sup>

La incidencia de los brotes de cólera está muy vinculada con factores ambientales y ecológicos que son, a su vez, influenciados por las variaciones del clima a nivel global. La persistencia del agente causal del cólera depende de su capacidad para adaptarse y desarrollar estrategias de supervivencia como son la formación de biofilms, la adquisición de fenotipo rugoso o alcanzar el estado VNC (cocoide).<sup>23</sup>

La formación de biopelículas y la morfología cocoide de *V. cholerae* es un fenómeno de interés en la ecología microbiana, que influye en el ciclo de vida de este patógeno humano y en su función ecológica en el ambiente.<sup>26</sup>

### ***V. cholerae* y sus adaptaciones a las variantes rugosa y cocoide**

Numerosos estudios demuestran que *V. cholerae* es capaz de unirse a superficies tanto abióticas como bióticas formando una estructura tridimensional ordenada denominada biofilm,<sup>4</sup> que se puede crear casi en cualquier ambiente líquido. La interfase sólido-líquida entre una superficie y un medio acuoso (ej. agua) proporciona un entorno ideal para la fijación y crecimiento de microorganismos.<sup>25</sup>

Suzarte et. al <sup>4</sup> se plantea que la formación de biofilm por *V. cholerae* pudiera constituir una ventaja adaptativa para su supervivencia en los ecosistemas acuáticos y para el establecimiento de un biofilm maduro es necesario la producción de un exopolisacárido denominado EPS. Se encontró que un mutante que no

presentaba el gen para producir EPS mantenía un fenotipo liso hasta el día 22 del experimento mientras que la cepa de *V. cholerae* que si presentaba el gen mostraba colonias con morfología rugosa a partir del octavo día de incubación. Este resultado confirmó que la incapacidad de los mutantes de formar biofilm se debió a la no-producción del exopolisacárido y, además, se prevé que el hecho de que los mutantes no puedan formar el fenotipo rugoso los haga mucho más vulnerables a los cambios ambientales y consecuentemente afecte su persistencia en el ambiente acuático.

Nazar<sup>25</sup> menciona que los biofilms de las bacterias poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes planctónicas, originando bacterias fenotípicamente distintas. Y se han encontrado que hasta el 30% de los genes puede expresarse de manera diferente entre la misma bacteria desarrollada en condiciones planctónica a la de un biofilm.

Fernández et. al<sup>26</sup> evaluó la supervivencia y formación de biopelículas de *V. cholerae* aislado de origen clínico y ambiental con quitina incubado a pH de 6 y 8, a temperaturas de 30 y 37°C, produciendo la formación de biofilms para ambos aislamientos; el aislamiento ambiental mostro biofilms a las 25 horas con una arquitectura de pilares y canales formando una estructura tridimensional, mientras que el aislamiento clínico presento biofilms a las 4 horas, pero sin formación de una estructura tridimensional. Concluyó que *V. cholerae* puede sobrevivir por periodos prolongados en asociación a organismos con cubierta de quitina y formar biofilms, contribuyendo a las estrategias de supervivencia ambiental de *V. cholerae*.

Ledón et. al <sup>24</sup> describe el posible comportamiento ambiental de *V. cholerae*, a partir del estudio in vitro de sus propiedades para producir varios tipos de biopelículas, de adquirir el fenotipo rugoso y de resistir varias condiciones de estrés ambiental, como la presencia de hipoclorito de sodio, de detergentes o altas concentraciones salinas. Los resultados evidencian que las cepas atenuadas poseen características que limitan su supervivencia in vitro frente a distintas condiciones de estrés. Con respecto a cepas controles y salvajes concluyó que, en el entorno ambiental, estas características pudieran limitar su supervivencia.

Se ha propuesto el término de “viables no cultivables” para describir el estado en el cual las bacterias son detectables por conteo directo de células viables, pero que no pueden ser cultivables.<sup>1</sup>

Delíz et. al <sup>23</sup> demostró la inducción de *V. cholerae* en APA a 37°C durante 30 días y al estado VNC en agua de mar artificial suplementada con exoesqueleto de camarón y, agua de manantial, mostrando un estado VNC a los 90 días a 30°C, también indicó que la cepa atenuada de *V. cholerae*, no tiene ventajas con respecto a su parental toxigénico para sobrevivir en condiciones in vitro que simulan ambientes naturales. Su capacidad de osmotolerancia es similar, pero es más susceptible a detergentes.

Baker et. al <sup>29</sup> comentó un estudio realizado por Novitsky y Morita que demostraron que al tener limitados los nutrientes en agua de mar natural y artificial, el vibrión mostró un incremento en su cantidad, decreció en volumen celular y cambió su morfología típica de bacilo a morfología cocoide. Dichas células cocoides exhibieron

más del 99% una disminución de la respiración, así como un 40% de decremento en DNA celular, en respuesta a las condiciones de inanición. Se concluyó que estas características transmitían una ventaja selectiva, ya que dichos mecanismos permiten una supervivencia prolongada cuando las concentraciones de nutrientes son insuficientes.

Posteriormente Baker et. al.<sup>29</sup> demostró que las células de *V. cholerae* mostraron un incremento en su cantidad y una disminución del volumen (lo que se traduce en un cambio en su morfología microscópica de células vibrioides a células cocoides) en una solución basal de sales definidas y un filtrado de agua de mar, de aquí se deduce que el cambio en la morfología microscópica y los demás cambios se producen cuando hay un decremento o privación de nutrientes. Al adicionar nutrientes de viabilidad sostenida y la reversión rápida del estado cocoide a vibrioide y subsecuentemente la división celular regresan a su estado normal; lo que puede conferir una ventaja de supervivencia en un ambiente con privación transitoria de nutrientes.

Casasola<sup>67</sup> indujo a *V. cholerae* a la morfología cocoide en dos tipos de agua de mar artificial a una temperatura de 4°C durante 25 días de incubación. La inducción se llevó a cabo a partir de la suspensión bacteriana en fase exponencial o estacionaria. Comprobó que, al tomar la bacteria en la fase logarítmica, la inducción a cocoide se da entre los 8–5 días (10 días en promedio) a comparación con el uso de una suspensión en fase estacionaria, la cual tarda entre los 20 a 60 días en perder la capacidad de cultivo, también añadió que la variación de sales no influye en la inducción. Atengueño<sup>68</sup> indujo a *V. cholerae* en las mismas condiciones que

Casasola<sup>67</sup>, mostrando la morfología cocoide a los 32 días, y realizando la observación microscópica a lo largo de la inducción.

Pérez<sup>69</sup> y Luna<sup>70</sup> indujeron a *V. cholera* al fenotipo cocoide en agua de mar artificial a 4°C por un periodo de 57 días, donde observaron por microscopía óptica la evolución de bacilo a coco teniendo cinco fases, la bacilar, forma de u, forma de u elongada, forma de anillo y finalmente coco. Orta et al.<sup>71</sup> y Atengueño<sup>68</sup> también observaron las mismas fases a lo largo de su inducción.

Por *V. cholerae* rugosa y cocoide los brotes de cólera no han sido totalmente prevenidos, ponen de manifiesto que los esfuerzos en materia de saneamiento, protección de fuentes de abastecimiento y desinfección adecuada del agua, tanto en concentración de desinfectante por litro como en cobertura, han permitido que *V. cholerae*, sobreviva en las redes y sistemas formales y no formales de distribución del agua.<sup>72</sup>

Hace algún tiempo, había muy poca información cuantitativa sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos celulares, pero con el estudio de los ácidos grasos no únicamente se pueden identificar especies, géneros o comunidades de microorganismos, además se puede conocer el estado en el que se encuentran los microorganismos.<sup>58</sup> Algunos autores describieron que se producen cambios en los ácidos grasos fosfolipídicos dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren los microorganismos. Es decir, se ha reportado que los ácidos grasos fosfolipídicos de los microorganismos cambian bajo la influencia de algún factor estresante como la falta de agua (deseccación)<sup>73</sup> o cambios de temperatura.<sup>74,75</sup>

**Perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* en sus tres distintos fenotipos lisa, rugosa y cocoide**

Los lípidos de *V. cholerae* consisten en 75% de fosfolípidos y 25% de ácidos grasos libres. Los fosfolípidos principales separados por cromatografía de capa delgada se identifican tentativamente como fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina.<sup>48</sup>

Buford et. al.<sup>40</sup> compararon el perfil lipídico de 2 cepas de *V. cholerae*, (liso virulento y rugoso avirulento), utilizando cromatografía de capa fina y cromatografía gas-líquido, observando que existen diferencias en los lípidos de los vibrios lisos y rugosos. Estas diferencias se manifiestan en el aspecto físico bruto donde la cepa lisa mostro un gris-marrón y la cepa rugosa un blanco amarillento, y la cantidad de lípidos extraíbles, la cepa rugosa contenía más ácido mirístico (C14:0) y menos C18:1. En la cepa lisa, el ácido iso C16 promedió 0.9%, por otro lado, la mayor cantidad de ácidos grasos en ambas cepas fue el hexadecenoato, seguido por el palmitato y luego por octadecenoato, posteriormente en 1972 Buford<sup>48</sup> indicó que *V. cholerae* presenta principalmente los ácidos miristato (2-9%), palmitato (21-39%), hexadecenoato (34-46%), estearato (2-5%) y octadecenoato (12-26%).

Guckert et. al.<sup>76</sup> comenta que *V. cholerae* puede sobrevivir varios meses de inanición produciendo enanismo de las células para formar ultramicrobacterias, que es un fenómeno común para la supervivencia a la inanición, éste autor comparó los ácidos grasos de los cultivos de *V. cholerae* con 0, 7 y 30 días de inanición, observando en los 0 y 7 días una disminución en los ácidos grasos insaturados y un aumento en los ácidos grasos saturados y ramificados, dedujo que puede deberse a las altas

tasas de renovación de ácidos grasos cis-monoenoicos de fosfolípidos de membrana y a la disponibilidad de enzimas para el metabolismo de estos isómeros.

Asimismo, Juntao et al.<sup>77</sup> indica que se han observado que las células cocoide inducidas por frío son altamente resistentes a la inactivación térmica, baja salinidad o ácidos. Como resultado de una alta capacidad de supervivencia junto con una alta virulencia, las células cocoide son una amenaza para la salud pública. Juntao et al.<sup>67</sup> sometieron a *V. parahaemolyticus* a estrés por frío observando un aumento notable en los ácidos grasos insaturados octadecanoico (C18:1) y hexadecenoico (C16:1) y, una disminución en hexadecanoico (C16:0). Concluyó que el aumento de los ácidos octadecanoico y hexadecanoico es para mantener la fluidez de la bacteria.

### **Cambios en el perfil de ácidos grasos bacterianos sometidos a algún desinfectante**

En los años 70's Characklis procedió a estudiar légamos microbianos en sistemas de aguas industriales logrando demostrar su tenacidad y resistencia a diferentes desinfectantes, entre ellos el cloro.<sup>25</sup>

Bisbiroulas et al.<sup>78</sup> menciona que es difícil eliminar a *Listeria monocytogenes* debido a varios factores como falta de dosificación del desinfectante, limpieza insuficiente o por la presencia de biopelícula que reduce significativamente la eficacia de los desinfectantes. En tales condiciones, las bacterias se exponen regularmente a concentraciones subletales de desinfectante, y esto podría conducir a una presión selectiva para la adquisición de genes resistentes o para la adaptación de bacterias inicialmente susceptibles. Un factor muy importante es la composición lipídica de la

membrana, pues es un mecanismo de adaptación importante, que permite crecer en un ambiente estresante. Bisbiroulas et al.<sup>78</sup> sometió a *L. monocytogenes* en cloruro de benzalconio dando como resultado (i) un aumento en los ácidos grasos, principalmente de cadena saturada; (ii) ninguna alteración en el porcentaje de contenido de lípidos neutrales y lípidos polares entre los lípidos totales; (iii) una disminución en el fósforo lipídico y (iv) un aumento obvio en los fosfolípidos aniónicos (cardiolipina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol) y una disminución en los fosfoaminolípidos anfifílicos. Concluyó que estos cambios en los lípidos podrían conducir a una disminución de la fluidez de la membrana y modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular, dando cambios en la adhesión bacteriana a superficies abióticas.

Y recientemente Kovalenco et al.<sup>47</sup> sometieron a *E. coli* y *Staphylococcus aureus* a 3 desinfectantes (Barez, Biochlor y Geocide) observando un aumento de ácidos grasos después de una hora de incubación con cada desinfectante, especialmente Biochlor y Geocide que incrementó para *E. coli* un 53% y 37% respectivamente y, un 113% y 23% a *S. aureus* respectivamente. Esto lo relacionó con la disminución de fosfolípidos que son componentes principales de las membranas celulares que definen sus propiedades fisicoquímicas, la permeabilidad de las partículas de bajo peso molecular, la actividad de las enzimas unidas a la membrana y la señalización celular, lo que provocó un mayor nivel de diglicéridos, posiblemente debido a la pérdida de conexión de triglicéridos, que demuestran la eficacia de los desinfectantes, ya que los ácidos grasos son incluidos dentro del complejo grasas como los fosfolípidos y triglicéridos.

En el artículo de Kunitsky et al.<sup>44</sup> indicó un capítulo de Sasser,<sup>56</sup> que se descubrió que la eliminación de plásmidos de varias *Pseudomonas sp.* (por tratamiento con bromuro de etidio) no cambiaba el perfil de ácidos grasos. Del mismo modo, la inserción de plásmidos de otras especies de *Pseudomonas sp.* no cambió significativamente los perfiles. Como las bacterias frecuentemente intercambian plásmidos, el sistema no funcionaría bien si tales cambios causaran alteraciones en la composición de ácidos grasos. De manera similar, el tratamiento con luz ultravioleta o mutagénicos puntuales como nitrosoguanidina y metanosulfonato de etilo a niveles que matan al 99.999% de las células y crean grandes cantidades de mutantes no afecta el perfil de ácidos grasos., siempre que la tasa de crecimiento fuera relativamente normal. Esto sugiere que la composición de ácidos grasos está altamente conservada genéticamente y que solo se producen cambios significativos durante períodos de tiempo considerables. Como resultado, el mismo género y especie de bacterias de cualquier parte del mundo tendrán perfiles de ácidos grasos muy similares siempre que el nicho ecológico sea similar. La adaptación a diferentes nichos ecológicos durante largos períodos de tiempo proporciona información vital para el seguimiento de cepas mediante el perfil de ácidos grasos.

De acuerdo con las investigaciones mencionadas anteriormente, cabe destacar que es necesario observar el perfil de ácidos grasos para saber cómo está reaccionando *V. cholerae* ante diferentes factores de estrés. El presente trabajo consiste en mostrar la variación en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* variantes lisa, rugosa y cocoide. así como el efecto que el cloro y el ozono producen sobre los lípidos de la membrana celular de esta bacteria, en cada una de las variantes

## *ANTECEDENTES*

---

(morfologías) que teóricamente han desarrollado mecanismos de resistencia en el ambiente comparada con la variante “normal” (lisa). Para la determinación de ácidos grasos se utilizó la técnica MIDI-Sherlock Technical Note #101, por Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de sistemas efectivos de tratamiento de agua, especialmente en los países en desarrollo con bajo nivel socioeconómico, las fuentes naturales de agua para el consumo humano y los sistemas de distribución de agua se han convertido en algunas de las principales rutas para la transmisión de enfermedades gastrointestinales.<sup>79,80</sup>

Entre las enfermedades gastrointestinales de mayor impacto a la salud que se transmite vía hídrica se encuentra el cólera cuyo agente causal es la bacteria *V. cholerae*. Esta bacteria patógena es un habitante natural de los ambientes acuáticos, para la cual se ha reportado que sobrevive en el ambiente por su capacidad de desarrollar adaptaciones morfológicas (variantes) que les permiten adquirir cierta resistencia a condiciones de estrés ambiental. Las adaptaciones morfológicas de *V. cholerae* en el ambiente son la morfología cocoide, la cual desarrolla un estado viable pero que no es capaz de crecer en placas de agar, por lo que no se puede cultivar. Y la morfología rugosa, que se caracteriza por una alta producción de exopolisacáridos. Dichas adaptaciones le permiten a la bacteria emerger o reemerger cuando las condiciones ambientales son idóneas. Si estas bacterias llegan a las fuentes de abastecimiento de agua para consumo y no existe una adecuada desinfección existe el potencial para provocar pandemias.

La capacidad de resistencia de las bacterias como *V. cholerae* es mediada por factores estructurales y fisiológicos, los cuales actúan a diferentes niveles tanto extracelular como intracelular.<sup>79-81</sup> Entre éstos factores, a nivel de envoltura celular, se destaca el funcionamiento y comportamiento de la pared y la membrana celular.<sup>81</sup>

La membrana bacteriana es una barrera de defensa que está formada mayoritariamente por fosfolípidos que protegen los componentes internos de las células al igual que la pared celular. La bacteria *V. cholerae* al ser un organismo gramnegativo presenta una capa de LPS que contienen el lípido A, el cual actúa como endotoxina. Si se alteran estas estructuras vitales, la célula pierde su funcionamiento y por lo tanto su viabilidad.

En trabajos previos (Atengueño<sup>68</sup>; Pérez<sup>69</sup>; Luna<sup>70</sup>; Orta et al<sup>71</sup>; Yáñez et al.<sup>82</sup>).se ha demostrado el grado de inactivación que el cloro y el ozono tienen en bacterias en estados VNC y rugoso, siendo más efectivo el ozono que el cloro. No obstante, el aporte de este trabajo es observar los cambios químicos que provocan dichos oxidantes en las morfologías de resistencia desarrolladas por la bacteria *V. cholerae*. Teniendo en cuenta que los lípidos son componentes tanto estructurales como fisiológicos de la bacteria *V. cholerae*, se determinaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, los cambios que el tratamiento con cloro y ozono, comúnmente usados para la desinfección de agua potable, provocan en los ácidos grasos de las morfologías de resistencia rugosa y cocoide de esta bacteria. Los resultados obtenidos ayudarán a entender como éstos desinfectantes actúan a nivel componentes químicos de *V. cholerae* variantes rugosa y cocoide, comparada con la variante lisa (normal). Con ello será posible determinar si los mecanismos de acción del cloro y el ozono pueden contribuir para evitar la reactivación de la bacteria *V. cholerae*, a través de sus morfologías de resistencia en el ambiente.

## OBJETIVOS

### General

Determinar los cambios en el perfil de ácidos grasos de la bacteria *V. cholerae*, en sus morfologías lisa, rugosa y cocoide por efecto del tratamiento con cloro y ozono.

### Específicos

1. Inducir las morfologías rugosa y cocoide de la bacteria *V. cholerae* a partir de una cepa lisa para probar el efecto que cloro y el ozono presentan en los ácidos grasos de éstas variantes reportadas como resistentes en el ambiente.
2. Adecuar la metodología del Sistema de Identificación Microbiana Sherlock (MIS), para determinar el perfil de ácidos grasos de la bacteria *V. cholerae* en agua después de someterla a cloro y ozono para las tres morfologías. Esto debido a que sólo ha sido publicada su aplicación para cultivos de cepas lisas en agar.
3. Determinar el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* en sus morfologías lisa, rugosa y cocoide para evidenciar las diferencias existentes entre cada morfología, ya que solo se han reportado perfiles de ácidos grasos para cepas lisas.
4. Comprobar los cambios que el cloro y el ozono provocan en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* en sus morfologías resistentes rugosa y cocoide comparada con la variante lisa (normal).

## HIPÓTESIS Y TIPO DE ESTUDIO

### Hipótesis

La membrana y la pared celular bacterianas están conformadas por ácidos grasos, que bajo condiciones de estrés pueden modificarse; si la bacteria *V. cholerae* (lisa, rugosa y cocoide) se somete a procesos de tratamiento con cloro y ozono, el contenido de ácidos grasos se verá afectado en mayor o menor medida en las tres morfologías estudiadas por acción de los desinfectantes.

### Tipo de estudio

La presente investigación corresponde a un estudio experimental longitudinal comparativo, con una población de tres morfologías de *V. cholerae*, lisa, rugosa y cocoide; para observar cambios en su perfil lipídico antes y después del tratamiento con cloro y ozono.

### Variables

Independiente:

- Concentración por tiempo de contacto con cloro y ozono

Dependiente:

- Perfil de ácidos grasos después de someterse a procesos de tratamiento con cloro y ozono

**MATERIAL**

**Microbiológico**

Cepa *Vibrio cholerae* O1, Biotipo el Tor, Serotipo Ogawa

---

**Medios de cultivo y reactivos**

TSA (Agar Soya Trypticasa)

Caldo LB (Luria Bertani)

Agar BHI (Infusión Cerebro-Corazón)

Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)

APA 1% estéril (Agua Peptonada Alcalina)

Kit para tinción Gram HYCEL

ASW (Artificial SeaWater, en español Agua de Mar Artificial) estéril

SS (Solución Salina) al 0.85% estéril

SS (Solución Salina) al 2% estéril

Hipoclorito de sodio 13%

Hidróxido de sodio

Metanol

Hexano

Metil-terbutil-éter

Ácido clorhídrico

DPD (Diethyl-p-fenil-en-diamina)

Bicarbonato de sodio

Agua destilada

---

**Material de vidrio**

Botellas de dilución de 160 mL Corning

Probeta graduada de 100 mL y 1000 mL Pyrex

Matraz Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL, Pyrex

Portaobjetos

Tubos de ensayo Pyrex de 13X100 mm con tapa de rosca de baquelita

Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 20 mL

Matraz aforado de 100 y 1000 mL

Pipetas Pasteur

Celdas para espectrofotómetro Hach DR 3900

Microjeringa Hamilton 1 mL para cromatografía

Frascos ámbar con tapa de 150 y 1000 mL

---

## MATERIAL

---

### **Instrumentos**

---

Balanza analítica Bonvoisin

---

Micropipeta de 10 a 200  $\mu\text{L}$  y de 100 a 1000  $\mu\text{L}$

---

Espectrofotómetro Hach DR 3900

---

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 Series GC System

---

Espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector

---

### **Equipo**

---

Vórtex Barnstead International Touch ON-OFF Mod. Maxi Mix II

---

Incubadora VWR Scientific Inc. Mod. 1540

---

Centrifuga Thermo Electron Corporation Mod. IEC HN SII Centrifuge

---

Microscopio ZEZZ Lab. A1

---

Autoclave AESA Mod. CV 300

---

Parrilla de calentamiento con agitación Thermo Scientific

---

Ozonador Emery trailigaz

---

### **Otros**

---

Asas bacteriológicas

---

Espátulas

---

Propipetas

---

Cajas Petri de plástico de 100X15 mm

---

Cinta teflón

---

Mechero Fischer

---

Puntas para micropipeta de 200 y 1000  $\mu\text{L}$

---

Tubos Corning estériles de 50 mL

---

DIAGRAMA DE FLUJO

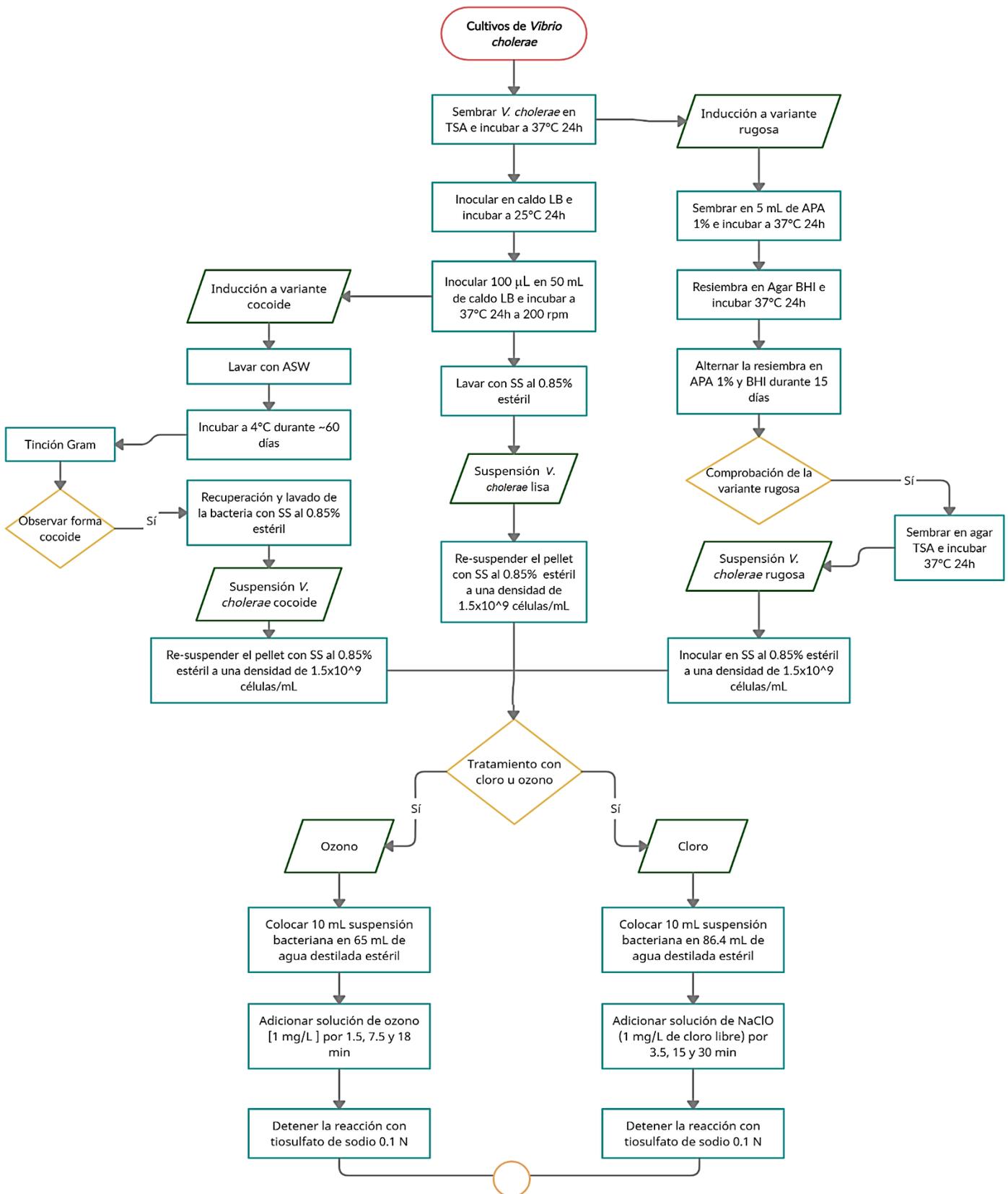
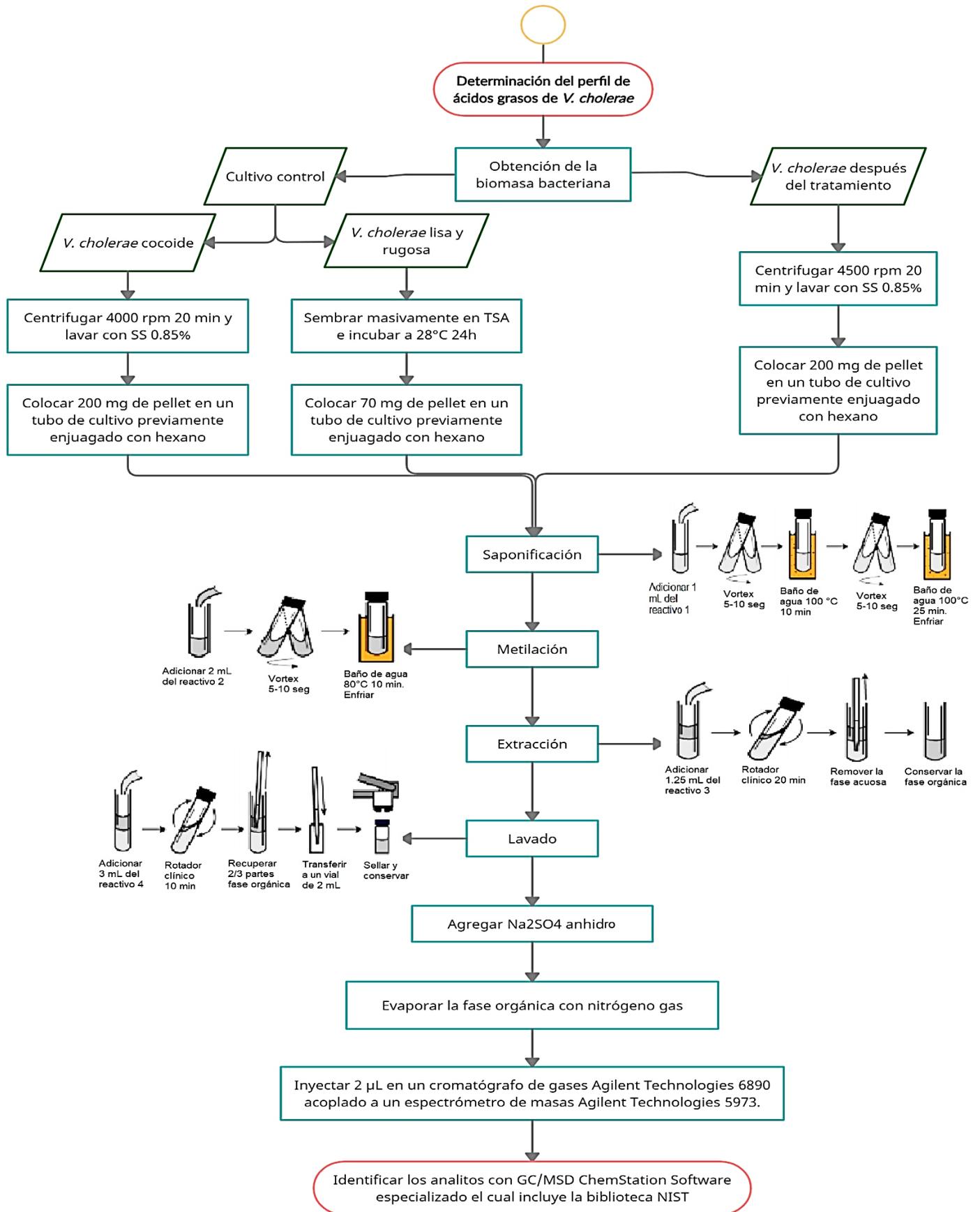


DIAGRAMA DE FLUJO



## METODOLOGÍA

Los cambios en el perfil de ácidos grasos fueron determinados mediante CG/MS en las morfologías lisa, rugosa y cocoide de la bacteria *V. cholerae*, después de someterla a procesos de tratamiento con cloro y ozono

La cepa de *V. cholerae* con la que se realizaron los experimentos fue una cepa variedad lisa del serogrupo O1, biotipo Ogawa, serotipo El Tor. La cual fue proporcionada por el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (ICMNSZ), para su recuperación, se sembró por aislamiento en agar TSA (Agar Soya Tripticasa) incubando a 37°C por 24h. Posteriormente se reactivó en caldo LB incubando a 37°C por 24h y se sembró en agar TSA en las mismas condiciones de incubación, se alternó este proceso hasta obtener colonias de 3-4 mm de tamaño. Para mantener la cepa se sembró cada 3 días en agar TSA.

A partir de la bacteria *V. cholerae* lisa se llevaron a cabo las inducciones a las variantes de resistencia rugosa y al cocoide aplicado el procedimiento que se describe a continuación.

### **Inducción de *V. cholerae* variante lisa a cocoide**

Se inoculó de una a dos colonias aisladas de *V. cholerae* morfología lisa en 50 mL de caldo LB (Luria Bertani), y se incubó a 25°C durante 24h. De este cultivo se tomaron 100 µL del cultivo y se adicionaron a 50 mL de caldo LB, se incubó a 37°C con agitación a 160 rpm durante 3h. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante.

Posteriormente se lavó el pellet con agua de mar artificial estéril (por sus siglas en inglés ASW, artificial seawater) y se centrifugó aplicando las mismas condiciones mencionadas anteriormente, el proceso se repitió hasta eliminar los restos del caldo LB. El pellet obtenido se resuspendió con 6 mL de ASW, se homogeneizó perfectamente, se tomaron 1000 µL de la preparación y se adicionaron en 40 mL de ASW, se incubaron a 4°C por un periodo de 60 a 80 días. Durante éste periodo de tiempo la inducción se estuvo monitoreando, aplicando tinción de Gram a una muestra de la suspensión bacteriana, además de llevar a cabo la verificación de pérdida de cultivo en placa en agar TSA.

### **Inducción de *V. cholerae* variante lisa a rugosa**

Se inocularon de una a dos colonias aisladas de *V. cholerae* lisa en un tubo de cultivo con 5 mL de APA (Agua Peptonada Alcalina) al 1% de NaCl, se incubó a 37°C durante 24h, posteriormente se tomó una asada y se sembró en agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) a 37°C durante 24h. Se alternó el cultivo en APA al 1% NaCl a BHI y viceversa durante 15 días.

Para comprobar que la bacteria *V. cholerae* se encontraba en su morfología rugosa, se tomó una asada del cultivo TSA, se colocó en un portaobjeto y se mezcló con una gota de solución salina al 2%, rotando suavemente durante 2 minutos, se observó presencia de grumos indicando que se encontraba en estado rugoso. Una vez inducida la bacteria se conservó en placas de agar TSA resembrando cada 15 días para mantener la cepa rugosa.

Una vez obtenida la inducción se realizaron las suspensiones bacterianas de cada morfología para el tratamiento.

### **Suspensión para el tratamiento con cloro y ozono de *V. cholerae***

#### **Suspensión de *V. cholerae* variante lisa**

Se inocularon de una a dos colonias aisladas de *V. cholerae* morfología lisa en 50 mL de caldo LB (Luria Bertani), y se incubó a 25°C durante 24h. A partir de éste cultivo se tomaron 100 µL y se adicionaron a 50 mL de caldo LB, se incubó a 37°C con agitación a 160 rpm durante 3h. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el pellet con SSI (Solución Salina Isotónica) estéril y se centrifugó nuevamente a 4500 rpm durante 20 minutos, el proceso se repitió hasta eliminar los restos del caldo LB. A partir del pellet, se preparó una suspensión bacteriana de *V. cholerae* lisa a una densidad de  $1.5 \times 10^9$  células/mL con SSI estéril.

#### **Suspensión de *V. cholerae* variante rugosa.**

La variante rugosa de *V. cholerae* se sembró de forma masiva en agar TSA y se dejó incubar a 37°C durante 24h. A partir de éste cultivo se preparó una suspensión bacteriana a una densidad de  $1.5 \times 10^9$  células/mL con SSI estéril.

#### **Suspensión de *V. cholerae* variante cocoide**

El cultivo de *V. cholerae* cocoide se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante, a partir del pellet se preparó una suspensión bacteriana a una densidad de  $1.5 \times 10^9$  células/mL con SSI estéril.

Utilizando por separado las tres suspensiones bacterianas se llevaron a cabo los tratamientos con cloro y ozono para obtener la biomasa de *V. cholerae*. Ambos tratamientos fueron aplicados a cada morfología (lisa, rugosa y cocoide).

El efecto de los oxidantes como el cloro y el ozono es evaluado mediante cinéticas de desinfección para un microorganismo en particular. Dichas cinéticas se describen con los parámetros principales de la desinfección: concentración del desinfectante, tiempo de contacto, densidad microbiana y dependiendo del caso además se consideran parámetros fisicoquímicos como la temperatura o el pH. La concentración de desinfectante y el tiempo de contacto son parte integral de la cinética de desinfección y de la aplicación práctica del concepto CT (CT es la concentración de desinfectante multiplicada por el tiempo de contacto).

Para determinar el efecto de ambos oxidantes en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae*, en el presente estudio se consideraron valores de CT ya establecidos previamente en trabajos realizados por el grupo de trabajo del Instituto de Ingeniería, UNAM para la inactivación de bacterias en estado VNC como *Helicobacter pylori* y variantes cocoide y rugosa de *V. cholerae* (Atengueño<sup>68</sup>; Pérez<sup>69</sup>; Luna<sup>70</sup>; Orta et al<sup>71</sup>; Yáñez et al.<sup>82</sup>).

### **Tratamiento con cloro**

#### **Solución de NaClO y determinación de la concentración de cloro libre.**

Se preparó una solución de NaClO, para ello se colocaron 500 µL de una solución comercial de NaClO al 13%, a un matraz volumétrico de 250 mL y se aforó con agua destilada.

Para medir la concentración de cloro libre de la solución de NaClO, se colocaron 25 µL de la solución de cloro en una celda para espectrofotómetro HACH Pocket Colorimeter™ II, chlorine Cl2, se aforó a 10 mL y se adiciono reactivo de DPD (dietil-p-fenilendiamina) para cloro libre, se midió la absorbancia a 530 nm y se calculó la concentración de cloro.

### Proceso de tratamiento con cloro

Para evaluar el efecto del cloro en el perfil de ácidos grasos de la bacteria *V. cholerae* variantes lisa, rugosa y cocoide, se prepararon suspensiones bacterianas de la siguiente manera: se vertió una alícuota de 10 mL de una suspensión bacteriana con una densidad de  $1.5 \times 10^9$  células/mL, en una botella de dilución conteniendo 86.4 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se adicionó una solución de NaClO a una concentración de 1 mg/L de cloro libre, dejando actuar por 3.5, 15 y 30 minutos considerando los valores de CT que se presentan en la tabla 2, una vez concluidos los tiempos de exposición, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de tiosulfato de sodio comercial al 0.1N.

Tabla 2. CT para cada morfología en el tratamiento de cloro

CT	Tiempo (minutos)	Concentración
3.5	3.5	1 mg/L
15	15	1 mg/L
30	30	1 mg/L

### **Tratamiento con ozono**

El método para el tratamiento con ozono se llevó a cabo en una unidad de oxidación conformada por un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA), un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA), como unidad de contacto gas-líquido se tiene una columna de burbujeo de vidrio con una altura de dos metros y la corriente producida de ozono fue enviada a una unidad de destrucción catalítica de ozono para su liberación segura al ambiente.

#### **Producción de ozono burbujeante y determinación de la concentración de ozono en líquido.**

Para la producción de ozono se aplicó una corriente eléctrica de 0.7 A y un flujo de gas ozono de 1 L/min y para determinar la concentración de ozono burbujeante, se colocaron 10 mL de solución índigo II (Anexo A) y 10 mL de solución de ozono burbujeante en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada, se tomaron 10 mL de esta solución y se colocaron en una celda para el espectrofotómetro HACH DR3900, se midió a 600 nm, que fue previamente calibrado a cero con agua destilada y como blanco una solución de 10 mL de solución índigo II aforado a 100 mL con agua destilada. Se calculó la concentración de ozono en el agua mediante la siguiente ecuación:

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

Donde:

Cr: Concentración del ozono (mg/L)

Ab: Absorbancia del blanco

Am: Absorbancia de la muestra

0.42: Factor de sensibilidad del 20000/cm para el cambio de absorbancia (600nm) por mol de ozono añadido

Vm: Volumen de la muestra (mL)

C: Recorrido de la celda, 2.54 cm

Las condiciones para producir el ozono líquido anteriormente mencionadas, nos da como resultado una concentración de 4 mg/L de ozono

### Proceso de tratamiento con ozono

Para el tratamiento con ozono, se vertió una alícuota de 10 mL de la suspensión de *V. cholerae* con densidad  $1.5 \times 10^9$  células/mL en una botella de dilución con 65 mL de agua destilada estéril, posteriormente se colocaron 25 mL de ozono líquido para obtener 1 mg/L de ozono de acuerdo, se dejó actuar por 1.5, 7.5 y 18 minutos para cumplir con los valores CT de la tabla 3. Al terminar el tiempo de contacto para cada CT, se colocó 1 mL de tiosulfato de sodio comercial al 0.1N para detener la reacción.

Tabla 3. CT para cada morfología en el tratamiento con ozono

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

Previo a los tratamientos y después de aplicar cloro y ozono se llevó a cabo la determinación de los perfiles de ácidos grasos siguiendo el método establecido por el Sistema de Identificación Microbiana Sherlock (MIS)

### Determinación del perfil de ácidos grasos bacterianos

El Sistema de Identificación Microbiana Sherlock (MIS), desarrollado y comercializado por MIDI, Inc., analiza e identifica microorganismos aislados en cultivos puros en medios artificiales (Figura 10). Sherlock utiliza un procedimiento de preparación de muestras y aplica una técnica analítica de cromatografía de

gases (GC) para producir perfiles de composición de ésteres metílicos de ácidos grasos microbianos extraídos (FAME, Fatty Acid Methyl Ester). Esta técnica es utilizada para biomasa que se obtiene a partir de cultivos bacterianos en agar. Por la naturaleza de la biomasa que se obtiene después de los procesos de tratamiento con cloro y ozono fue necesario adecuar la técnica, es por ello por lo que se utilizó la técnica MIDI-Sherlock Note #101 con algunas modificaciones.<sup>39</sup>

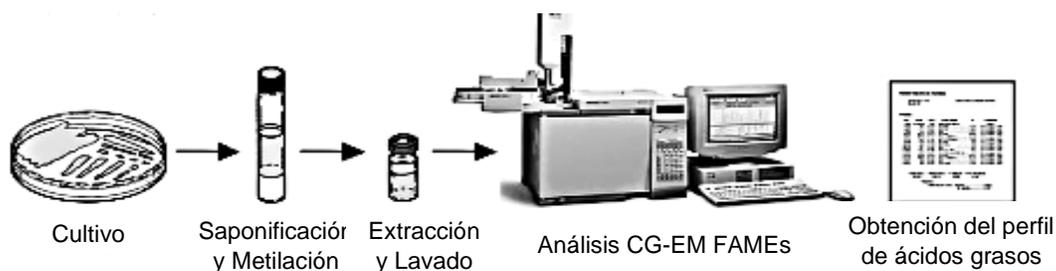


Figura 10. Proceso general de la técnica MIDI-Sherlock.

### **Obtención de la biomasa de *V. cholerae* antes del tratamiento con cloro y ozono**

#### **Cultivo de muestra control de *V. cholerae* lisa y rugosa (sin tratamiento)**

Se sembró de forma masiva en agar TSA *V. cholerae* (lisa o rugosa) y se dejó incubar a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h, de este cultivo se tomaron 70 mg de muestra en un tubo de cultivo de 13x100 mm previamente enjuagado con hexano. Cabe hacer mención que la metodología indica 40 mg, no obstante, al realizar pruebas para el montaje de la metodología se obtenían perfiles de ácidos grasos con picos poco definidos, aun concentrando la muestra por evaporación con nitrógeno gas, por lo que se decidió aumentar la cantidad de biomasa.

### **Cultivo de *V. cholerae* cocoide (sin tratamiento)**

El cultivo inducido de *V. cholerae* cocoide en ASW se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante, se realizó un lavado con SSI estéril al pellet obtenido.

Se colocaron 200 mg de *V. cholerae* cocoide en un tubo de cultivo de 13x100 mm previamente enjuagado con hexano. Es preciso hacer notar que para éste caso fueron necesarios 200 mg de biomasa, y que con menos cantidad no fue posible obtener picos definidos en el cromatograma.

### **Obtención de la biomasa de *V. cholerae* (lisa, rugosa y cocoide) después del tratamiento con cloro y ozono**

La suspensión obtenida después del tratamiento con cloro u ozono se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con SSI estéril al pellet obtenido.

Se colocaron 200 mg de *V. cholerae* en un tubo de cultivo de 13x100 mm previamente enjuagado con hexano.

### **Saponificación**

A cada tubo con muestra se le colocó 1 mL del reactivo 1 (Anexo A). Se sellaron perfectamente con cinta teflón. Se agitaron vigorosamente con un vortex durante 5 a 10 segundos y se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente, se volvieron a agitar durante 5 a 10 segundos y se regresaron al baño de agua a 100°C durante 25 minutos.

### **Metilación**

Los tubos se dejaron enfriar y se agregaron 2 mL del reactivo 2 (Anexo A). Se sellaron perfectamente con cinta teflón. Se agitaron en vortex durante 5 a 10 segundos y se colocaron en baño de agua por 10 +/- 1 minutos a 80 +/- 1°C.

### **Extracción de los ésteres metílicos**

Los tubos se dejaron enfriar y se les adiciono 1.25 mL del reactivo 3 (Anexo A). Se pusieron en un rotador clínico por 20 minutos y posteriormente se desechó la fase acuosa del fondo; la capa superior (fase orgánica) donde se encuentran los ésteres metílicos se conservó en el tubo.

### **Lavado**

Para el lavado, se adicionaron 3 mL del reactivo 4 (Anexo A) a la fase orgánica y se colocaron en el rotador clínico durante 10 minutos. Posteriormente, se recuperaron 2/3 de la fase orgánica (capa superior) y se colocaron en viales de vidrio de 2 mL.

### **Análisis cromatográfico**

A la fase orgánica que contiene los ácidos grasos esterificados se agregaron granos de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua de la muestra. Posteriormente se evaporó a 20 µL con nitrógeno gas, a partir de los cuales se tomaron 2 µL y se inyectaron usando una micro jeringa Hamilton en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5973. Para la separación de los ácidos grasos se utilizó una columna DB-5ms de sílice fundido con una longitud de 30 metros, un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de 0.25 µm; como gas acarreador se utilizó helio con 99.9995% de pureza.

El programa de temperaturas para la separación de los analitos en la columna fue: temperatura inicial de 150°C con una rampa de 4°C/minuto hasta alcanzar 250°C (5 min), después del análisis la temperatura se incrementó hasta 300°C durante 5 minutos para limpiar la columna, la temperatura del inyector fue de 250°C. El detector de masas (espectrofotómetro de masas) se operó a 280°C.

Para la operación del GC/MS se utilizó una estación de trabajo que cuenta con la instalación del GC/MSD ChemStation Software especializado el cual incluye la biblioteca NIST para la identificación de los analitos. Dicha identificación también estuvo soportada por la inyección de un estándar de ácidos grasos volátiles FAME (Fatty Acid Methyl Ester) con 26 ésteres metílicos en metil-caproato para la identificación de bacterias SUPELCO 4-7080. El estándar se analizó bajo las mismas condiciones de las muestras y ayudó principalmente en establecer los tiempos de retención de los ácidos grasos de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar los cambios en el perfil de ácidos grasos de la bacteria *V. cholerae*, por efecto del tratamiento con cloro y ozono, fue necesario llevar a cabo la inducción a las morfologías rugosa y cocoide a partir de una cepa lisa. Se sabe que *V. cholerae* en respuesta a tensiones medioambientales tiene la capacidad de desarrollar variantes de resistencia al ambiente como las cepas rugosas y el estado VNC (células cocoides), ambas con capacidad de formar biopelícula. Para el desarrollo de éstas cepas de resistencia intervienen factores estructurales y fisiológicos, que funcionan tanto a nivel extracelular como intracelular, incluyendo el funcionamiento y comportamiento de la pared y la membrana celular (formada mayoritariamente por fosfolípidos).<sup>79-81</sup>

En éste contexto, resulta relevante determinar si componentes vitales como los ácidos grasos, presentan cambios por acción del cloro y el ozono en las variantes rugosa y cocoide reportadas como resistentes en el ambiente.

### **Inducción a *V. cholerae* morfología rugosa**

Con el fin de estresar a la bacteria y llevarla a un estado de resistencia, se llevó a cabo la inducción de la cepa *V. cholerae* rugosa exponiendo una cepa lisa en APA al 1%, alternando el sembrado con agar BHI. Después de 15 días se observó una nata densa de color amarillento en APA 1%, en BHI se observaron colonias blancas opacas de borde irregular, con pliegues rugosos sobre la superficie y de consistencia mucosa (Figura 11). Posteriormente para confirmar la inducción del fenotipo rugoso, se tomó una colonia del cultivo y se le adiciono una gota de solución

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

salina al 2%, agitando la lámina durante 2 minutos, se mostró presencia de grumos, indicando que la cepa correspondía a la morfología rugosa.<sup>81</sup>

a)



b)

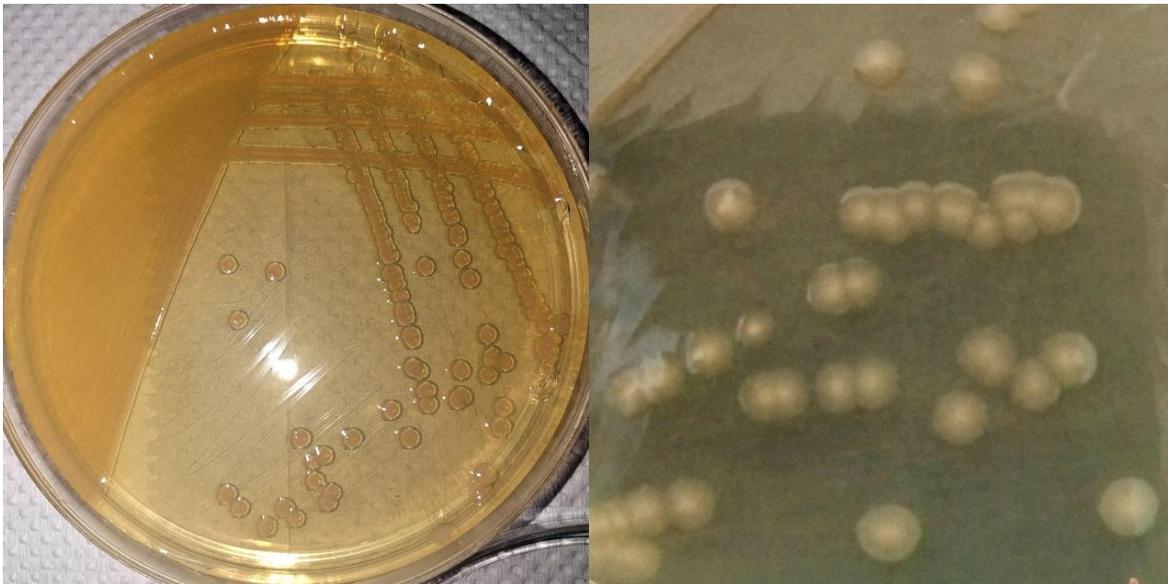


Figura 11. Diferencias en los fenotipos liso y rugoso de *V. cholerae*. a) *V. cholerae* rugosa en agar TSA a 37°C durante 24 h; b) *V. cholerae* lisa en agar TSA a 37°C durante 24 h

Los resultados de la inducción son consistentes con varios autores que han realizado la inducción de *V. cholerae* lisa a su fenotipo rugoso en condiciones similares. Pérez<sup>69</sup> y Luna<sup>70</sup> sometieron a la cepa *V. cholerae* lisa en APA al 1 y 2% de NaCl a 37°C, posteriormente realizaron la confirmación con solución salina al 2%. Suzarte et al.<sup>4</sup> colocaron a *V. cholerae* en agua peptona alcalina (1% NaCl, 1% peptona, pH 8,5) a 37°C. Ledón et al.<sup>24</sup> indujeron a *V. cholerae* en APA a 37°C con sembrados alternos en agar LB, y Delíz et al.<sup>23</sup> también utilizó APA a 37°C para inducir al fenotipo rugoso, sin la utilización de NaCl.

Los días de inducción en estos estudios fueron desde los 8 días hasta los 30 días, el aspecto del fenotipo rugoso mostro una forma irregular opaca y un borde ondulado.

Luna<sup>70</sup> menciona que *V. cholerae* es capaz de cambiar su morfología de lisa a rugosa con diferentes condiciones. Wai et al.<sup>86</sup> indujo *V. cholerae* a rugosa con privación de sales en medio M9 durante 2 meses a 16°C, posteriormente se sembró en agar LB a 37°C y, Yildiz et al.<sup>87</sup> lo realizaron limitando los nutrientes en medio M9, suplementado con glucosa e incubado a 30°C por 20 días. Ambos estudios se realizaron con *V. cholerae* El Tor. De acuerdo con esto Nazar<sup>25</sup> indico que la formación y estructura de un biofilm depende de las características del sustrato al cual se une y a otros aspectos del medio ambiente, así cada biofilm es diferente.

Por su parte Fernández et al.<sup>26</sup> en su ensayo mostraron la capacidad de supervivencia de *V. cholerae* por períodos de tiempo prolongados en asociación a sustratos quitinosos y formación de biofilms en un medio acuático, contribuyendo así al conocimiento de las estrategias de supervivencia ambiental y posibles vías de

transmisión a los humanos de esta especie bacteriana de importancia para la salud pública.

Como forma de supervivencia *V. cholerae* puede cambiar su fenotipo de colonias lisas a rugosas manteniendo su virulencia, también exhibe una elevada resistencia a agentes tales como el cloro.<sup>4</sup>

### **Inducción a *V. cholerae* morfología cocoide**

La inducción de *V. cholerae* lisa a la morfología cocoide se realizó en agua de mar artificial a 4°C, se monitoreo cada tercer día con tinción de Gram y microscopio óptico, con el fin de observar el proceso de transformación de la bacteria y el periodo de tiempo que tarda en cambiar la morfología. Durante el monitoreo se observaron 5 etapas morfológicas (Figura 12) de *V. cholerae*. El primer día solamente se observó la forma de bacilo, al día 19 se encontró la forma de “U”, al día 32 se observó la forma de “U elongada”, al día 49 se empezó a apreciar forma de “anillo” y a los 72 días se observó la transformación a coco de un 90 a 95% de las células. Se realizó verificación de prueba de cultivo en TSA, observando a los ~63 días que la bacteria no crecía en el medio.

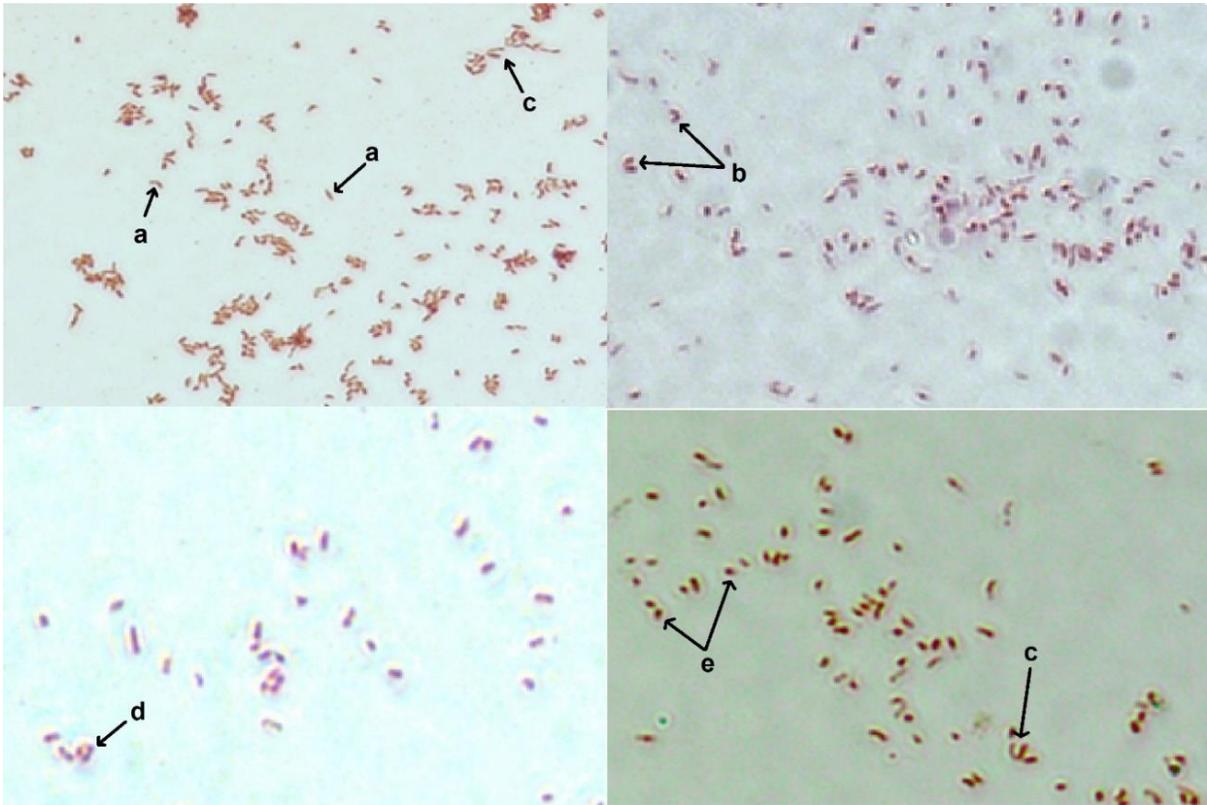


Figura 12. Proceso de inducción de *V. cholerae* al cocoide monitoreado con tinción Gram en microscopio óptico con objetivo 100X. Morfología microscópica a) bacilo, b) forma de “U”, c) forma de “U” elongada, d) forma de anillo y e) coco.

Diversos autores han observado el comportamiento de la inducción de la bacteria a la morfología cocoide en déficit de nutrientes en agua de mar artificial variando las proporciones de las sales y a las temperaturas, Ravel et al.<sup>88</sup>, Krebs et al.<sup>89</sup>, Baker et al.<sup>29</sup>, Casasola<sup>67</sup> y Atengueño<sup>68</sup> fueron los que indujeron en menor tiempo al fenotipo cocoide de los 6 días a los 32 días; en cambio Pérez<sup>69</sup>, Luna<sup>70</sup>, Grim et al.<sup>90</sup>, Casasola<sup>67</sup> y Sung et al.<sup>91</sup> indujeron en mayor tiempo a la bacteria de los 40 hasta los 102 días.

Por otro lado, Delíz et al.<sup>23</sup> realizó la inducción a la morfología cocoide de *V. cholerae* con agua de mar artificial suplementada con exoesqueleto y agua de

manantial con déficit de nutrientes, incubándose a 30°C durante 90 días, mostrando un estado VNC en las dos condiciones, pero induciéndose más rápido la de agua de manantial ya que estuvo en déficit de nutrientes.

Casasola<sup>67</sup> y otros autores<sup>68-70</sup> observaron las cinco fases de cambio morfológico en *V. cholerae* a nivel microscópico, después de la forma de bacilo inicia la forma de u y terminando en forma de coco. La morfología cocoide también considerado estado VNC, por lo que Casasola<sup>67</sup> y otros autores<sup>68-70</sup> realizaron verificación de pérdida de cultivo durante su inducción observando la disminución del crecimiento en la bacteria. Casasola<sup>67</sup> indico que al tomar en la fase logarítmica el cultivo liso, la inducción del estado VNC se da entre los 8 a los 15 días, a comparación de la fase estacionaria la cual tarda entre 20 a 60 días en perder la capacidad de cultivo, y que la composición del agua de mar artificial no afecta el tiempo de inducción.

Para ejemplificar de manera más detallada las etapas de conversión de una forma bacilar de las células a una cocoide, en la figura 13 se muestran imágenes de microscopía electrónica de la bacteria *Helicobacter pylori* publicadas por Orta et al.<sup>71</sup>

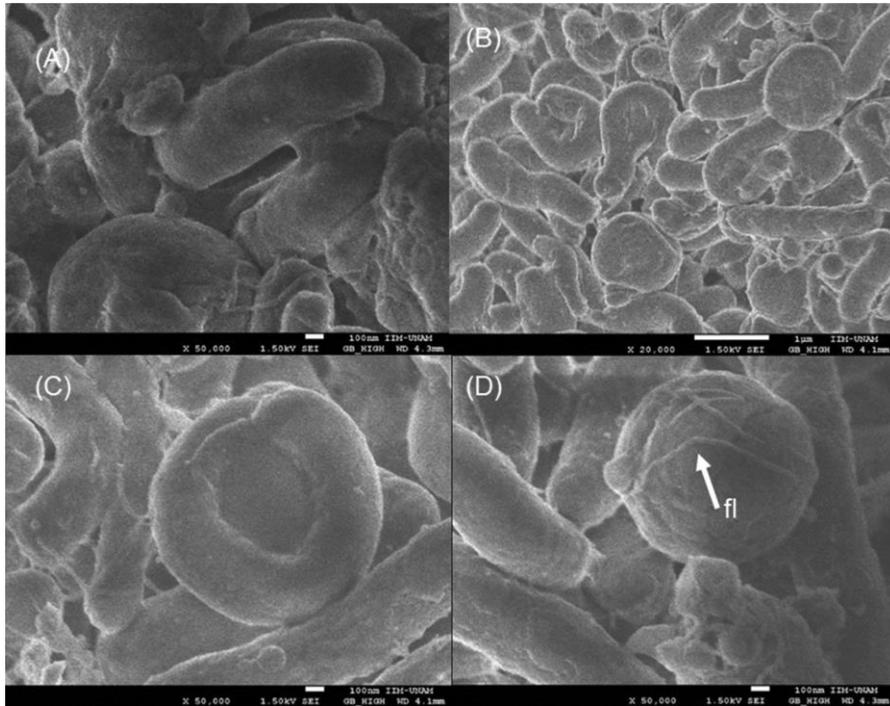


Figura 13. Micrografías electrónicas de la transformación morfológica de *H. pylori* en solución acuosa. Bacilar (A), forma de U (B); forma de anillo (C); y forma de coco (D).

*V. cholerae* ante condiciones ambientales de estrés, que le impiden mantener el crecimiento normal, puede entrar en un estado de dormancia conocido como VNC. La escasa disponibilidad de nutrientes (inanición) puede desencadenar esta estrategia de supervivencia. Las células de *V. cholerae* muestran un incremento en su cantidad y una disminución del volumen (lo que se traduce en un cambio en su morfología microscópica de células vibrioides a células cocoides) en una solución basal de sales o un filtrado de agua de mar, de aquí se deduce que el cambio en la morfología microscópica y los demás cambios se producen cuando hay un decremento o privación de nutrientes. En esta condición fisiológica las bacterias exhiben la función metabólica detectable, pero no son cultivables por métodos de cultivo convencionales. Esta imposibilidad de cultivo de las células de este

microorganismo, que ha sido asociada con la capacidad de agregarse en biopelículas, incluso después de haber estado no cultivable durante más de un año, es un aspecto relevante en la ecología de *V. cholerae*. Varios estudios han mencionado su importancia en las epidemias estacionales de cólera.<sup>23,29</sup>

Con el estudio de los ácidos grasos celulares no únicamente se pueden identificar especies, géneros o comunidades de microorganismos, además se puede conocer el estado en el que se encuentran los microorganismos.<sup>58</sup> Algunos autores describieron que se producen cambios en los ácidos grasos fosfolipídicos dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren los microorganismos. Es decir, se ha reportado que los ácidos grasos fosfolipídicos de los microorganismos cambian bajo la influencia de algún factor estresante como la falta de agua (deshidratación)<sup>73</sup> o cambios de temperatura, etc.<sup>74,75</sup>

### **Perfil de ácidos grasos de las tres morfologías de *V. cholerae***

Con la finalidad de conocer las variaciones en el perfil de ácidos grasos de los diferentes fenotipos estudiados de *V. cholerae*, se obtuvo el cromatograma del perfil de ácidos grasos mediante GC/MS.

El perfil de ácidos grasos obtenido de *V. cholerae* lisa se comparó con los obtenidos en la literatura<sup>92-96</sup>, además de apoyar su identificación con la biblioteca NIST usando el GC/MSD ChemStation Software especializado y comparando los tiempos de retención de cada éster metílico con el estándar FAME (Fatty Acid Methyl Ester con 26 ésteres metílicos SUPELCO 4-7080).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 14 se muestran los perfiles del fenotipo liso, rugoso y cocoide de *V. cholerae*, se puede observar que la abundancia de los de ácidos grasos entre los tres perfiles fue proporcional. No obstante, a que los perfiles de ésteres metílicos son similares en las tres morfologías, se observó que para *V. cholerae* variante rugosa hay un incremento en la abundancia de los ácidos grasos en relación con la encontrada para la variante lisa. Respecto a la morfología cocoide se observó exactamente lo contrario, una disminución considerable en la abundancia de los ácidos grasos comparada con la variante lisa; incluso para los ácidos pentadecanoico, heptadecenoico y el heptadecanoico, la abundancia sólo fue encontrada a nivel de trazas (Tabla 4).

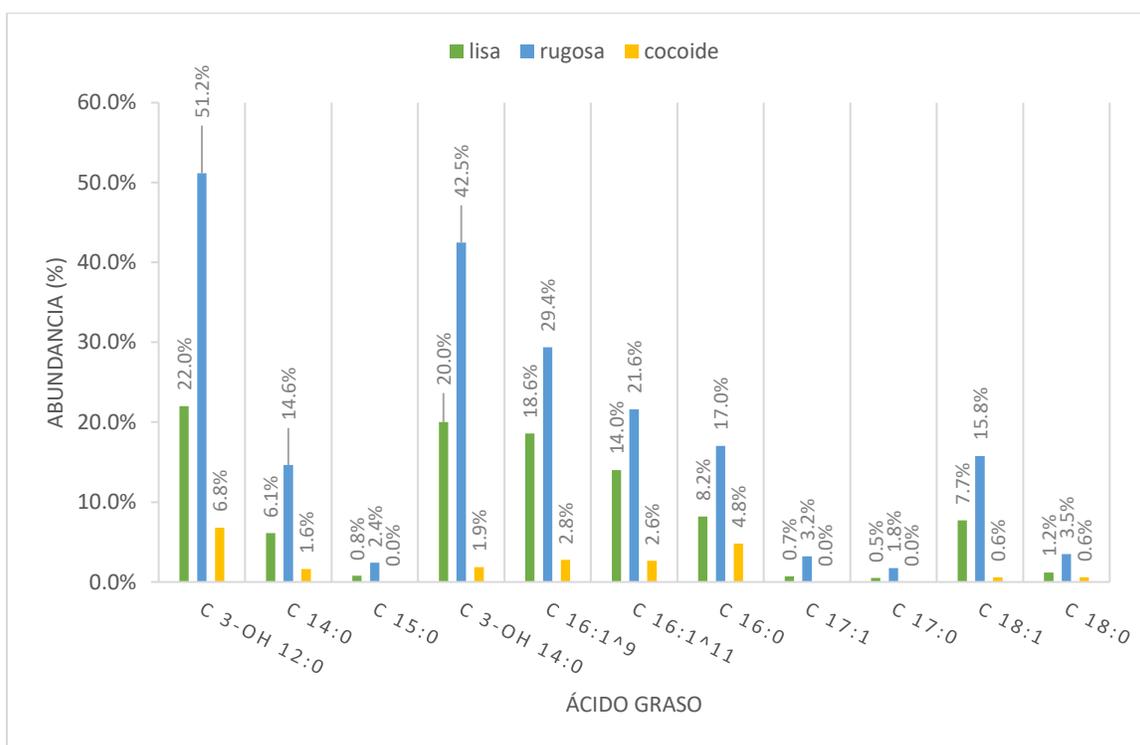


Figura 14. Porcentaje de ácidos grasos de *V. cholerae* variantes lisa, rugosa y cocoide

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con lo revisado en la bibliografía, tales variaciones pueden deberse a las condiciones del cultivo. Para la variante lisa las condiciones de cultivo fueron como se realizan comúnmente, es decir en placa de agar con colonias cremosas de tamaño homogéneo. Mientras que para la variante rugosa se tienen colonias rugosas pegajosas con abundante cantidad de moco, el cual está reportado como excreción de exopolisacáridos. Y para la variante cocoide, no se tiene realmente un cultivo ya que son no cultivables, lo que se tiene es una suspensión bacteriana en la cual el tamaño de células se reduce considerablemente en relación con las células en cultivo en placa de agar. Con relación a ello, en la tabla 4 se presentan los porcentajes calculados para las abundancias de cada variante de *V. cholerae*.

Tabla 4. Porcentaje de ésteres metílicos de los ácidos grasos para *V. cholerae* variantes lisa, rugosa y cocoide

		ÁCIDOS GRASOS (%)										
		C 3-OH 12:0	C 14:0	C 15:0	C 3-OH 14:0	C 16:1Δ9	C 16:1Δ11	C 16:0	C 17:1	C 17:0	C 18:1	C 18:0
MORFOLOGÍA	Lisa	22.0	6.1	0.8	20.0	18.6	14.0	8.2	0.7	0.5	7.7	1.2
	Rugosa	51.2	14.6	2.4	42.5	29.4	21.6	17.0	3.2	1.8	15.8	3.5
	Cocoide	6.8	1.6	0.001	1.9	2.8	2.6	4.8	0.001	0.001	0.6	0.6

Los ácidos grasos que más abundan en *V. cholerae* en sus tres morfologías de mayor a menor respectivamente son: el 3-hydroxydodecanoico, el 3-hydroxytetradecanoico, el cis-9-hexadecenoico y el cis-11-hexadecenoico. El

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aumento que presento la morfología rugosa de éstos ácidos grasos en relación a la variante lisas fue de 133%, 113%, 58% y 54% respectivamente. Para la morfología cocoide, aunque son los ácidos con mayor proporción en su perfil, la abundancia es menor que en la variante lisa, teniendo una disminución del 69%, 91%, 85% y 81% respectivamente. Así mismo los ácidos grasos menos abundantes en general en los perfiles de ácidos grasos de las tres variantes son el ácido el pentadecanoico, el heptadecenoico y el heptadecanoico. Los cuales sufren un incremento en la variante rugosa cuantificado en 200%, 356% y 250% respectivamente. Al ser éstos ácidos grasos los menos abundantes en el perfil, se observó que en la morfología cocoide sólo se cuantifican a nivel de trazas o incluso no fueron detectados en el perfil (Tablas 4 y 5).

Tabla 5. Aumento y/o disminución de la abundancia en porcentaje de cada ácido graso de las morfologías rugosa y cocoide teniendo como referencia la abundancia de la variante lisa de *V. cholerae*.

		ÁCIDOS GRASOS (%)										
		C 3-OH 12:0	C 14:0	C 15:0	C 3-OH 14:0	C 16:1Δ9	C 16:1Δ11	C 16:0	C 17:1	C 17:0	C 18:1	C 18:0
MORFOLOGÍA	Rugosa	+133	+140	+200	+113	+58	+54	+108	+356	+250	+105	+191
	Cocoide	-69	-73	-99.9	-91	-85	-81	-41	-99.9	-99.9	-92	-52

Lo reportado en la bibliografía respecto a los perfiles de ácidos grasos de *V. cholerae* en sus diferentes variantes indica lo siguiente, los datos de Urdaci et al.<sup>92</sup> y Lambert et al.<sup>93</sup> revelan que el ácido que se encuentra en mayor cantidad en la

morfología lisa es el hexadecenoico. No obstante, en el presente estudio se encontró que los ácidos grasos más abundantes en la morfología lisa con un porcentaje similar fueron el 3-hydroxydodecanoico (22.8%), el 3-hydroxytetradecanoico (20.0%), el cis-9-hexadecenoico (18.6%). Dichos porcentajes, se mantuvieron en proporción para las morfologías rugosa y cocoide. Al respecto MIDI-Sherlock, indica que la forma de cultivo produce una variación en la abundancia del perfil de ácidos grasos de las bacterias, ya que modifican sus ácidos grasos para que su membrana y pared celular tengan fluidez para moverse,<sup>39</sup> completando Cho et al.<sup>34</sup> comenta que la concordancia en la naturaleza de los principales ácidos grasos de cada bacteria, existen diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición y esto quizás no sea sorprendente teniendo en cuenta el marcado efecto que las condiciones culturales pueden tener sobre la composición lipídica. Lo relevante es que, aunque fue necesario realizar ciertas adaptaciones a la metodología publicada por MIDI-Sherlock los perfiles de las tres variantes fueron cuantitativa y cualitativamente muy similares.

Al respecto otros autores como Cho et al.<sup>34</sup> quien extrajo los lípidos específicamente de la pared celular de las bacterias gramnegativas, indicó que el principal ácido graso es el ácido hexadecanoico y los ácidos ciclopropanos también constituyen a la pared de las gramnegativas, pero no se logran identificar por la abundancia que presenta dependiendo la bacteria. En el presente estudio para las variantes lisa y cocoide de *V. cholerae* se encontraron trazas de ciclopropanos, cuya presencia no mostró constancia en los cromatogramas de las repeticiones que se realizaron, por

lo que no se tomaron en cuenta para discernir las variaciones después de la exposición a cloro y ozono.

Por su parte y tomando en cuenta lo decisivo de las condiciones de cultivo en la abundancia de los ácidos grasos, Brian et al.<sup>40</sup> compararon los perfiles de *V. cholerae* entre el fenotipo rugoso y el liso, encontraron que la cepa rugosa contenía en mayor abundancia el ácido tetradecanoico y menos abundancia del trans-9,12-octadecenoico & cis-11-octadecenoico. En la cepa lisa, el ácido iso-hexadecenoico promedió 0.9%, la mayor cantidad de ácidos grasos en ambas cepas fue el hexadecenoico, seguido por el hexadecanoico y luego por octadecenoato. Gucker et al.<sup>76</sup> observó en los 0 y 7 días una disminución en los ácidos grasos insaturados y un aumento en los ácidos grasos saturados y ramificados, discernió que puede deberse a las altas tasas de renovación de ácidos grasos cis-monoenoicos de fosfolípidos de membrana y a la disponibilidad de enzimas para el metabolismo de estos isómeros. Asimismo, Juntao et al.<sup>77</sup> sometió a *V. parahaemolyticus* a estrés por frío observando un aumento notable en los ácidos grasos insaturados octadecanoico y hexadecanoico y, una disminución en hexadecenoico. Con relación a ello, las variaciones en la abundancia de los ácidos grasos, presentadas para las morfologías resistentes rugosa y cocoide de *V. cholerae* respecto a la morfología lisa, pueden deberse a las estrategias que la bacteria desarrolla para adaptarse a las condiciones ambientales tales como fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos.<sup>25</sup>

De acuerdo con lo anterior, las condiciones de cultivo en este experimento fueron diferentes a los ensayos realizados por estos autores, ya que el fenotipo cocoide fue cultivado en agua de mar artificial a 4°C y el fenotipo rugoso en APA al 1% NaCl a 37°C. En general se observó que la morfología rugosa tiende a obtener más abundancia en sus ácidos grasos a comparación de las morfologías cocoide y lisa debido a la biofilm que presenta, ya que le proporciona una protección, además de que los cambios que sufre la bacteria durante su inducción no implican condiciones, conservando su capacidad de cultivo. En comparación, la morfología cocoide sufre mayor efecto por el estado de inanición y crecimiento al someterse a temperaturas extremas de 4°C, produciendo alteraciones tanto en la membrana como en el metabolismo propio para lograr su supervivencia ante factores estresantes. Las bacterias presentan una alta capacidad adaptativa al medio donde se desarrollan, lo que les permite ajustarse a condiciones adversas y garantizar así su supervivencia. Entre estos fenómenos adaptativos se destaca la resistencia a los desinfectantes.<sup>80</sup> Para evaluar el efecto del cloro y el ozono en las morfologías resistentes rugosa y cocoide comparadas con la morfología lisa (normal), los perfiles de ácidos grasos obtenidos fueron utilizados como control, de tal manera que se comparó tanto la variación en el perfil como la variación en la abundancia de cada ácido graso después de los tratamientos.

### **Efecto del cloro y el ozono en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* variante lisa**

La figura 15, ejemplifica el cambio en el perfil de ácidos grasos de la variante lisa de *V. cholerae* cuando fue sometida a los tratamientos con cloro (Figura 15a) y ozono (Figura 15b). Cuando se aplicó cloro se observó una evidente disminución en la

abundancia de los ácidos grasos desde el CT 3.5 mg Cl<sub>2</sub> min/L, con excepción del ácido hexadecanoico que aumentó un 59.1% respecto al control y el octadecanoico que aumentó 4.4%. El mismo comportamiento se observó a los 15 y 30 minutos aplicando 1 mg/L de Cl<sub>2</sub>; si bien la disminución en general de los ácidos grasos fue más evidente al incrementar el tiempo, hubo ácidos grasos como el hexadecanoico y hexadecenoico que fueron más abundantes al minuto 30 que al 15. No obstante, con el tiempo de exposición de 30 minutos los ácidos heptadecanoico, pentadecanoico y heptadecenoico, ya no fueron observados en el cromatograma. Respecto al tratamiento con ozono, se observó que no hay un comportamiento homogéneo de incremento o disminución en las abundancias de los ácidos grasos con relación a los tiempos de exposición. Con el valor CT de 1.5 mg O<sub>3</sub> min/L se observó una disminución en los ácidos grasos respecto al control, con excepción de 3 ácidos grasos que incrementaron su abundancia: hexadecanoico (27%), heptadecenoico (130.1%) y heptadecanoico (185.7%). Con el valor CT de 7.5 mg O<sub>3</sub> min/L hay un incremento en la abundancia de los ácidos grasos 3-hydrohdodecanoico (12.5%), tetradecanoico (3.5%), pentadecanoico (197.8%), cis-11-hexadecenoico (27.6%), hexadecanoico (132.6%) y el octadecanoico (173.5%), mientras que los ácidos heptadecanoico y heptadecenoico ya no estuvieron presentes. Con un CT de 18 mg O<sub>3</sub> min/L se observó un incremento de los ácidos pentadecanoico (591.3%) y hexadecanoico (110%), mientras que los ácidos heptadecanoico y heptadecenoico ya no estuvieron presentes al igual que el trans-9,12-octadecenoico & cis-11-octadecenoico (Tabla 6).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

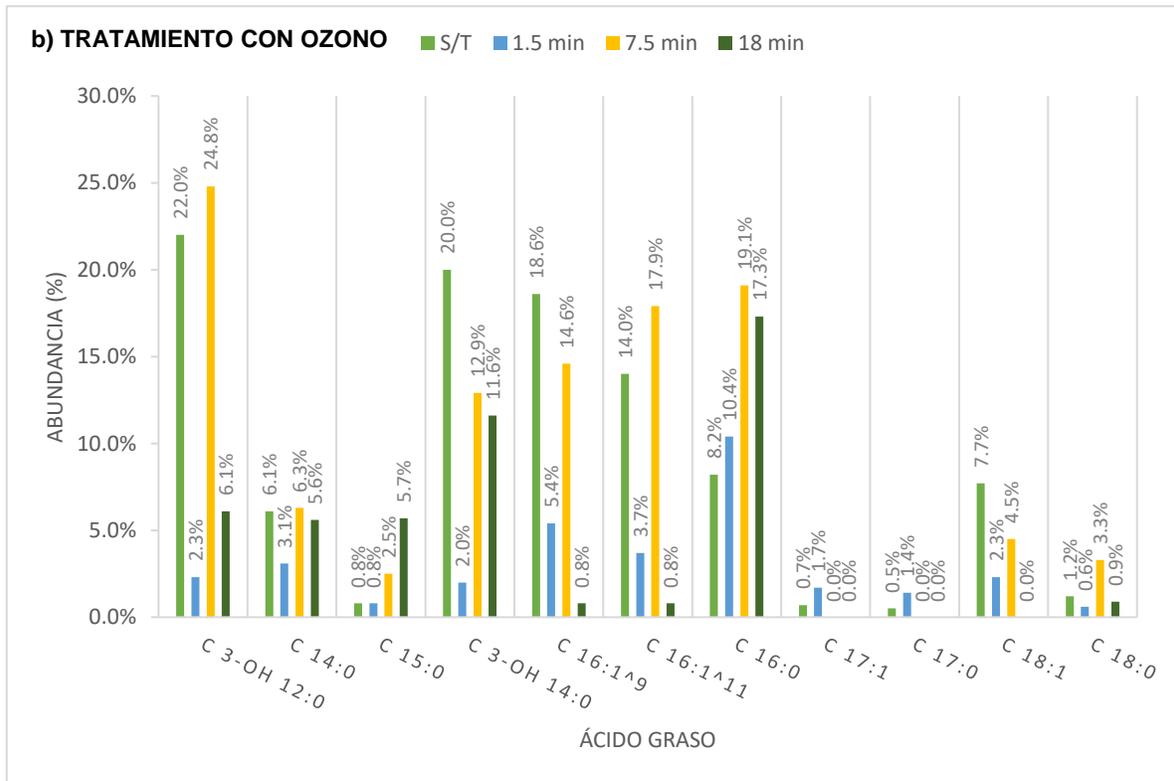
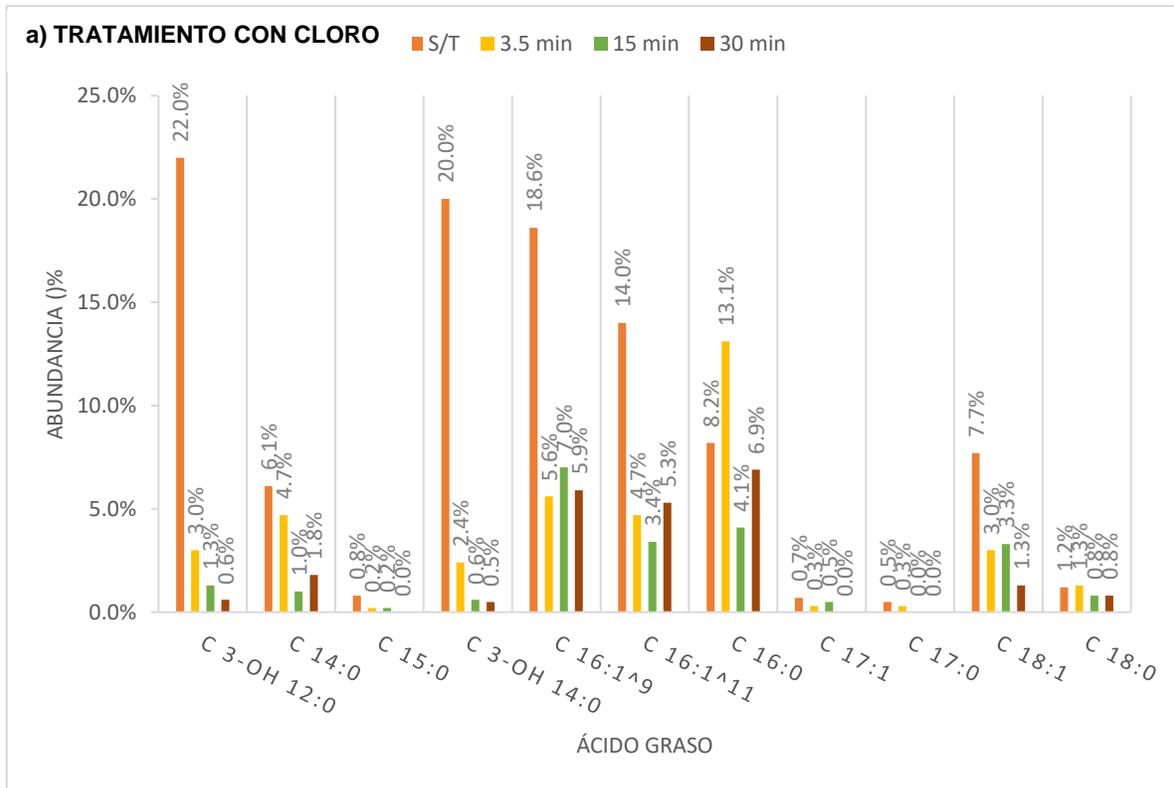


Figura 15. Porcentaje de ácidos grasos de *V. cholerae* lisa a) tratada con cloro, b) tratada con ozono

Tabla 6. Porcentaje del perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* lisa tratada con cloro y ozono

		ÁCIDOS GRASOS (%)											
		C 3-OH 12:0	C 14:0	C 15:0	C 3-OH 14:0	C 16:1Δ9	C 16:1Δ11	C 16:0	C 17:1	C 17:0	C 18:1	C 18:0	
OZONO	TIEMPO (min)	*S/T	22.0	6.1	0.8	20.0	18.6	14.0	8.2	0.7	0.5	7.7	1.2
		3.5	3.0	4.7	0.2	2.4	5.6	4.7	13.1	0.3	0.3	3.0	1.3
		15	1.3	1.0	0.2	0.6	7.0	3.4	4.1	0.5	0.001	3.3	0.8
		30	0.6	1.8	0.001	0.5	5.9	5.3	6.9	0.001	0.001	1.3	0.8
		1.5	2.3	3.1	0.8	2.0	5.4	3.7	10.4	1.7	1.4	2.3	0.6
		7.5	24.8	6.3	2.5	12.9	14.6	17.9	19.1	0.001	0.001	4.5	3.3
		18	6.1	5.6	5.7	11.6	0.8	0.8	17.3	0.001	0.001	0.001	0.9

\*S/T: Sin tratamiento

Conforme a lo revisado en la bibliografía, los desinfectantes en general causan cambios significativos en la composición lipídica de las células bacteriana, lo que conduce a una mayor fluidez de las membranas celulares y a la pérdida de la viabilidad de las bacterias. Kovalenco et al.<sup>47</sup> investigó la composición cuantitativa y cualitativa de los lípidos de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* después de la exposición a tres desinfectantes Barez (cloruro de benzalconio, nanopartículas de argentan), Biochlor (hipoclorito de sodio), Geocide (cloruro de benzalconio; clorhidrato de guanida de polihexametileno, deltametrina). En ese trabajo se identificó un mayor nivel de ácidos grasos libres y diglicéridos. Al respecto en *E. coli* el efecto del desinfectante Barez fue el aumento del nivel de ácidos libres y diglicéridos en un 53% y 58%; mientras que los desinfectantes Biochlor y Geocide provocaron un incremento de ácidos grasos libres y diglicéridos en un 53%, 37% y

en un 113% y 23% respectivamente. Las células de *S. aureus* demostraron cambios similares.

Por otra parte, Bisbiroulas et al.<sup>78</sup> estudió las alteraciones de los lípidos de la membrana celular de *Listeria monocytogenes* al someterse a un proceso de adaptación al desinfectante cloruro de benzalconio. Estos autores indicaron que éste desinfectante provocó un aumento de los ácidos grasos de cadena saturada, principalmente del ácido hexadecanoico y octadecanoico y ácidos grasos insaturados, principalmente el i-hexadecenoico y trans-9,12-octadecenoico & cis-11-octadecenoico, así como ácidos grasos de cadena ramificada. También encontraron una disminución del fósforo lipídico. En ese estudio concluyeron que el aumento en la abundancia de los ácidos i-hexadecanoico y octadecanoico es indicativo de una disminución en la fluidez de la membrana. Por lo tanto, las alteraciones en el perfil de ácidos grasos de *L. monocytogenes* indica alteraciones en la permeabilidad y fluidez de la membrana debido a las adaptaciones de la bacteria a la exposición con cloruro de benzalconio.

Por su parte Dubois et al.<sup>97</sup> observaron modificaciones en el perfil de ácidos grasos y su tolerancia a los biocidas en *Salmonella entérica* con concentraciones subletales, se determinó que los ácidos grasos saturados e insaturados aumentaron conforme aumentaba la cantidad de antimicrobiano, lo que se atribuyó a una respuesta primaria de las bacterias para mantener la integridad y la funcionalidad de la membrana.

De acuerdo con los reportes encontrados, el comportamiento que se observó en el presente estudio tanto de incremento como de disminución en la abundancia de

diversos ácidos grasos, cuando se expuso a la bacteria *V. cholerae* variante lisa a cloro y ozono, es un indicativo claro de desbalance e inestabilidad de la membrana. Al respecto Kovalenco et al.<sup>47</sup> interpreta que éste comportamiento se debe a que la membrana bacteriana tiene como principal componente a los fosfolípidos, los cuales se redujeron produciendo un mayor contenido de diglicéridos y ácidos grasos libres. Lo cual provocó posteriormente la separación de los diglicéridos, promoviendo un incremento de algunos ácidos grasos. No obstante, y debido a que algunos ácidos grasos presentan una disminución en su abundancia éste mismo autor asevera que no todos los fosfolípidos se comportaron de la misma forma. Esta situación indica la inestabilidad de la membrana bacteriana reduciendo la viabilidad de las bacterias. Por otro lado, Dubois et al.<sup>97</sup> y Bisbiroulas et al.<sup>78</sup> mencionan que dichos cambios en la abundancia de los ácidos grasos por efecto de factores de estrés, tiene que ver con la adaptación de las células bacterianas al ambiente.

No se encontraron estudios similares al realizado en el presente estudio respecto a los cambios químicos por efecto del cloro y el ozono en la variante lisa de *V. cholerae*. Los estudios encontrados con relación al efecto de ambos desinfectantes están enfocados en la inactivación de la bacteria. En ese sentido Ledón et al.<sup>24</sup> indicaron que después de un ensayo de susceptibilidad de *V. cholerae* lisa al cloro, se demostró que a los 5 minutos de ser tratado ya no mostraban células viables. Así también Luna<sup>70</sup> observó que al minuto 3 de tener contacto con el cloro, la variante lisa de *V. cholerae* tiene un porcentaje de inactivación del 99%, y refiere que a partir de los 15 minutos ya no se observa un incremento significativo en la inactivación de la bacteria. Éste autor muestra micrografías electrónicas en las que se observa un

daño estructural en la bacteria, presentando cavidades y vesículas de la membrana externa, estas últimas son estructuras membranosas que durante el crecimiento de bacterias gramnegativas se liberan indicando una respuesta al estrés, lo que representa fuga de material celular. Los tiempos de exposición van aumentando de tamaño las cavidades, pero también describe que entre más tiempo de exposición tenga la bacteria con el cloro la bacteria tiende a cambiar fenotípicamente a cocoide. Lo cual coincide con lo reportado por Chaiyanan et al.<sup>98</sup> quien reporta que el cloro puede inducir a la bacteria *V. cholerae* variante lisa a otros fenotipos.

En éste sentido, Pérez<sup>69</sup> observó la inactivación de *V. cholerae* lisa con ozono, sus resultados mostraron que desde el primer minuto hay una inactivación del 99.986%, mostrándose mayores porcentajes de inactivación con ozono que los encontrados por Luna<sup>70</sup> con cloro. Entre más tiempo se expone a la bacteria con el ozono, aumenta el porcentaje de inactivación, ya que en el minuto 18 la inactivación fue del 99.99999%. Éste autor también presenta micrografías electrónicas en las que se observó un daño en la estructura conforme aumentaba el tiempo de exposición; al igual que en el cloro muestra formación de cavidades y vesículas de membrana externa. Al respecto Zhang et al.<sup>99</sup>, quien estudió el efecto del ozono en *P. aeruginosa*, reporta que la fuga de éste material (vesículas de la membrana externa) se debe a que en las bacterias gramnegativas las capas de lipoproteínas y lipopolisacáridos son los primeros sitios de contacto con los desinfectantes, lo que provoca un incremento en la permeabilidad de membrana citoplasmática, llevando a una lisis celular. También ese autor indica que los dobles enlaces de los fosfolípidos insaturados de la envoltura celular son particularmente vulnerables al

poder oxidante del ozono. Y aunque el enfoque del estudio publicado por Zhang et al.<sup>99</sup> no fue determinar los cambios específicamente de los ácidos grasos, sus resultados sirven de soporte para la discusión del presente estudio, en relación a que los cambios observados en los perfiles de ácidos grasos de la variante lisa de *V. cholerae* por efecto del ozono, obedecen principalmente a la vulnerabilidad de los fosfolípidos de la envoltura celular a éste desinfectante.

En éste contexto los resultados del presente estudio muestran que el aumento, disminución o ausencia de los ácidos grasos por efecto de los desinfectantes indica que la membrana bacteriana está presentando alteraciones. Esto se debe a la oxidación de los lípidos al tener contacto con sustancias oxidantes como el cloro u ozono. Al respecto, Orta et al.<sup>100</sup> proponen que: 1) la membrana celular es el primer sitio de ataque del ozono; 2) el ozono ataca a las glucoproteínas, los glucolípidos o ciertos aminoácidos, y también actúa sobre los grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas; 3) el efecto del ozono empieza a hacerse evidente en la pared celular; 4) la célula bacteriana comienza a descomponerse después de estar en contacto con el ozono; 5) la membrana celular se perfora durante este proceso; y finalmente 6) la célula se desintegra o sufre lisis celular. Así la célula perderá sus funciones vitales y se producirá la muerte bacteriana.

### **Efecto del cloro y el ozono en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* variante rugosa**

La figura 16 ilustra los cambios en los perfiles de ácidos grasos de la variante rugosa de *V. cholerae* después de los tratamientos con cloro (Figura 15a) y ozono (Figura 15b). Los resultados obtenidos en los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mostraron que el cloro provoca una notable disminución en la

abundancia de ácidos grasos de la *V. cholerae* variante rugosa, después de aplicar las tres condiciones probadas: CT 3.5, 15 y 30 mg Cl<sub>2</sub> min/L respecto al control. Desde el CT 3.5 mg Cl<sub>2</sub> min/L, se observó la ausencia del ácido C15:0 (pentadecanoico) (89%) en el perfil, mientras que a un CT de 15 mg Cl<sub>2</sub> min/L desaparecen tanto el ácido C15:0 (94.8%) como el C17:00 (heptadecanoico) (99%) en el perfil y la disminución del total de ácidos grasos se hace más evidente. No obstante, con el mayor valor de CT probado, 30 mg Cl<sub>2</sub> min/L, se observa un incremento en la abundancia en los ácidos grasos tretadecanoico (12.4%), cis-9-hexadecenoico (6%), cis-11-hexadecenoico (12%), hexadecanoico (17.2%), trans-9,12-octadecenoico & cis-11-octadecenoico (11.4%) y el octadecanoico (45%). Respecto al ozono, en la figura 15b se puede observar que éste tratamiento provoca un comportamiento similar al que se presentó con el cloro para la variante rugosa de *V. cholerae*. Se detectó que hay una disminución en la abundancia de ácidos grasos en comparación con el control. A partir del CT 1.5 mg O<sub>3</sub> min/L se detectaron niveles traza del ácido graso C15:0 (99.9%) y aplicando un CT de 7.5 mg O<sub>3</sub> min/L se determinó que sólo se presentan niveles traza de los ácidos grasos C15:0 (99.9%), C17:00 (99.9%) y C17:1 (heptadecanoico) (99.9%). Asimismo, se observó que el ácido 3-hidroxydodecanoico aumenta su abundancia aplicando valores de CT de 7.5 y 18 mg O<sub>3</sub> min/L (6.3% y 1.5% respectivamente), incluso con el CT 18 mg O<sub>3</sub> min/L también aumenta el ácido octadecanoico (1.2%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

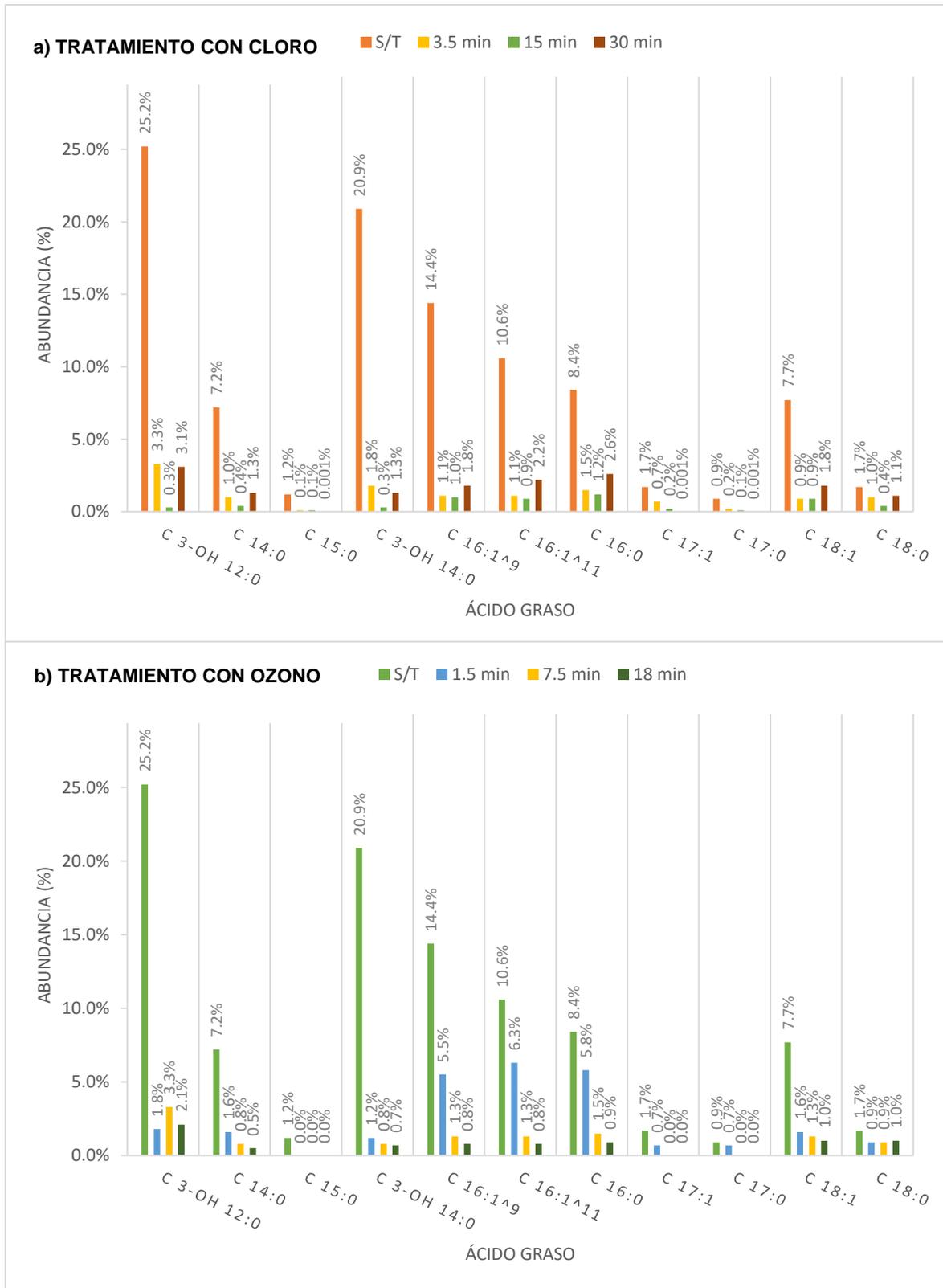


Figura 16. Porcentaje de ácidos grasos de *V. cholerae rugosa* a) tratada con cloro, b) tratada con ozono

Tabla 7. Porcentaje del perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* rugosa tratada con cloro y ozono

		ÁCIDOS GRASOS (%)										
		C 3-OH 12:0	C 14:0	C 15:0	C 3-OH 14:0	C 16:1Δ9	C 16:1Δ11	C 16:0	C 17:1	C 17:0	C 18:1	C 18:0
	*S/T	25.2	7.2	1.2	20.9	14.4	10.6	8.4	1.7	0.9	7.7	1.7
CLORO	3.5	3.3	1.0	0.1	1.8	1.1	1.1	1.5	0.7	0.2	0.9	1.0
	15	0.3	0.4	0.1	0.3	1.0	0.9	1.2	0.2	0.1	0.9	0.4
	30	3.1	1.3	0.001	1.3	1.8	2.2	2.6	0.001	0.001	1.8	1.1
OZONO	1.5	1.8	1.6	0.001	1.2	5.5	6.3	5.8	0.7	0.7	1.6	0.9
	7.5	3.3	0.8	0.001	0.8	1.3	1.3	1.5	0.001	0.001	1.3	0.9
	18	2.1	0.5	0.001	0.7	0.8	0.8	0.9	0.001	0.001	1.0	1.0

\*S/T: Sin tratamiento

Debido a que únicamente se encontraron referencias en la bibliografía dónde se evalúa el efecto del ozono y del cloro en la inactivación de *V. cholerae* variante rugosa<sup>83-85</sup>, pero no respecto a los cambios químicos, no fue posible discutir con base a lo publicado. No obstante, la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio para los cambios químicos en el perfil de ácidos grasos por efecto del cloro y el ozono en la variante rugosa de *V. cholerae*, se hace apoyándose en lo encontrado para variantes lisas de diferentes bacterias, tal y como se discutió en el aparatado anterior. La bibliografía ha indicado que la disminución o aumento en la abundancia, e incluso la ausencia de diferentes ácidos grasos manifiesta una inestabilidad de los componentes de la membrana, Kovalenco et al.<sup>47</sup> Dicha inestabilidad está dada principalmente en los fosfolípidos, la cual puede reflejarse según éste mismo autor, no sólo en un aumento en la abundancia sino también en

una disminución que incluso deriva en la no detección de uno u otro ácido graso del perfil, ya que los fosfolípidos presentan diferente comportamiento durante el metabolismo y por ende cuando son sometidos a agentes externos como los desinfectantes. No se conoce con certeza, pero la inestabilidad de los componentes de los ácidos grasos de la membrana bacteriana, puede provocar efectos adversos en la viabilidad de las bacterias que están tratando de adaptarse a las condiciones de estrés ambiental, Dubois et al.<sup>97</sup> y Bisbiroulas et al.<sup>78</sup> De tal manera que los cambios tan evidentes que se detectaron en los perfiles de los grasos de la variante rugosa de *V. cholerae* pueden ser un indicativo, ya sea de un intento de adaptación a los agentes desinfectantes, o bien influir directamente en la viabilidad de las células. Y de acuerdo con los cambios en el perfil de ácidos grasos que se observaron por acción del cloro y del ozono, es posible decir que el ozono provocó mayor efecto ya que desde un valor CT de 1.5 mg O<sub>3</sub> min/L se observó una clara disminución en la abundancia de todos los ácidos grasos del perfil de la bacteria *V. cholerae* en su variante rugosa.

De acuerdo con Yildiz et al.<sup>87</sup>, la morfología rugosa de *V. cholerae* O1 El Tor está asociada con una elevada producción de EPS, los cuales promueven la formación de biofilm, a ésta peculiaridad se le atribuye la resistencia mostrada por la variante rugosa, siendo un mecanismo de supervivencia y persistencia ambiental.<sup>4</sup>

También Suzarte et al.<sup>4</sup> en su ensayo de inducción de *V. cholerae* a la morfología rugosa, concluyeron que la producción de EPS es importante para no ser vulnerables a los cambios ambientales y a agentes como cloro y peróxido de hidrogeno a comparación a aquellos que son incapaces de producir EPS. Por otra

parte, Ledón et al.<sup>24</sup>, realizó un ensayo a cepas con biofilms, mostrando que esta tiene una alta resistencia al cloro y se mantuvo constante la cantidad de células viables en el tiempo de 5 a 30 min de contacto con el cloro. Fernández et al.<sup>26</sup> comenta que la sobreproducción de EPS estabiliza la biofilm madura y le confiere resistencia al estrés osmótico y oxidativo y agentes bactericidas. La expresión de este gen y las propiedades fenotípicas y de supervivencia ambiental que éste le confiere a *V. cholerae* tienen importancia crítica en su ciclo de vida en el ambiente y su potencial de transmisión y patogenicidad en los humanos.

Tachikawa et al.<sup>101</sup> sugiere que es difícil la penetración del ozono a la biofilm, debido a que el ozono puede reaccionar con los constituyentes que componen a la biofilm, y desacelerar la reacción de inactivación de la bacteria.

Por lo que, la morfología rugosa de *V. cholerae* es un mecanismo de supervivencia y persistencia ambiental. La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos que permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente y supone la aparición de un nuevo concepto de “bacteria” como organismo unicelular que puede ser capaz de formar estructuras complejas con interrelaciones entre los individuos que están próximas al comportamiento de los organismos pluricelulares. Una consecuencia de la formación de estas estructuras es que los métodos habituales de control y eliminación (desinfectantes, antibióticos, etc.) de las formas libres (planctónicas) de las bacterias se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm.<sup>27</sup>

Se ha reportado que la morfología rugosa tiende a formar biofilm que le confiere resistencia en el ambiente; los resultados obtenidos en el presente estudio indican

que ésta variante de la bacteria *V. cholerae* contiene mayor cantidad de ácidos grasos respecto a las variantes lisa y cocoide. De acuerdo con la bibliografía, muchos microorganismos producen polisacáridos que son excretados al medio o bien quedan adheridos a la célula en forma de cápsula. De tal manera que el término exopolisacárido ha sido ampliamente utilizado para aquellos polisacáridos que se localizan en la superficie externa de las células microbianas, los cuales se encuentran unidos covalentemente a los fosfolípidos o a moléculas del lípido A de la membrana celular. La producción de EPS en las células microbianas está estrechamente relacionada con la actividad emulgente de diversas especies microbianas, los cuales se caracterizan por presentar una parte hidrofílica y una parte no polar hidrofóbica constituida por ácidos grasos saturados e insaturados.<sup>102</sup> Con éste fundamento, y considerando que de las tres variantes de la bacteria *V. cholerae* la rugosa es la que presenta mayor abundancia de ácidos grasos, la marcada disminución de éstos cuando se aplicaron los tratamientos con ozono y cloro; indica que los oxidantes actuaron directamente en éstas biomoléculas.

La importancia en la disminución de la abundancia de los ácidos grasos radica en que los oxidantes utilizados promueven la eliminación de la capa de EPS que le confieren resistencia a la bacteria. Por lo tanto, con la información obtenida en el presente estudio se comprueba que tanto el cloro como el ozono contribuyen a la erradicación de la bacteria al eliminar los EPS de la variante rugosa y hacerla más vulnerable a los oxidantes. Los resultados de la tabla 7 indican que el ozono actúa con mayor eficacia que el cloro en la disminución de la abundancia de los ácidos

grasos, ya que tres de los ácidos grasos no fueron detectados o fueron detectados en cantidades traza.

### Efecto del cloro y el ozono en el perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* variante cocoide

En la figura 17 se representan las abundancias de los ácidos grasos que conforman el perfil de la variante cocoide de *V. cholerae* cuando fue sometida a tratamientos con cloro.

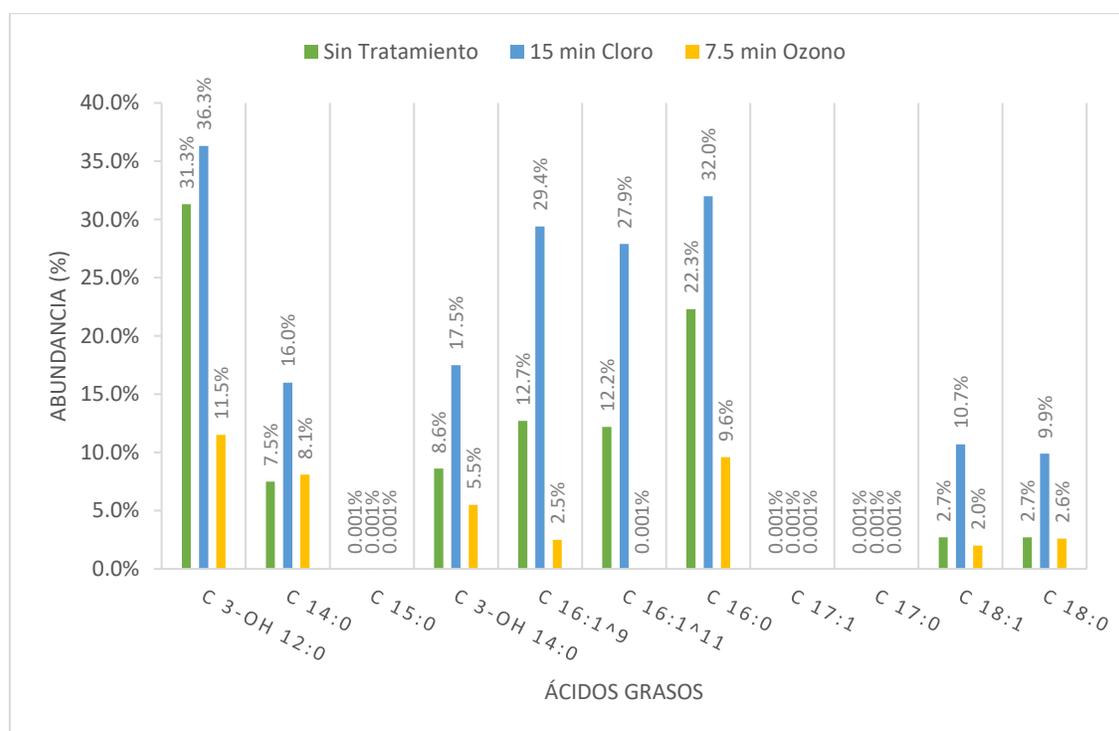


Figura 17. Porcentaje de ácidos grasos de *V. cholerae* cocoide tratada con cloro y con ozono

Cabe hacer mención que para ésta variante en particular tanto la inducción como la recuperación de la biomasa fue particularmente complicada, ya que fue necesario un periodo entre 60 y 80 días para obtener células cocoides. Así mismo, y debido a que al transformarse en coco las células disminuyen su tamaño, se requirió de una gran cantidad de cultivos para lograr obtener la cantidad de biomasa que permitiera

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

llevar a cabo el proceso de extracción de los ácidos grasos. De tal manera que se decidió probar sólo un valor CT para cada oxidante, CT de 15 mg CL<sub>2</sub> min/L y CT de 7.5 mg O<sub>3</sub> min/L, la selección se determinó en función de los ensayos previamente realizados y reportados por Luna<sup>70</sup> y Pérez<sup>69</sup>, quienes obtuvieron que con estos valores de CT de cloro y ozono respectivamente son los que presentan mayor cambio en la estructura bacteriana de *V. cholerae* cocoide.

Tabla 8. Porcentaje del perfil de ácidos grasos de *V. cholerae* variante cocoide tratada con cloro y ozono.

		ÁCIDOS GRASOS											
		C 3-OH 12:0	C 14:0	C 15:0	C 3-OH 14:0	C 16:1Δ9	C 16:1Δ11	C 16:0	C 17:1	C 17:0	C 18:1	C 18:0	
	*S/T	31.3	7.5	0.001	8.6	12.7	12.2	22.3	0.001	0.001	2.7	2.7	
OZONO	CLORO	15	36.3	16	0.001	17.5	29.4	27.9	32.0	0.001	0.001	10.7	9.9
	TIEMPO (min)	7.5	11.5	8.1	0.001	5.5	2.5	0.01	9.6	0.001	0.001	2.0	2.6

\*S/T: Sin tratamiento

En la muestra tratada con cloro se observó un marcado aumento en la abundancia de ácidos grasos, comparándolo con la muestra de ozono que solo se aumenta el ácido tetradecanoico (7.7%) y, desapareciendo el ácido cis-11-hexadecenoico. De acuerdo con lo consultado en la bibliografía Bisbiroulas et al.<sup>78</sup>; Dubois et al.<sup>97</sup>; Kovalenco et al.<sup>47</sup> y tal y como se discutió para las variantes lisa y rugosa, la

exposición de las células bacterianas a los desinfectantes provoca alteraciones en los lípidos de la membrana celular aumentando o disminuyendo la abundancia de los ácidos grasos de cadenas saturada e insaturada. A decir de éstos autores, las variaciones en el perfil de ácidos grasos de una célula bacteriana indica alteraciones en la permeabilidad y fluidez de la membrana debido a las adaptaciones de la bacteria a la exposición de los desinfectantes. Aunque no se encontraron reportes sobre la aplicación del cloro y el ozono, lo que se observa a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, es que tanto ambos desinfectantes causan variaciones en el perfil de ácidos grasos de la variante cocoide de *V. cholerae*, lo que contribuye a una inestabilidad de la célula y en consecuencia a su inactivación. Con la información obtenida no es posible determinar cuál de los dos oxidantes contribuyen en mayor o menor medida a la inactivación de ésta variante.

Al igual que para las morfologías lisa y rugosa, sólo se encontraron reportes dirigidos a la inactivación de la bacteria. Al respecto, Atengueño<sup>68</sup> indica que a partir del minuto 15 se aprecia una inactivación del 99%, a una concentración de 1mg/L de cloro. Luna<sup>70</sup> sometió a *V. cholerae* cocoide a cloro en las micrográficas en el minuto 3 las células muestran una deformación, pero sin presentar daño a la estructura, hasta el minuto 3.5 es cuando apenas se puede apreciar una cavidad y vesícula como parte de daño estructural en la bacteria, hasta el minuto 15 se muestra un daño más severo a la célula, presentando además hundimiento. Indica que, presentando fuga de material celular, no se observa la destrucción total de la célula. Chaiyanan et al.<sup>98</sup> menciona que *V. cholerae* puede conservar ciertas propiedades viables cuando está sometida a cloración, durante un año.

En relación con el ozono, Pérez<sup>69</sup> indica que aplicando ozono al 1 mg/L en el primer minuto se produce un 98% de inactivación, en los 7.5 minutos ya se tiene un 99% de inactivación bacteriana, en sus micrografías se observan destrucción del fenotipo cocoide principalmente por la lisis celular al presentar daños en la membrana externa de la bacteria. Debido a que el ozono es un agente altamente oxidante y al primer contacto con la membrana provoca lisis celular, permitiendo la expulsión del material celular al medio exterior, teniendo como principal mecanismo de acción la lisis celular.<sup>68</sup>

De acuerdo con lo encontrado en la bibliografía, las cantidades traza encontradas después de los tratamientos con cloro y ozono para la variante cocoide, pueden indicar que, durante la pérdida de fosfolípidos inducida por el estado de inanición de ésta variante, la capacidad de sintetizar ácidos o modificar los ácidos se da como un mecanismo de supervivencia que ayuda a mantener una membrana funcional (aunque estructuralmente alterada) durante la inanición. Además, una relación de ácidos grasos trans/cis significativamente mayor que la informada para la mayoría de los cultivos bacterianos y muestras ambientales puede usarse como un índice de lípidos de estrés o de inanición.<sup>76</sup>

La modificación de la composición lipídica de las membranas es claramente un mecanismo de adaptación bacteriano importante, ya sea para mantenerse en un ambiente estresante<sup>78</sup> o que afecten de tal manera la permeabilidad e inestabilidad de la membrana que lleve a su inactivación. Esto, basándose en el hecho de que los fosfolípidos son componentes principales de las membranas celulares que definen sus propiedades fisicoquímicas, la permeabilidad de las partículas de bajo

peso molecular, la actividad de las enzimas unidas a la membrana y la señalización celular.<sup>47</sup> También el ADN bacteriano está conectado a la membrana celular bacteriana y que, por lo tanto, el crecimiento de la célula bacteriana (síntesis primaria y replicación del ADN) depende de la condición de la misma.

Lo observado a partir de los datos obtenidos en el presente estudio indicaron que tanto el cloro como el ozono afectan directamente la inestabilidad de la membrana de las variantes resistentes rugosa y cocoide de la bacteria *V. cholerae*. Los resultados conseguidos aportan información relevante respecto a la manera en cómo los oxidantes probados contribuyen a la erradicación de la bacteria en el ambiente, ya que, aunque no se observen cambios estructurales por ejemplo para la variante rugosa, tal y como se reporta en estudios anteriores Luna<sup>70</sup> y Pérez<sup>69</sup>, la inestabilidad de la membrana lleva a la muerte celular.

## CONCLUSIONES

- La inducción de variantes rugosa y cocoide a partir de una cepa *V. cholerae* variante lisa, se realizó exitosamente a los 15 y 72 días respectivamente, bajo factores estresantes como el déficit de nutrientes y variación de temperaturas, que son los factores a los cuales están sometidas las células en el ambiente.
- Las adecuaciones realizadas en la metodología MIDI-Sherlock #Note 101, permitieron determinar apropiadamente los perfiles de ácidos grasos de *V. cholerae* variantes rugosa y cocoide antes y después del tratamiento con cloro y ozono.
- La modificación de la composición lipídica de las membranas en las morfologías lisa, rugosa y cocoide de la bacteria *V. cholerae*, sometidas a desinfectantes como el cloro y el ozono, es claramente un mecanismo de adaptación bacteriano importante, ya sea para mantenerse en un ambiente estresante o que afecten de tal manera la permeabilidad e inestabilidad de la membrana que la lleve a su inactivación.
- Debido a que tanto un aumento como una disminución en la abundancia de los ácidos grasos provocan inestabilidad y permeabilidad en la membrana, con los datos obtenidos no es posible inferir cuál de los dos oxidantes probados, cloro u ozono, afectan en mayor o menor medida la viabilidad de las células. No obstante, los datos bibliográficos indican que el ozono ha sido más efectivo para la inactivación de estas variantes.

## REFERENCIAS

1. Fernández S, Alonso G. Cólera y *Vibrio cholerae*. Rev del Inst Nac Hig Rafael Rangel. 2009;40(2):50–69.
2. Cáceres M, López-M, Hernández C, Lizarazo A, López M, Nazar F. Conocimientos de los estudiantes de medicina sobre cólera en una universidad pública. Rev. Méd. Ris. 2018;24(2):90–95.
3. Hernández C, Cáceres F. Cólera, ¿se aproxima una nueva pandemia? Méd. UIS. 2014;27(2):67-83
4. Suzarte E, Campos J, Marrero K, Silva Y, Rodríguez B, Martínez E, et al. Construcción y caracterización de mutantes de *Vibrio cholerae* incapaces de formar biofilm. Rev CENIC Cien. Bio. 2005;36(1):46–51.
5. World Health Organization. Guías para la calidad del agua de consumo humano. Ginebra: World Health Organization; 2018;1-9.
6. González L, Casanova M, Pérez J. Cólera: historia y actualidad. Rev. Cien. Méd. [Internet]. 2011 [citado 19 marzo de 2019], 15(4):280–294. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v15n4/rpr25411.pdf>
7. Murray P. *Vibrio* y *Aeromonas*. En: Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 7ª ed. España: Elsevier; 2014: p. 273 – 278
8. Martínez Báez M. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la enfermedad diarreica aguda bacteriana. InDRE [Internet]. 2018 [citado 27 de abril de 2019]; 1(3). Disponible en:

- [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487554/LVL\\_EDAbacteriana\\_4T.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487554/LVL_EDAbacteriana_4T.pdf)
9. Misceláneas. Cólera. Rev. Méd. Hon. [Internet]. 1991 [citado 1 de agosto de 2019]; 59(1):45–47. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1991/pdf/Vol59-1-1991-9.pdf>
  10. Organización Mundial de la Salud. Cólera [internet]. México: OMS; 17 de enero de 2019 [citado 30 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cholera>
  11. Salinas P. Cólera: una revisión actualizada. Parte 1. Introducción, historia, definición, diagnóstico. Facultad de medicina. 2019;1(4):167-169
  12. Lafuente S, Vilella A, Serrano B, González R, Bruni L. El cólera. Enf. Emerg. 2006;8(1):10-15
  13. Epidemiol V, Estatales C, Internacional R, Nacional S, Epidemiol V. CONAVE. Aviso epidemiológico 2017. 2017;1(1):1–5.
  14. Secretaria de Salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica del cólera. México: Dirección General de Epidemiología; 2015: p 1-25
  15. OMS. Cólera en México – Actualización [Internet]. México: OMS; 13 de noviembre 2013 [citado el 11 de noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/csr/don/2013\\_11\\_13/es/](https://www.who.int/csr/don/2013_11_13/es/)
  16. Secretaria de Salud. 137. Refuerza salud vigilancia epidemiológica contra el cólera [Internet]. México: Secretaria de Salud; 17 de abril de 2019 [citado el 11 de

## REFERENCIAS

---

- noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/137-refuerza-salud-vigilancia-epidemiologica-contra-el-colera>
17. López M. Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en el molusco bivalvos de interés comercial. [tesis doctoral]. España: Universidad de Zaragoza; 2012.
  18. Valenzuela R, Cortez R, Zazopulos M, Carmi J. Determinación del perfil de ácidos grasos de bacterias del género *Vibrio* por Cromatografía de Gases. Sci. Chromatogr.. 2012;4(4):271-280.
  19. BD L. BD TCBS Agar. 2019; PA-2544320: 1–4.
  20. Flores J. Cólera: aspectos microbiológicos, epidemiológicos y clínicos. Biomédica. 1990;1(4):211- 216
  21. Centers for Disease Control and Prevention. V. Examination of Food and Environmental Samples. Lab Methods Diagnosis *Vibrio cholerae*. 1860;27–37.
  22. Condalab. Agua Peptonada Alcalina. Condalab [Internet]. 2019;24–5. [citado el 30 de marzo de 2019]. Disponible en: [https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=11120](https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=11120)
  23. Delíz G, Pérez T, Calzada R. Modelación in vitro del desempeño ambiental de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638. Rev CENIC Cie. Biológic.. 2017;48(2):1–11.
  24. Ledón T, Hernández DD, Marrero K, Fando R. Modelación in vitro del comportamiento ambiental de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. Dep Biol

- Mol Dir Enfermedades Infecc Cent Nac Investig Científicas, CNIC. 2014;31(2):121–35.
25. Nazar J. Distal sciatic nerve block for diabetic foot surgery. Case report. *Revista Otorrinolaringol y cirugía cabeza y cuello*. 2007;67(2):79–81.
26. Fernández M, Suárez P, Duque Z, García MA. Supervivencia y formación de biopelículas de *Vibrio cholerae* sobre quitina de camarón. 2013;38(06):443–8.
27. Domínguez L, Badiola J, Cepeda A, Más A, Rodríguez E, Zurera G, et al. AESAN biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Rev. Compend. científico* [Internet]. 2010;12(1):37–61. [citado el 25 de marzo de 2019]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/BIOFILMS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/BIOFILMS.pdf)
28. Wu B, Liang W, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*. 2016;7(404):1–9.
29. Baker R, Singleton F, Hood M. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*. 1983;46(4):930–40.
30. Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F, Cappellet J-M. Review article West Nile virus infection of horses. *Hygiene des Aliments INRA-ENVN, École Natl Veterin. Nantes*, 2002;33(1):359–70.
31. González N, Fey A, Höfle MG, Espejo RT, Guzmán CA. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering

- the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Env. Microbiol.* 2006;8(4):658–66.
32. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5(258):1–20.
33. Fernández M, García M, Contreras M, Incani R, Chirinos H, Rojas H, et al. Survival, Induction and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the Southern Caribbean Sea. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57(1):21–6.
34. Brian Y, Salton MRJ. Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. *Dep. Microbiol. Univ. New South Wales.* 1966;116(1):73–9.
35. Caldwell D. Structure formation. *Microbial Physiology and Metabolism.* USA: Editorial Wm. C. Brown communications. 1995:36-37.
36. Martorell M. Acción de alimentos funciones ricos en ácidos grasos esenciales sobre el estrés oxidativo [tesis doctoral] [Internet]. Palma de Mallorca: Universidad de les illes balears; 2013 [citado el 04 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/128937/Tmmp1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
37. Lípidos [Internet]. México; 1990. [citado el 20 de marzo de 2019]. Disponible en: [http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bio\\_fun/7.pdf](http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bio_fun/7.pdf)
38. Stainer R, Rudd T, Laster J. Metabolismo microbiano: biosíntesis. *Microbiología.* 4ª ed. España, Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1986. Pag 77, 78 y 207

39. MIDI Inc. Microbial Identification System. 2015. 1–165 p.
40. Brian B, Gardner E. Fatty acids from *Vibrio cholerae* Lipids. Oxf. Journ. 1968;118(1):47–53.
41. Stalin H. Nomenclatura de los ácidos grasos [Internet]. Perú: Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez; 2019 [citado en 20 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-andina-nestor-caceres-velasquez/anatomia/apuntes/nomenclatura-de-los-acidos-grasos/4587403/view>
42. Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. Biol Fertil Soils. 1999;29(2):111–29.
43. Welch D. Applications of cellular fatty acid analysis. In: Clinical Microbiology Reviews. 1991. p. 422–38.
44. Kunitsky C, Osterhout G, Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock microbial identification system. Encycl. Rap. Microbiol. Meth. 2015;1(1):1–18.
45. Méndez Y, Barrera M. Fisiopatología de la sepsis por bacterias gramnegativas: bases moleculares. Cuarzo 2015; 21 (2): 88-103.
46. Romero S, Carlos H, Iregui A. El Lipopolisacárido 1. Rev. Med. Vet. (Bogotá). 2010;19(1):37–45.
47. Kovalenko V, Kovalenko P, Ponomarenko G, Kukhtyn MD, Midyk S, Garkavenko V. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

- cells under the influence of disinfectants Barez, Biochlor and Geocide. Ukr. Jou. Ecol. 2018;8(1):547–550.
48. Brian B. Lipids and phospholipase activity of *Vibrio cholerae* dissertation [thesis doctoral]. U.S.: North Texas State University in Partial; 1972.
49. Corzo A. Técnicas de análisis en química orgánica: cromatografía. 1ª ed. Santiago de Estero: Universidad Nacional de Santiago de Estero; 2019.
50. Mc Nair H, Miller J. Basic Gas Chromatography. 2a ed. USA: Editorial New Jersey; 2009.
51. Rood D, (2007), The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers, Weinheim, Alemania, Editorial Wiley-VCH.
52. Kitson F, Larsen B, and McEwen C, (1996), Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide, California, USA, Editorial Academic Press.
53. Reading F. Gas Chromatography. Els. Inc, 2012;1(1):435-439.
54. Skoog D, Holler J, Crouch S. Principios de análisis instrumental. 6a ed. Editorial Cengage Learning. Distrito Federal, México; 2008.
55. Throck J, Sparkman O. Introduction to Mass Spectrometry instrumentation. Editorial Wiley. Gran Bretaña, Reino Unido; 2007.
56. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Tech Note. 2001;101(1):1–6.
57. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9ª ed. México: Editorial Medica Panamericana; 2007

## REFERENCIAS

---

58. Vestal R, White D. Lipid analysis in microbial ecology, quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScie.* 1989;39(8):535-541
59. Böttger E. Approaches for identification of microorganisms. Despite longer experience with fatty acid profiles, DNA-based analysis offers several advantages. *ASM News.* 1996;62(5):247-250
60. Solomon C, Casey P, Mackne C, Lake Andrew. Ozone disinfection. *Fac. She. EPAAA.* 1998; 1(1): 1-4.
61. Programa de inocuidad alimentaria. Manual técnico de desinfección postcosecha. Comité estatal de sanidad vegetal de Baja California. México: CESVBC; 2016.
62. Rocha E. Desinfección y métodos de desinfección del agua. En: Rocha E. editores. *Ingeniería de tratamiento y acondicionamiento de aguas.* Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua, 2010. p. 1-16
63. Comisión nacional del agua. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. Gerencia de cuencas transfronterizas de la comisión nacional del agua. México: CNA; 2007.
64. Lezcano I, Pérez R, Baluja C, Sánchez E. Ozone inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhimurium*. *Ozo. Scien. & Eng.* 2008,21(1):293-300.
65. Langlais B, Reckhow D, Brink D. Ozone in water treatment, Application and Engineering [Internet]. 1ª ed. U.S.A.: editorial Taylor & Francis Group; 1991 [citado el 20 de junio de 2020]. Disponible en : <https://books.google.com.mx/books?id=StqiDwAAQBAJ&pg=PT258&lpg=PT258&>

- dq=Christensen+y+Giese+1954&source=bl&ots=14MWS8nhmV&sig=ACfU3U0O  
JF5W9m35N-  
HJu7sbmW909CGiTw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjUlav5747qAhUPSK0KHUIC  
A3MQ6AEwAXoECAoQAQ#v=onepage&q=Christensen%20y%20Giese%201954  
&f=false
66. Percival S, Yates M, Willians D, Chalmers R, Gray N. Microbiology of waterbone diseases. 2ª ed. UK: Elsevier;2014.
67. Casasola B. Evaluación de la resistencia del estado viable no cultivable de *Helicobacter pylori* y *Vibrio cholerae* a la desinfección con cloro y ozono mediante el uso de técnicas moleculares [tesis doctoral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
68. Atengueño K. Desinfección mediante cloro y ozono para inactivar *Vibrio cholerae* en su estado viable no cultivable, utilizando microscopia FESEM para evaluar los daños a la bacteria [tesis maestral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
69. Pérez D. Evaluación de la desinfección con ozono en *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar, bacilar rugosa y cocoide mediante FESEM [tesis licencial]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.
70. Luna A. Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar, rugosa y cocoide mediante FESEM [tesis licencial]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.

71. Orta M, Yáñez I, Casasola B, Román P. Effects of ozone and chlorine disinfection on VNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Env. Tech.* 2017;38(6):744-753.
72. García J. Evaluación de compuestos desinfectantes en la eliminación de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* presentes en agua. En: Congreso Internacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México; 2002.
73. Kieft T, Ringelberg D, White D. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *App. and Env. Mic.* 1994;60(9):3292-3299.
74. Okuyama H, Sasaki S, Higashi S, Murata N. A trans-unsaturated fatty acid in a Psychrophilic bacterium, *Vibrio sp.* Strain ABE-1. *Jou. of bac.*1990;172(6):3515-3518.
75. Abu-Shkara F, Neeman I, Sheinman R, Armon R. The effect of fatty acid alteration in coliform bacteria on disinfection resistance and/or adaptation. *Wat. Sci. and Tec.* 1998;38(12):133-139.
76. Guckert J, Hood M, White D. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *App. And Env. Mic.* 1986;52(4):794-801.
77. Juntao J, Chen Y, Jiang Y, Tang J, Yang L, Liang C, et al. Visualized analysis of cellular fatty acid profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains under cold stress. *FEMS Mic. Let.* 2014;357(1):92-98.

78. Bisbiroulas P, Psylou M, Iliopoulou I, Diakogiannis I, Berberi A, Mastronicolis S. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Let. In App. Mic.* 2011;52(1):275-280.
79. Casasola B, Orta M, Luqueño V, Monje I. Quantification of *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state by quantitative PCR (qPCR) in water disinfection with ozone. *Wat. Sci. & Tec.* 2013;1(1):1-5.
80. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *Int. J. Mor.* 2017;35(4):1214-1223.
81. Organización Mundial de la salud. Manual de procedimientos aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. OMS. 2007.
82. Yáñez I, Orta M, Antengueño K, Mendoza M. Alternative treatment to remove resistant strains of *Vibrio cholerae* in water. *Jou. Env. Eng.* 2020.
83. Antengueño K, Yáñez I, Orta M. Daños estructurales a la bacteria *Vibrio cholerae* viable no cultivable sometida a procesos de desinfección mediante ozono y cloro. En: Congreso Interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental. Guayaquil; Ecuador: AIDIS; 2018. pp. 96-101.
84. Yáñez I, Antengueño K, Pérez D, Luna A, Orta M. Efecto del cloro y el ozono en la ultraestructura celular de *Vibrio cholerae* variante rugosa. En: Congreso Interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental. Guayaquil; Ecuador: AIDIS; 2018. pp. 107-111.

## REFERENCIAS

---

85. Orta M, Yáñez I, Antengueño K. Cinética de desinfección con cloro y ozono para inactivar las formas resistentes de *Vibrio cholerae* en agua. En: Congreso Interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental. Guayaquil; Ecuador: AIDIS; 2018. pp. 112-118
86. Wai S, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata S, Yoshida S. *Vibrio cholerae* O1 strain tsi-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *App. And Env. Mic.* 1998;64(10):3648-3655.
87. Yildiz F, Schooink G. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Pro. Nat. Acá. Of Sci. Of the Uni. Sta. Of Ame.*1999;96(7):4018-4033.
88. Ravel J, Knighth I, Monahan C, Hill R, Colwell R. Temperature induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Mic.* 1995;141(1):377-383.
89. Krebs A, Taylor R. Nutrient-dependent, rapid transition of *Vibrio cholerae* to coccoid morphology and expression of the toxin co-regulated pilus in this form. *Mic.* 2011;157(10):2942-2953.
90. Grim C, Mangel T, Hug A, Colwell R. Ultrastructure of coccoid but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Env. Micr.* 2007;9(2):393-402.
91. Sung H, Chen C, Shih P. Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio cholerae* O139 by temperature and its pathogenicity. *Jou. Of Fooof and Drug Ana.* 2006;14(3):265-272.

92. Urdaci M, Marchand M, Grimont P. Characterization of 22 *Vibrio* species by gas chromatography analysis of their cellular fatty acids. *Ins. Pas. /Els. Res. Mic.* 1990;141(1):437-452
93. Lambert M, Hickman F, Farmer J, Wayne C. Differentiation of *Vibrionaceae* species by their cellular fatty acid composition. *Int. Jou. Of Sys. Bac.* 1983;33(4):777-792
94. Yáñez I. Adaptación de la técnica cromatográfica para la identificación de bacterias patógenas aisladas del ambiente [tesis maestral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.
95. Broady K, Rietschel E, Lüderitz O. The chemical structure of lipid A component of lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae*. *Eur. Jou. Bio.* 1981;115(1):463-468.
96. Valenzuela R, Carmi J. Determinación del perfil de ácidos grasos de bacterias del género *Vibrio* por cromatografía de gases. *Sci. Chr. ResGate.* 2012;4(4):271-280.
97. Dubois F, Naïtali M, Assanta A, Briandet R. Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* by plant-derived terpenes. *Appl. Env. Mic.* 2011;77(3):906-910.
98. Chaiyanan S, Hug A, Maugel T, Colwell R. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Sys. Appl. Mic.* 2001;24(1):331-341.
99. Zhang Y, Wu Q, Zhang J, Yang X. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Jou. Appl. Mic.* 2011;111(1):1006-1015.

## REFERENCIAS

---

100. Orta M, Rojas N, Ayala A. Wastewater disinfection using ozone to remove free-living, highly pathogenic bacteria and amoebae. *Ozone: Sci & Eng.* 2008;30(1):367-375.
101. Tachikawa M, Yamanaka K, Nakamuro K. Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone: Sci. & Eng.* 2009;31(1);3-9.
102. Mata J. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilicos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger* [tesis doctoral]. España: Universidad de Granada; 2006.

## Anexo A

### Preparación de solución Índigo

#### Solución madre de Índigo

En un matraz aforado de 1L, agregar 500mL de agua destilada, agregar 1 mL de ácido fosfórico concentrado y añadir con agitación, 770 mg de trisulfonato potásico de índigo, aforar con agua destilada. La solución madre es estable por cuatro meses almacenado en un frasco ámbar.

#### Reactivo II

En un matraz aforado de 1L, añadir 100mL de solución madre, 10g de fosfato monobásico de sodio y 7mL de ácido fosfórico concentrado. Diluir hasta el aforo (almacenar en frasco ámbar).

### Preparación de soluciones para FAMEs

Se requieren cuatro reactivos para saponificar, esterificar, extraer y lavar con base en el extracto de ácido graso.

#### Reactivo 1

45 g NaOH + 150 mL de Metanol + 150 mL de agua destilada

#### Reactivo 2

325 mL de HCl 6N certificado + 275 mL de Metanol

#### Reactivo 3

200 mL de Hexano + 200 mL de Metil-terbutil-éter

#### Reactivo 4

10.8 g de NaOH + 900 mL de agua destilada