



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto del cloro y del ozono en el
contenido de proteínas de *Vibrio
cholerae* en su morfología lisa y
rugosa**

TESIS

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biológico

PRESENTA

Edgar Cuellar Diaz

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Isaura Yáñez Noguez



Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del
12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023**

Agradecimientos

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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

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

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

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

Al Dr. Ignacio Monje Ramírez por su capacitación en el uso del ozonador.

Al Dr. Jorge Herrera Díaz de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo brindado para la realización de la electroforesis SDS PAGE 2D.

Dedicatorias

A mis padres, Gloria y Anselmo, que, con su ejemplo, motivación, paciencia y sobre todo su apoyo, ha sido posible la culminación de mi licenciatura. Gracias por cada consejo que me han dado, por su comprensión, amor, por confiar y creer en mí y en mis metas. Los amo.

A mi hermana Marisol, que siempre me ha dado grandes consejos y momentos de risa. Eres de las personas que más admiro, ya que siempre logras lo que te propones.

Gracias a la vida por este nuevo logro, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

Contenido

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Cólera	2
2.2. <i>Vibrio cholerae</i>	3
2.3. Toxina del cólera	4
2.4. Variante rugosa de <i>Vibrio cholerae</i>	5
2.5. Biopelículas	7
2.6. Desinfección de agua	10
2.7. Desinfección con ozono	11
2.8. Desinfección con cloro	12
2.9. Proteómica	14
2.10. Electroforesis	15
3. Antecedentes	18
4. Planteamiento del problema	23
5. Objetivo	26
6. Objetivos específicos	26
7. Hipótesis	27
8. Metodología	28
8.1. Método	28
8.2. Materiales	28
8.3. Procedimiento	30
8.4. Diagrama general de metodología	31
.....	31
8.4.1. Cultivo de <i>Vibrio cholerae</i>	32
8.4.2. Preparación de la solución de ozono	32
8.4.3. Preparación de muestras para tratamiento con cloro y ozono	33
8.4.4. Tratamiento con ozono	33
8.4.5. Tratamiento con cloro	33
8.4.6. Extracción de proteínas	34
8.4.7. Electroforesis SDS-PAGE	35
8.4.8. Electroforesis SDS-PAGE 2D	35
8.4.9. Análisis densitométrico de los geles	37
9. Resultados y análisis	38

9.1	Cuantificación de proteínas totales de <i>V. cholerae</i> variante lisa y rugosa antes y después del tratamiento con cloro y ozono	40
9.1.1.	Efecto del cloro y ozono en la variante lisa de <i>V. cholerae</i>	41
9.1.2.	Efecto del cloro y del ozono en la variante rugosa de <i>V. cholerae</i> ..	42
9.2.	Diferencias entre los patrones electroforéticos de <i>V. cholerae</i> lisa y rugosa antes y después de tratamiento con cloro y ozono	43
10.	Conclusiones	51
11.	Sugerencias.....	52
12.	Referencias Bibliográficas	53

1. Introducción

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un abastecimiento suficiente, seguro y accesible. La mejora del acceso al agua de consumo humano puede proporcionar beneficios para la salud. Se debe hacer el máximo esfuerzo para lograr que el agua de consumo humano sea tan segura como sea posible. Sin embargo, en países subdesarrollados o en desarrollo, el agua contaminada y el saneamiento deficiente están relacionadas con la transmisión de enfermedades como el cólera, la disentería, la hepatitis A, la fiebre tifoidea y la poliomielitis (1).

Las enfermedades emergentes son aquellas que aparecen en una población por primera vez o que, habiendo existido previamente, presenta un rápido incremento en su incidencia o de su distribución geográfica. Algunos agentes etiológicos de estas enfermedades presentan resistencia a procesos de desinfección de agua. Entre estos agentes se encuentra la bacteria *Vibrio cholerae* (2).

V. cholerae, el agente etiológico del cólera, enfermedad diarreica aguda acuosa, habita en ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios. En condiciones adversas para su sobrevivencia, como privación de nutrientes, presencia de sales y a bajas temperaturas puede producir exopolisacáridos para formar Biopelículas que le proporcionan resistencia, manteniendo su capacidad virulenta y le da una apariencia rugosa (3).

El presente estudio se enfoca en evaluar el efecto del cloro y del ozono en el contenido de proteínas de *V. cholerae* en su morfología lisa y rugosa evaluado por electroforesis SDS-PAGE 2D.

2. Marco teórico

2.1. Cólera

Es una enfermedad diarreica acuosa aguda causada por el bacilo *Vibrio cholerae*. Su transmisión se da por la ingesta de alimento o agua contaminados con el microorganismo o por transmisión fecal-oral directa (4). En 2017, 34 países reportaron a la Organización Mundial de la Salud un total de 1 227 391 casos y 5654 muertes provocados por cólera, lo cual representó un incremento del 45% en el número de casos y un 33% en el número de muertes, sobre los totales en 2016 (132 121 casos y 2420 muertes). En este mismo año, en el continente americano se reportaron un total de 13818 casos y 163 muertes. La mayor parte de casos ocurrió en Haití y en República Dominicana, Canadá y Estados Unidos también reportaron casos importantes (3 y 9, respectivamente) sin presentar muertes (5).

En México, en el año 2013 se presentaron 187 casos de cólera, la mayoría de ellos se presentó en el estado de Hidalgo con 159 casos. También hubo reportes en Veracruz, Estado de México, en el Distrito Federal (Ciudad de México) y en San Luis Potosí. En el año siguiente (2014), se informó de 14 casos, 13 en Hidalgo y un caso en Querétaro. Durante los años 2015 y 2016 se confirmaron los dos últimos casos de cólera en el país (5).

2.2. *Vibrio cholerae*

V. cholerae pertenece a la familia Vibrionaceae, cuyo nicho ecológico son aguas saladas costeras y estuarios. Son bacilos Gram negativos, mide de largo 1.5 a 2.5 μm y de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, son halófilos, con gran motilidad, su morfología celular es curvada, son anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa positivos, fermentadores positivos a glucosa, sacarosa y manitol. El medio selectivo de elección es el agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) donde las colonias crecen lisas de 2-4 mm, de color amarillo y pegajosas. Su fuente de carbono y nitrógeno en su medio ambiente es la quitina (6), (3). Posee un único flagelo impulsado por un motor de Na^+ (7).

Tabla 1. Características generales de *V. cholerae* (8).

Características generales <i>V. cholerae</i>	
Tamaño	0.5 a 0.8 por 1.5 a 2.5 μm
Gram	Negativas
pH óptimo	Entre 7.6 y 8.0
Temperatura óptima	37 °C
Productores de ácido a partir de:	Glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa y manitol
Hábitat	Estuarios, aguas saladas, intestino de pacientes con cólera

Existen más de 200 serogrupos de *V. cholerae*, entre los cuales el O1 y el O139 causan brotes epidémicos. *V. cholerae* O1 posee una membrana externa de lipopolisacáridos que definen el antígeno O1 específico, mientras que *V. cholerae* O139 carece de una porción del antígeno O1 y por lo tanto no aglutinan con antígeno O1, además, *V. cholerae* O139 produce una cápsula de polisacáridos (9).

El serogrupo *V. cholerae* O1 es dividido en dos biotipos: El Tor y Clásico, los cuales son diferenciados por pruebas bioquímicas y susceptibilidad a bacteriófagos específicos (6). Estos biotipos se dividen en tres serotipos, de acuerdo con diversos antígenos somáticos: Inaba, Ogawa e Hikojima. (Figura 1) (10). El biotipo El Tor es el causante de las epidemias actuales de cólera (6). (Figura 1).

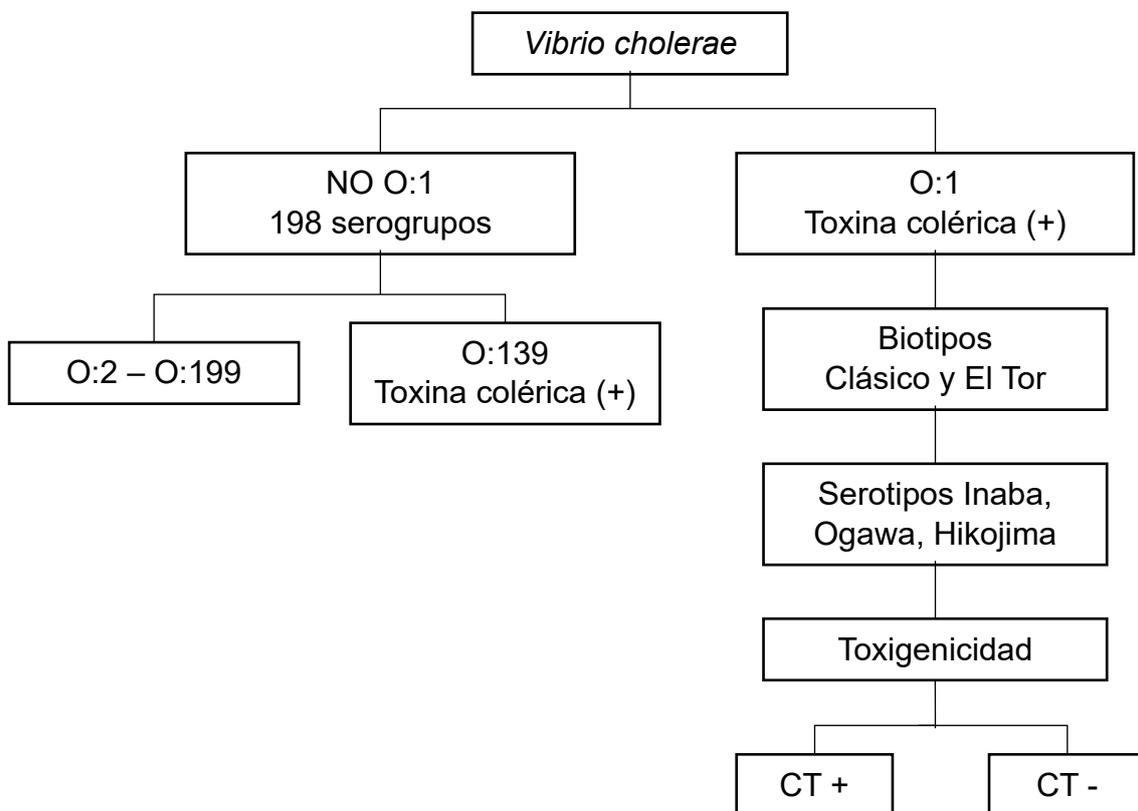


Figura 1. Clasificación de *V. cholerae* (10).

2.3. Toxina del cólera

El factor de virulencia de *V. cholerae* es la toxina colérica (Ctx), la cual es una proteína multimérica termolábil que consiste en una subunidad A (CtxA) incrustada en una configuración en forma de anillo de cinco subunidades B (CtxB). La CtxA tiene un peso molecular de 27.2 kDa y está asociado de forma

no covalente con el pentámero CtxB de 60 kDa (cada subunidad de CtxB es 11.6 kDa). Cuando *V. cholerae* se une al epitelio intestinal, segrega Ctx, la cual provoca un aumento en la producción de AMP cíclico, lo que condiciona alteración en el transporte de iones. Fluido y electrolitos se pierden en el intestino delgado sobrepasando la capacidad de absorción del colon, resultando grandes cantidades de diarrea (6).

Varias enzimas proteolíticas de *V. cholerae* están involucradas en la colonización de la bacteria en el intestino. Estas enzimas causan alteraciones en la función de la barrera de modelos animales al alterar las uniones intracelulares, facilitando la penetración de *V. cholerae* en la barrera mucosa (6). Otros factores que influyen en la colonización son: (1) un pili co-regulado con toxina del cólera, importante en la etapa temprana de la colonización, (2) HapA, una Hematoglutinina/metaloproteasa de Zn soluble que facilita la penetración bacteriana de la capa de moco intestinal, (3) el flagelo que mueve las bacterias hacia la superficie epitelial (4).

2.4. Variante rugosa de *Vibrio cholerae*

V. cholerae puede generar variantes fenotípicas que son colonias lisas y colonias rugosas, el cambio entre la colonia lisa a rugosa fue reportado por Morris et al. (11). Este cambio está asociado con la expresión de un exopolisacárido (EPS) que promueve la agregación de células y le da el aspecto arrugado a la colonia. También le da la capacidad de ser resistentes a la desinfección con cloro y conservar su actividad virulenta (11).

En condiciones de privación de nutrientes, las células de *V. cholerae* lisas pueden cambiar espontáneamente para expresar EPS y exhibir colonias rugosas que siguen mostrando actividad virulenta y se mantienen viables a pH 5, lo que sugiere que sobrevive durante el paso gástrico (12).

Las cepas rugosas de *V. cholerae* al tener materiales de EPS adquieren resistencia al estrés osmótico y oxidativo, además de que promueven la formación de la biopelícula. La variante rugosa ha mostrado resistencia a la cloración e incluso una cepa lisa al exponerse a cloro desarrolla la variante rugosa como forma de resistencia (13).

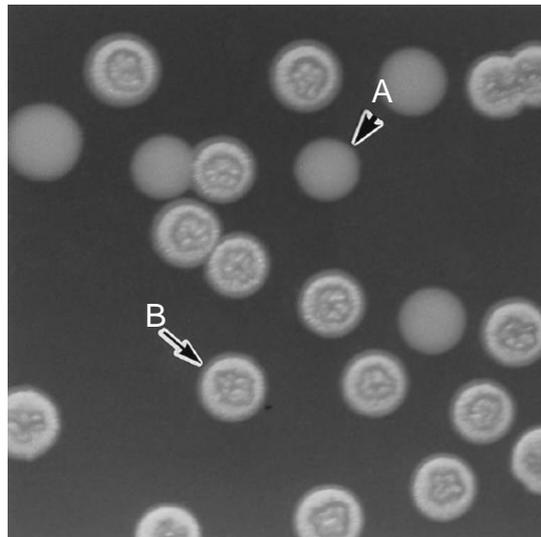


Figura 2. *V. cholerae*, (A) colonias lisas (B) colonias rugosas. Fuente: Wai, 1998 (13)

Al colocar la variante lisa de *V. cholerae* en medio de cultivo agua peptonada alcalina (1% proteose petone, 1% NaCl, pH 8.5), alrededor del 85% de estas colonias cambiaron al fenotipo rugosa (14).

Debido a su alta resistencia en el ambiente, este fenotipo de la bacteria puede sobrevivir por largos periodos de tiempo, lo que hace causa potencial de los brotes epidémicos de la enfermedad de cólera (15).

2.5. Biopelículas

Las biopelículas son comunidades de células microbianas unidas a una superficie ordenadas de manera tridimensional, constituida por aglomerados de bacterias rodeados por canales de agua que permiten la entrada de agua y la salida de metabolitos tóxicos (16). Las biopelículas están fuertemente implicadas en la virulencia bacteriana, algunos patógenos bacterianos que afectan al humano y que producen biopelículas son *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, estafilococos y estreptococos (17).

En las biopelículas de Vibrios, las células están unidas a un sustrato o a una interfaz biótica o abiótica, la cual puede ser la mucosa intestinal, zooplancton, fitoplancton, plantas acuáticas, crustáceos e insectos (18), (19). Los agregados de Vibrios se presentan en forma de suspensiones, flóculos y películas formadas en la interfaz líquido-aire de cultivos estáticos (18). Estas células bacterianas están unidas en una matriz extracelular auto producida, la cual es una mezcla compleja de EPS, proteínas, fosfolípidos y pequeñas cantidades de ácidos nucleicos (17), (7).

La naturaleza de las biopelículas depende de factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos surgen de acuerdo con el perfil genético de los componentes de las células microbiales. Los extrínsecos incluyen el ambiente fisicoquímico en el cual la biopelícula es localizada (20).

Las biopelículas están compuestas por una mezcla compleja de polímeros secretados, nutrientes absorbidos y metabolitos, productos de lisis celular e incluso material particulado y restos del entorno inmediato. El 97% de la

biopelícula es agua, la cual es fundamental para procesos de difusión. El resto son macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ADN y ARN, además de lípidos, fosfolípidos y otros componentes celulares (20).

Tabla 2. Componentes de la matriz de la biopelícula de *V. cholerae* (20).

Componente	% de la matriz de la biopelícula
Agua	Arriba de 97%
Células microbiales	2 – 5 %
Polisacáridos	1 – 2 % (neutral y polianiónico)
Proteínas (extracelular y resultados de lisis)	1 – 2 % (diversas, incluyendo enzimas)
ADN y ARN	1 – 2 % (de células lisadas)
Iones	Desconocido (unidos y libres)

La matriz de biopelícula de *V. cholerae* incluye proteínas como RbmA, RbmC y Bap1, así como el polisacárido VPS. RbmA (*Rugosity biofilm structure modulator A*) rodea las células para aumentar la acumulación de biopelícula y refuerza la estructura, mientras que Bap1 y RbmC adhieren la biopelícula a una superficie (21).

Las biopelículas bacterianas están frecuentemente incrustadas en una matriz extracelular autoproducida de EPS (22). Los EPS constituyen un 50% de la masa de la matriz de la biopelícula y es esencial para el desarrollo de la estructura tridimensional que la biopelícula presenta. Los EPS son polímeros de carbohidratos de alto peso molecular que están asociados con la formación de la variante de la colonia rugosa de *V. cholerae* (16). El polisacárido es secretado

de las superficies de la célula poco después de la adhesión al sustrato o a la interfaz (7).

Las bacterias producen EPS cuando nutrientes como nitrógeno, fósforo, azufre y potasio son limitadas. La producción de EPS aumenta en respuesta a factores como estrés osmótico, temperatura, en altas proporciones de carbono-nitrógeno y en la fase estacionaria. La composición de los EPS generalmente es independiente de la naturaleza del nutriente limitante, del pH, de la temperatura o del contenido de nitrógeno, carbón o fósforo en el medio de crecimiento (23).

Además de las colonias rugosas para diferentes bacterias, existen otras formas de resistencia en el ambiente como las células Viables No Cultivables (VNC), las cuales se caracterizan por no crecer en medios de cultivo, pero sí estar presentes, y sólo se detectan mediante técnicas de biología molecular. Se ha reportado que las células VNC de *V. cholerae*, en respuesta a la exposición por ozono, forma fibrillas de adhesión compuestas por exopolisacáridos, al igual que *Helicobacter pylori* en su estado VNC expuesto a cloro y ozono (24), (25).

La composición del EPS de *V. cholerae* reportada en por ciento del total de carbohidratos, consiste en 52% de glucosa, 37% de galactosa, 5.1% de N-acetilglucosamina, 3.8% manosa y 1.5% de Xylosa (26).

Debido a la resistencia de la variante rugosa de *V. cholerae* que se reporta en la bibliografía, tanto a condiciones ambientales como a desinfectantes como el cloro, es necesario ahondar más respecto al efecto que tiene este y otros desinfectantes como el ozono en las proteínas de la bacteria, de tal manera que se aporte a proponer alternativas de desinfección que ayuden a limitar la aparición de brotes de la enfermedad del cólera.

2.6. Desinfección de agua

La desinfección es el proceso de la destrucción selectiva de los organismos que causan enfermedades. No todos los microorganismos se destruyen durante el proceso de desinfección, en comparación a la esterilización, en donde ocurre la destrucción total de estos (27). Una desinfección eficaz es aquella que reduce el número de microorganismos a una cantidad que no perjudica la salud humana (28).

Los métodos más usados para llevar a cabo la desinfección son el uso de: 1) agentes químicos, 2) agentes físicos, 3) métodos mecánicos, y 4) radiación. Entre los compuestos químicos destacan el cloro y sus compuestos, ozono, bromo, yodo y alcoholes (28).

Las características que se deben de tomar en cuenta al elegir un desinfectante adecuado para una instalación de tratamiento son (29):

- Capacidad de introducirse y destruir agentes patógenos bajo condiciones normales de operación.
- Ausencia de características que puedan ser peligrosas para las personas y para el medio ambiente antes o durante de la desinfección.
- Fácil y seguro manejo, almacenamiento y transporte.
- Ausencia de residuos tóxicos y mutagénicos o carcinógenos después de la desinfección.
- Costo, operaciones y mantenimiento accesibles.

Un factor importante en el proceso de desinfección es el factor Ct, que se define como la combinación de la concentración del desinfectante en mg L^{-1} (C) y el

tiempo de contacto en minutos (t). Este factor es usado para calcular la dosis de desinfectante a utilizar en el proceso (25).

2.7. Desinfección con ozono

El gas ozono O_3 es un poderoso agente oxidante ampliamente utilizado para la desinfección primaria y la oxidación. El efecto bactericida es rápido, el tiempo de contacto habitual es de 4 y 10 minutos con dosis del orden 1-3 mg/L. También se sabe que es más efectivo que el cloro para matar virus, quistes y ooquistes (30).

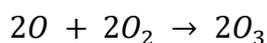
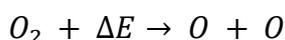
El ozono en desinfección se usa al inicio (desinfección primaria) o al final (desinfección secundaria). En el primer caso sirve para oxidar la materia orgánica precursora de la formación de subproductos orgánicos clorados que ocurre cuando hay una desinfección con cloro al final del tratamiento (30).

La aplicación del ozono en agua residual se inició a partir de los años 70s, como complemento de procesos tanto fisicoquímicos como biológicos. En México, el ozono se ha comenzado a aplicar como oxidante en plantas pequeñas de potabilización con problemas de alta contaminación orgánica y de color (31).

En el agua, el ozono actúa en forma directa, como ozono molecular, e indirecta, en diversos radicales libres que son más reactivos que el ozono molecular. En la forma directa el ozono molecular tiene dos formas de resonancia que hacen que actúa como dipolo, agente electrófilo o a gente nucleófilo. En la forma indirecta, los radicales que el ozono genera en el agua son varios. El principal es el radical hidroxilo $OH\cdot$ que es muy reactivo por tener un electrón desapareado (31).

El ozono es producido cuando las moléculas de oxígeno (O_2) se disocian a átomos de oxígeno por la aplicación de una corriente eléctrica que

subsecuentemente chocan con una molécula de oxígeno para formar ozono gaseoso estable (O₃) (29).



El mecanismo de desinfección usando ozono incluye oxidación/destrucción directa de la pared celular con fuga de los componentes celulares hacia afuera de la célula, reacciones con subproductos radicales de la descomposición de ozono, daño en las purinas, pirimidinas de los ácidos nucleicos, y rompe los puentes carbono-nitrógeno que conducen a la despolimerización (29).

Al aplicar ozono a *V. cholerae* se dañan los componentes intracelulares incluyendo la oxidación de proteínas, el daño al ADN del plásmido y la disminución de la actividad enzimática citosólica (25).

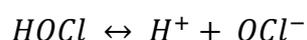
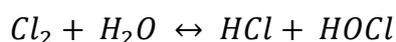
En la variante rugosa de *V. cholerae*, el uso de ozono como desinfectante mostró la inactivación de hasta 4.3 log (N₀/N) aplicando 18 mg/L de ozono con un tiempo de contacto de 10 minutos, siendo más eficiente que el cloro en la inactivación, sin embargo, no se observaron daños en la ultraestructura de la bacteria (32).

2.8. Desinfección con cloro

El cloro se ha usado como método continuo de desinfección de agua desde 1908 hasta la fecha, actualmente se aplica tanto en potabilización como depuración e incluye funciones adicionales a la desinfección, como son el control de sabor y olor, la prevención del crecimiento de algas en la infraestructura hidráulica, el mantenimiento de filtros, la remoción de hierro y manganeso, la destrucción del

ácido sulfhídrico, la remoción de color por ciertos colorantes orgánicos y el mantenimiento de sistemas de distribución de agua (31).

El mecanismo de acción del cloro consiste en afectar la integridad de la membrana celular, obstruyendo su permeabilidad y alterando las funciones celulares dañando enzimas y ácidos nucleicos (25). Cuando se agrega cloro al agua se forma el ácido hipocloroso HOCl que se disocia a H⁺ y OCl⁻.



La disociación se ve favorecida por el alto pH y temperatura del agua. El ácido hipocloroso HOCl y el ion hipoclorito OCl⁻, juntos se conocen como “cloro libre” y son las formas más efectivas de cloro para lograr la desinfección. De estos dos, el ácido hipocloroso es un bactericida mucho más poderoso que el ion hipoclorito, por lo que, el cloro libre actúa más rápidamente en agua ácida o neutra (30).

Los principales factores que influyen en la eficiencia de desinfección con cloro son la concentración residual libre, el tiempo de contacto, el pH y la temperatura del agua. Dada la concentración adecuada de cloro y el tiempo de contacto, todos los organismos bacterianos y la mayoría de los virus pueden inactivarse, por lo tanto, un criterio de diseño útil para el proceso de desinfección es el producto del tiempo de contacto (t en minutos) y la concentración de cloro libre residual (C en mg/L) al final de ese tiempo de contacto. Esto se conoce como el “valor de Ct” o “valor de exposición” (30).

Al aplicar cloro a células de *V. cholerae* en su variante rugosa, se observó por microscopía electrónica FESEM que el único efecto observado fue la separación de las células, es decir, los cúmulos formados por las biopelículas fueron separados, sin observar daño en su ultraestructura. La alta secreción de EPS por parte de la variante rugosa de esta bacteria limita la acción desinfectante del cloro (32).

Para establecer el efecto tanto del cloro como del ozono en las proteínas de *V. cholerae*, es necesario recurrir a estudios de proteómica como el aplicado en la presente tesis.

2.9. Proteómica

La proteómica es la ciencia que estudia las proteínas que expresa una célula en un momento o condición dada (33). Es el estudio a gran escala de las proteínas, especialmente de su estructura y funciones. El proteoma es el conjunto completo de proteínas producidas o modificadas por una célula, tejido o microorganismo; estas pueden cambiar en respuesta a condiciones ambientales o de estrés. Estos cambios se evalúan con técnicas proteómicas como la electroforesis de una dimensión (1-DE), electroforesis de dos dimensiones (2-DE), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) y espectroscopía de masas (34).

La proteómica se puede usar para la identificación de microorganismos desconocidos comparando con un mapa de referencia, evaluar factores de virulencia, identificación de microorganismos patógenos de no patógenos, detección de proteínas de superficie en microbiota y análisis de secretoma,

evaluación de efectos ambientales en el crecimiento y funciones de microorganismos (34).

Las bacterias, en respuesta a condiciones de estrés, pueden cambiar su proteoma como cambios adaptativos a estas condiciones. Los mecanismos por los cual cambia su proteoma son: degradación de proteínas y remodelación de la red transcripcional. Estos dan a las células el repertorio de redes mecanicistas para ajustar dinámicamente los procesos celulares y optimizar el comportamiento de respuesta (35).

2.10. Electroforesis

La electroforesis se denomina como el transporte de partículas cargadas en un campo eléctrico. Es una técnica de separación en la que las partículas cargadas se separan mediante la diferencia de su velocidad de migración, se usa para separar compuestos con carga neta, como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. La movilidad electroforética de una molécula depende de su carga, del coeficiente de rozamiento, del tamaño y forma de la molécula, pH y viscosidad el medio (36).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) es un método de separación de moléculas proteicas basado en su tamaño y carga. Dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias que no están enlazadas por puentes disulfuro, además los recubre con una carga negativa en relación con su tamaño, lo que permite estimar los pesos moleculares (37).

En la electroforesis bidimensional SDS-PAGE 2-D, una mezcla compleja de proteínas extraídas de células, tejidos o muestras biológicas, es separada de acuerdo con dos parámetros: el punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM). Toma el nombre de electroforesis bidimensional porque se lleva a cabo en dos pasos, en el primero, las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico, el cual es un parámetro físico específico de una molécula anfótera, se define como el pH en el que una molécula se encuentra en un estado de carga neta neutra. En el segundo paso, las proteínas se separan por su peso molecular en un gel de separación SDS – PAGE (38).

El primer paso de la electroforesis 2D SDS-PAGE es el isoelectroenfoco, en donde la proteína es colocada en un medio con un gradiente de escala de pH y es sometida a un campo eléctrico. En respuesta a esto, la proteína se mueve hacia el electrodo con carga “alternativa”. Durante el camino, pierde o gana protones. Su carga neta disminuye hasta que la proteína llega al sitio de la escala de gradiente adecuado a su punto isoeléctrico. Durante este paso, las proteínas se juntan en las bandas del gradiente de pH a su pI característico (39).

En el segundo paso, el SDS y las proteínas forman complejos en forma de anillo compuestos de micelas unidos con segmentos cortos de péptidos. El grado de separación por electroforesis entre un gel de poliacrilamida depende principalmente de la masa molecular relativa de la proteína. Hay un grado de asociación lineal entre el índice de la masa molecular relativa y la distancia relativa de migración del polipéptido SDS avanzando (39).

Para la visualización de proteínas en gel de poliacrilamida, se adiciona un colorante específico, el más usado es el colorante azul de Coomassie, el cual se

une a las proteínas mediante la formación de complejos mediados por fuerzas de Van Der Waals. Otros métodos de tinciones son las tinciones de plata y tinciones de fluorescencia (40).

La electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional puede separar de cientos a miles de proteínas individuales, además de visualizar isoformas de proteínas que resultan de modificaciones postraduccionales como la fosforilación, sulfatación, acetilación entre otras. La electroforesis bidimensional se combina con la espectrometría de masas para proporcionar la identificación de proteínas mediante algoritmos de búsqueda en bases de datos (41).

Las proteínas son biomoléculas con carga positiva y negativa. Dependiendo de su secuencia de aminoácido, pueden tener carga positiva o negativa. La carga neta de una proteína es modificada por la solución o buffer en la que se encuentra. Basado en el pH de la solución, las proteínas se pueden protonar o desprotonar y tener carga negativa o positiva neta. Dependiendo de su carga, las proteínas se mueven hacia el cátodo o ánodo (38).

3. Antecedentes

Para la bacteria *V. cholerae*, se han observado cambios en el perfil de su proteoma en condiciones anaerobias, se encontró que algunas proteínas desaparecieron, disminuyeron o aparecieron en el perfil proteico al someter la bacteria a estas condiciones. Aumentó la cantidad de proteínas involucradas en el transporte de sustratos, metabolismo de aminoácidos y de energía cuando las condiciones son aerobias. En condiciones anaerobias, la cantidad de proteínas involucrada en glucólisis y en respiración anaerobia aumentó (42).

Hommais, et. al. 2002 evaluó el efecto el tratamiento con ácidos débiles en la fisiología de *V. cholerae* por análisis proteómico, en donde se identificaron más de 50 proteínas, entre ellas las reguladas por pH que pertenecen a varias clases funcionales como intermediarios del metabolismo y de la envoltura bacteriana. Se observó que las proteínas que disminuyeron su concentración en respuesta al tratamiento con pH ácido están relacionadas con la organización y función de membranas y de lipopolisacáridos, además de pérdida de movilidad y reducción de la capacidad de formar biopelículas. Esto demuestra que *V. cholerae* es capaz de detectar una disminución moderada de pH y de modificar su estructura y fisiología (43).

Por otro lado, se ha observado que la bacteria *Escherichia coli* Enterohemorrágica O157 cepa F2 entra en un VNC cuando se somete a condiciones oxidativas, disminuye los niveles de factores de respuesta oxidativa y aumenta cantidades de proteína de membrana externa. Esto fue evaluado por electroforesis SDS-PAGE 2D en donde se observaron cambios en los niveles de concentración de las proteínas en los geles experimentales comparados con geles de referencia (44).

Debnath, et al. 2019, realizó un estudio donde comparó proteomas de *V. cholerae* para caracterizar el proceso de reanimación del estado viable no cultivable al estado viable de la bacteria por efecto de temperatura. Se seleccionaron 19 proteínas que cuya expresión en los geles de electroforesis 2D fue significativamente variable entre estos dos estados. Las proteínas seleccionadas están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, la utilización de fosfatos, la respuesta al estrés, transporte y traducción (45).

Shen, et al. 2016 (46), evaluó el efecto de agentes oxidantes sobre proteínas en el suero de ratones, usando electroforesis 2D, identificó que las proteínas, al someterlas a condiciones oxidativas, adquieren cambios en su estructura. Estas proteínas se carbonilan y son cuantificadas usando electroforesis en gel bidimensional (2D-Oxyblot).

Hasta donde se sabe no hay reportes que indiquen el efecto del cloro y el ozono en las proteínas de *V. cholerae*, tanto en su morfología lisa como rugosa. El enfoque en el ambiente sobre el uso de los desinfectantes encontrado en la bibliografía ha sido principalmente para la inactivación de la bacteria.

Para el caso del cloro, Sousa, et al, 2001 (47) probó su efecto en las células de *V. cholerae* para determinar la concentración bactericida de este desinfectante sobre la bacteria en muestras de camarones y agua contaminadas artificialmente. Las células de *V. cholerae* se expusieron a concentraciones de 5–10 ppm de cloro en solución durante 5 minutos. Los resultados indicaron que a 8 ppm de cloro fue efectivo en matar células viables de cultivos puros. Thampuran, et al., 2006 (48), al igual que Sousa, evaluó el efecto bactericida del cloro en células de *V. cholerae* en muestras de camarón y agua, encontrándose

que, con una concentración de 2 ppm de cloro residual en agua potable destruye una población de 10^7 UFC de *V. cholerae* en 30 minutos de exposición. Mientras que, en muestras de camarón, una concentración de 4 ppm destruye 10^3 UFC en 10 minutos.

El agua potable, a pesar de ser tratada con cloro, puede causar brotes de casos de cólera, como el ocurrido en los años de 2000 y 2001 en la isla Ebeye de la República de las Islas Marshall, en donde la mayor probabilidad de que las personas enfermaran de cólera fue porque bebieron de una instalación que presumía de segura al clorar adecuadamente el agua potable (49).

Morris, et al., 1996 (11) aplicó cloro a una concentración de 2 mg/L de cloro libre durante 30 minutos a la variante rugosa de *V. cholerae*, las cuales mostraron resistencia a estas condiciones. Al igual que Morris, Yildiz, et al., 1999 (26) demostró que los EPS de la variante rugosa de *V. cholerae* le confieren resistencia cuando se tratan con cloro a diferencia de la variante lisa de esta bacteria. Estas propiedades pueden permitir la supervivencia de *V. cholerae* dentro de hábitats acuáticos ambientales y causar brotes de enfermedades humanas.

En el caso del uso de ozono en el tratamiento de agua con presencia de *V. cholerae*, se realizó un estudio en el cual se evaluó el efecto del tipo de tratamiento de agua (filtración, UV, cloro, ozono) en el potencial crecimiento de *V. cholerae* y *V. parahemolyticus* en agua de mar, donde se encontró que las bacterias sobrevivían y además crecían cuando se trataban por estos métodos, se observó también que a altas concentraciones de ozono ocurría un mayor crecimiento de la bacteria (50).

Para otras bacterias también se ha reportado el uso tanto del ozono como del cloro. Orta, et al., 2017 (23), (51), evaluó los efectos del ozono y cloro en la desinfección de células VNC de *H. pylori* por técnicas moleculares e imágenes de microscopía FESEM. La aplicación tanto de ozono como de cloro mostró una reducción bacteriana de 5 log, sin embargo, el ozono se aplicó a una concentración y tiempo de contacto (CT) de 4 mg min/L, mientras que el cloro a un valor más alto de CT, además que el daño a la membrana celular no fue visible con FESEM para los ensayos en cloro.

En un estudio de la inactivación de *Vibrio parahaemolyticus* utilizando ozono acuoso se probaron concentraciones bajas y altas de ozono, demostrando que a menos de 0.125 mg/L las membranas celulares de la bacteria permanecen intactas, y a concentraciones superiores de 1 mg/L de solución acuosa de ozono las membranas fueron dañadas (52).

Se ha demostrado que el ozono inactiva bacterias que son resistentes a la desinfección con cloro, como *Bacillus alvei*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas sobria*, *Lysinibacillus fusiformis*, además de inactivar las esporas del género *Bacillus sp* dañando sus superficies celulares y el material genético alcanzando una tasa de inactivación del 99.9% después del tratamiento con ozono. (53).

También se ha utilizado ozonación junto con fotocatalisis usando dióxido de titanio, en la desinfección de aguas residuales municipales para inactivar patógenos transmitidos por el agua como *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Shigella* y *V. cholerae*. La ozonación fotocatalítica inactivó efectivamente estas bacterias con una reducción en el tiempo de

contacto requerido para la inactivación completa en un 50-70% en comparación con los procesos unitarios individuales de ozonación y fotocatálisis, además de no presentar crecimiento bacteriano posterior al tratamiento después de 24 y 48 horas (54).

Por su parte Ersoy, et al., 2019 (55), estudió el mecanismo de inactivación del ozono en *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Para esta inactivación se utilizó 1 mg/L de agua ozonizada con tiempos de contacto de 30 s, 1, 5, 10 y 20 min. De acuerdo con el análisis de citometría de flujo, a partir de los 30s de tratamiento con ozono dio como resultado la liberación de ADN y proteínas para ambos tipos de células.

Se realizó un estudio donde se usó cloro y ozono en la desinfección de *V. cholerae* variante rugosa, donde se evaluó el efecto que tienen estos desinfectantes en la ultraestructura celular de *V. cholerae* rugosa, encontrándose que con ambos desinfectantes no se observó daño en la estructura celular de la bacteria, sin embargo, con ozono se presentaron pliegues posiblemente causados por deshidratación de la célula (32), (56), (57).

En otro estudio donde se utilizaron cloro y ozono como desinfectantes, se evaluó el daño en las estructuras celulares y la inactivación de *V. cholerae* VNC, encontrándose que el ozono causa mayor daño en la estructura de la bacteria que usando cloro (25), (58).

4. Planteamiento del problema

La desinfección es el proceso de la destrucción mayoritaria de bacterias, virus y parásitos que contaminan un medio. Para que se logre una desinfección eficaz es necesario reducir del número de microorganismos a una cantidad que no perjudique la salud (28). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, el proceso de desinfección es de suma importancia llevarlo a cabo en la distribución de agua para uso y consumo humano con el fin de prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales entre otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas y radiactivas (56).

Los brotes epidémicos causados por el consumo de agua de suministro público tienen una gran repercusión sobre la salud pública dado el gran número de personas potencialmente expuestas, por ello la prevención de estos brotes radica en el mejoramiento en los controles de calidad aplicados a los sistemas de abastecimiento y desinfección de agua. Sin embargo, se han presentado brotes epidémicos originados por agua que cumple con requisitos de calidad para considerar como potable (57).

Las enfermedades emergentes son aquellas que aparecen en una población por primera vez o que, habiendo existido previamente, presenta un rápido incremento de su incidencia o de su distribución geográfica. Algunos agentes etiológicos de estas enfermedades presentan resistencia a procesos de desinfección de agua. Entre estos agentes se encuentra la bacteria *Vibrio cholerae* (2).

V. cholerae en condiciones de privación de nutrientes, presencia de sales y a bajas temperaturas puede entrar en un estado de sobrevivencia conocido como estado VNC y cambiar su morfología de bacilar a cocoide, además produce exopolisacáridos para formar biopelículas que le proporciona resistencia, manteniendo su capacidad virulenta (3).

La morfología rugosa de la bacteria *V. cholerae* tiene una elevada producción de EPS, los cuales son los responsables de producir fibrillas de adhesión que contribuyen a la formación de la biopelícula; esta biopelícula le confiere a la bacteria resistencia a la cloración y al estrés osmótico y oxidativo (58). Se ha reportado que, al usar cloro y ozono como desinfectantes, las células bacterianas que conforman la biopelícula únicamente se separan, sin presentar daños a la ultraestructura celular, lo que indica que la composición de las fibrillas de adhesión cambia o el contenido de EPS disminuye (31).

V. cholerae es entonces el agente etiológico de una enfermedad emergente como el cólera. El hecho de que se presente la reemergencia de esta enfermedad puede deberse a las variantes de resistencia que la bacteria desarrolla en el ambiente, como la variante rugosa o el estado VNC. Los estudios realizados en relación con el uso del cloro y del ozono, hasta el momento se han dirigido a la inactivación de la bacteria.

Pero ¿qué pasa con las proteínas de la bacteria? De acuerdo con lo indicado en la bibliografía, se han observado cambios importantes en el contenido de proteínas relacionadas con diferentes funciones celulares, algunas esenciales para la sobrevivencia de *V. cholerae*, como los observados en su variante lisa, comparada con su estado VNC, cuando son sometidas a condiciones de estrés

(45). Al respecto, otro tipo de proteínas, como las contenidas en suero de ratones, en efecto mostraron cambios en su estructura ante la exposición a agentes oxidantes (46).

Sin embargo, hasta donde se sabe no se ha estudiado el cambio en el contenido de proteínas de *V. cholerae*, tanto en su variante lisa como rugosa cuando es sometida a oxidantes como el cloro y el ozono. Determinar estos cambios ayudará a vislumbrar qué proteínas son afectadas en los procesos de desinfección; de tal manera que se conocerá si durante los mismos, las proteínas que tienen que ver con la infectividad de la bacteria pueden ser eliminadas o por lo menos disminuidas. El alcance de la presente tesis es determinar si el contenido de las proteínas en las variantes lisa y rugosa de *V. cholerae* se ve afectado por acción del cloro y del ozono.

5. Objetivo

Evaluar el efecto del cloro y el ozono en el contenido de proteínas de *Vibrio cholerae* en su morfología colonial lisa y rugosa por medio de electroforesis 2D SDS-PAGE.

6. Objetivos específicos

- Determinar el contenido total de proteínas en las variantes lisa y rugosa de *V. cholerae* antes y después de someterla al tratamiento con cloro y ozono.
- Establecer las diferencias en el contenido de proteínas por el efecto del cloro y ozono en la bacteria de *V. cholerae* en sus variantes lisa y rugosa.

7. Hipótesis

El cloro y ozono provocarán cambios químicos respecto al perfil y contenido de proteínas en las variantes lisa y rugosa de la bacteria *Vibrio cholerae*.

8. Metodología

8.1. Método

Tipo de estudio: Experimental prospectivo longitudinal.

Población de estudio: Muestras de proteínas obtenidas de la variante colonial lisa y rugosa de *Vibrio cholerae*.

Criterios de inclusión: Muestras de proteínas obtenidas de la variante colonial lisa y rugosa de *V. cholerae* antes y después de someterlas a tratamiento con cloro y ozono.

Criterios de exclusión: Muestras de proteínas de *Vibrio cholerae* que presenten contaminación.

Variables independientes

- Tipo de solución de tratamiento: ozono o cloro.
- Concentración de desinfectante.
- Tiempo de contacto de ozono y cloro con las soluciones bacteriana.

Variable dependiente: Cantidad de proteínas.

8.2. Materiales

Equipo

- Generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA).
- Centrífuga.
- Incubadora.
- Polytron (homogenizador).
- Unidad de isoelectroenfoque PROTEAN i12 IEF Cell (BioRad).
- Sistema de electroforesis SE600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE).

Instrumentos

- Densitómetro calibrado GS-900 (BioRad).
- Colorímetro Hach Pocket Colorimeter II.
- Espectrofotómetro Hach.

Material de vidrio

- Columna de burbujeo de vidrio de 2L.
- Vasos de crecimiento Corning.

Material en general

- Tira en gel de poliacrilamida de 11 cm con gradiente inmovilizador (IPG BIORAD).
- Bandeja de rehidratación (Inmobiline DryStrip Reswelling Tray, BIORAD).
- Software Image Lab.

Medios de cultivo

- Agar infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion).
- Agar tripticasa de soya (TSA).
- Agar Tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS).

8.3. Procedimiento

Para determinar los cambios en el perfil de proteínas de *V. cholerae* por efecto de los tratamientos con cloro y ozono, la bacteria se sometió a la exposición de estos dos oxidantes aplicando un valor CT de 15 mg min L⁻¹ para cloro y un valor CT de 7.5 mg min L⁻¹ para ozono. Después de este tratamiento, se llevó a cabo la extracción de proteínas celulares por el método de extracción de proteínas por fenol; las proteínas se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. Después de un procedimiento de purificación, las muestras fueron cuantificadas por electroforesis SDS PAGE. Posteriormente, se tomaron 500 µg de proteína y se colocaron en una tira de gradiente de pH para separarlas por su punto isoeléctrico (pI). Esta tira se colocó en un gel para su separación por su peso molecular por el método de electroforesis de dos dimensiones. Finalmente, se observaron los cambios que se presentaron en los geles, se determinó el cambio tanto cualitativo como cuantitativo de los spots identificados. En el diagrama de la Figura 3, se presenta el procedimiento general que se siguió para la metodología de esta investigación.

8.4. Diagrama general de metodología

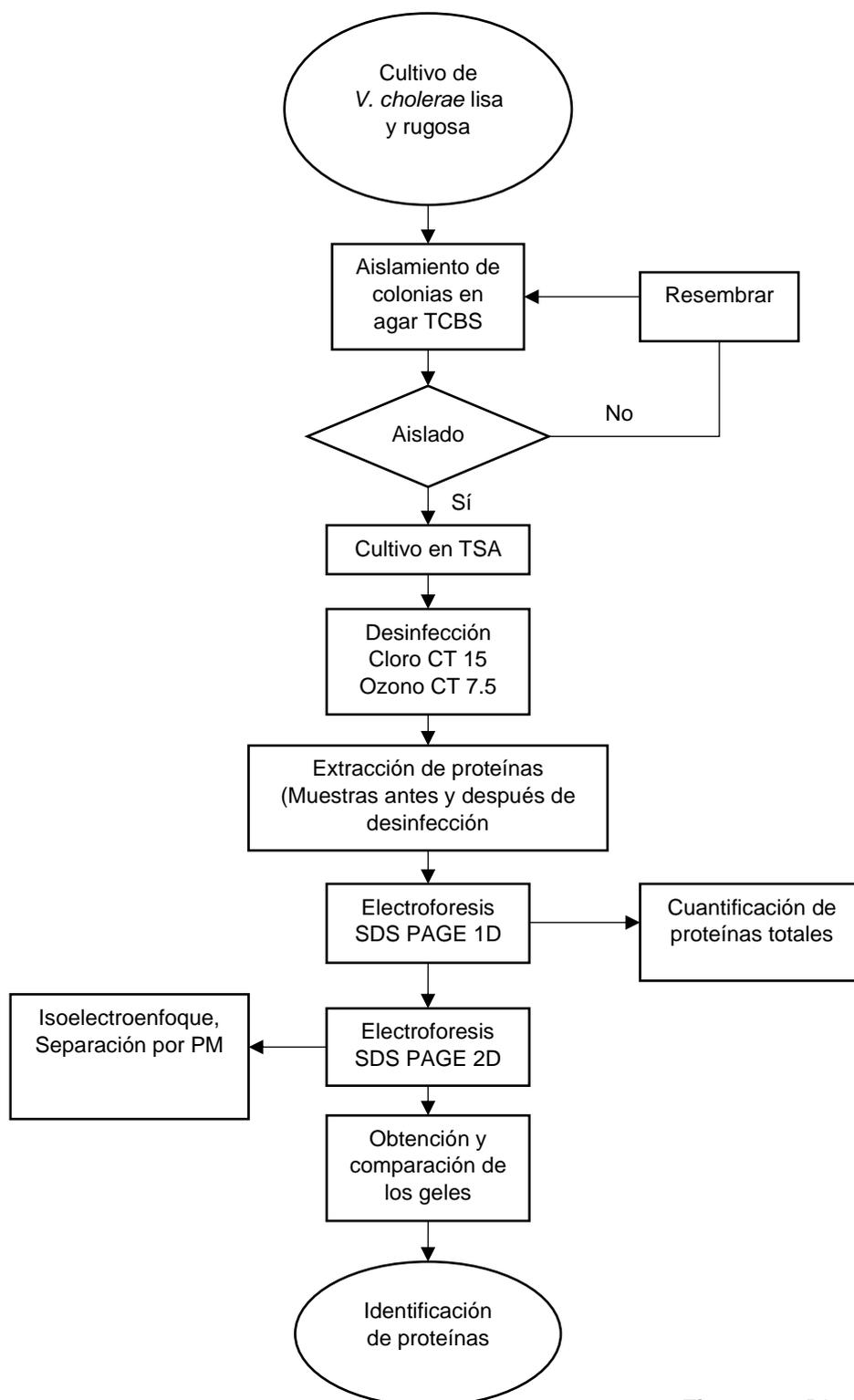


Figura 3. Diagrama general de metodología.

8.4.1. Cultivo de *Vibrio cholerae*

La cepa de *V. cholerae* O1 variante lisa, fue proporcionada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). La cepa fue sembrada en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés Brain Heart Infusion) y conservada en refrigeración hasta su uso.

La cepa de *V. cholerae* variante rugosa fue inducida a partir de *V. cholerae* variante lisa alternando el cultivo 24 horas en Agua Peptonada Alcalina (APA) al 1% y 24 horas en agar BHI durante 20 días. La inducción de la variante rugosa se logró a los 20 días de exposición. La bacteria se conservó en placas de agar TSA, resemebrando cada 15 días.

8.4.2. Preparación de la solución de ozono

Se generó ozono usando un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA), con capacidad de producción de 1.9 g de O₃/h, aplicando 0.7 Ampers y un flujo gas de 1.0 L/min a una temperatura de 20 °C. La solución acuosa de ozono se preparó burbujando ozono gaseoso en 1.5 L de agua destilada fría en una columna de vidrio de dimensiones 110 cm de altura por 5.5 cm de diámetro, con capacidad de 2 L. EL ozono se transfirió al agua por medio de un disco difusor con diámetro de poro 10 - 15 µm. El tiempo de burbujeo fue de 30 minutos hasta que la solución acuosa de ozono alcanzó una concentración de 3.8 ppm, medido por el método de índigo, que consiste en tomar una alícuota de 10 mL de la muestra de ozono y aforarla a 100 mL con agua destilada, para medir su absorbancia a una longitud de 600 nm.

8.4.3. Preparación de muestras para tratamiento con cloro y ozono

A partir de cultivos de 24 horas de *V. cholerae* en placas TSA sembrado masivo, se tomaron asadas de la bacteria (variantes lisa y rugosa de manera independiente), se resuspendieron en 50 mL de agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 9×10^8 bacterias/mL de acuerdo con el # 3 de la escala nefelométrica de McFarland.

8.4.4. Tratamiento con ozono

A partir de la solución bacteriana de cada variante, se tomaron 10 mL y se agregaron a tubos Corning, que contenían 63.68 mL de agua destilada estéril. A estos tubos se les agregaron 23.32 mL de solución acuosa saturada con ozono a una concentración de 3.8 mg/L, obteniendo una concentración final de 1 mg/L de ozono, la solución se expuso por un tiempo de 7.5 minutos. Bajo estas condiciones de análisis se considera entonces que corresponde a un valor CT de 7.5 mg/L min. Una vez que se cumplió este tiempo, se agregaron 0.5 mL de una solución estéril de tiosulfato de sodio para detener la reacción de desinfección. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos y se recuperó el pellet, el cual se conservó a 4°C para posteriormente llevar a cabo la extracción de las proteínas.

8.4.5. Tratamiento con cloro

Se tomaron 10 mL de solución bacteriana y se agregaron a tubos Corning que contenían 88.7 mL de agua estéril. A estos tubos se le agregó 1.3 mL de una solución de cloro 75 mg/L y se tomó el tiempo para cumplir 15 minutos, siendo así un CT de 15 mg/L. Posterior a los 15 minutos se agregaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio para detener la reacción de desinfección. Las se muestras se

centrifugaron y se obtuvo el pellet, el cual se conservó en refrigeración, para posteriormente llevar a cabo la extracción de las proteínas.

8.4.6. Extracción de proteínas

Se realizó el mismo proceso de extracción de proteínas para todas las muestras de variante lisa y rugosa que consistió en lo siguiente:

Se tomó un gramo de la biomasa sometida a los procesos de desinfección, cabe hacer mención que las muestras control para cada variante sin desinfección se procesaron de la misma forma que las muestras problema. El proceso de extracción de proteínas consistió en agregar 5 mL de fenol pH 8.8 y 5 mL de buffer de extracción (100 mM tris HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamercaptoetanol) a la muestra. Usando un polytron (homogeneizador) se mezcló tres veces por 1 minuto. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante (fase orgánica) y se agregó a otro tubo que contenía 25 mL de Acetato de amonio 100 mM en metanol. Esta mezcla se colocó a -20°C por 24 horas. Se centrifugó a 4000 rpm por 30 min. Se realizaron dos lavados con 5 mL acetato de amonio-etanol, 2 lavado con acetona al 80% y un último lavado con etanol al 70%. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 500 µL de buffer IEF (buffer de isoelectro enfoque por sus siglas en inglés Isoelectric Focusing) con micropipeta, cuando se resuspendió por completo, se trasladó a un tubo eppendorf para centrifugarse a 14000 rpm por 15 min. El sobrenadante (cristalino) se almacenó a -80°C para su posterior análisis en SDS – PAGE.

8.4.7. Electroforesis SDS-PAGE

Se preparó un Gel SDS PAGE para electroforesis 1-D a una concentración del 15%, posteriormente se inyectaron las muestras que ya contenían loading buffer. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por dos horas y media. El gel se colocó a tinción con azul de coomassie por 24 horas. Se tomó fotografía de los geles con densitómetro GS-900 y se obtuvo la concentración de proteínas.

8.4.8. Electroforesis SDS-PAGE 2D

Se utilizaron 500 µg de las muestras y se resuspendieron en 215 µL de buffer desnaturalizante (8M urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 2% tritón X100 y 50 mM DTT) después se aplicaron en una tira de gel de poliacrilamida de 11 cm (7 cm) con un agente inmovilizador de pH (IPG BIORAD) de un rango de 3-10 durante 10 minutos a temperatura ambiente en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, BIORAD). Posteriormente las tiras fueron cubiertas con aceite mineral y la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque PROTEAN i12 IEF (BioRad) para rehidratarlas activamente (12h, a 20°C), seguida de cuatro pasos de focalización: 250 V por 30 min (rápida) 10000 V por 2 h (gradiente), 10000 V por 1 h (rápido), 1000 por 2 h (sostenido) por 12 h, hasta un voltaje acumulado de 43-47 kVh.

Posterior a la focalización, se desechó el aceite mineral y se incubó con un buffer de equilibrio SDS (Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5% p/v SDS 2% DTT). Las muestras se incubaron en esta solución por 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Se repitió la incubación dos veces, posteriormente se incubó con un buffer de alquilación SDS (Trsi-HCl 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5 % p/v SDS 2.5% iodoacetamida) durante 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente, se repitió la incubación dos

veces más. Después de la incubación, se prepararon las muestras para las corridas de las proteínas en SDS 1X mediante la aplicación de un breve lavado con amortiguador de corrida.

La preparación y condiciones de corrida para los geles 2D llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizó el sistema de electroforesis SE 600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE), empleando geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% de 16 x 15 cm. Para preparar los geles de acrilamida se elaboraron tres soluciones: la primera es una solución concentrada de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8% en agua bidestilada, esta segunda se le agrega a la primera para obtener la concentración del gel de resolución, cuya función es separar a las proteínas por peso molecular. La tercera es una solución 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, SDS 10% en agua bidestilada, que se le agrega a la primera para obtener el gel concentrador, cuya función es concentrar rápidamente las proteínas contenidas en las tiras IPG. Así también, se añaden 0.05% APS y 0.005% TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización. Las soluciones se transfirieron a la cámara de polimerización del sistema SE600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE), cada tira IPG se colocó sobre la superficie de un gel, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal base. Para fijar los geles y evitar pérdidas de proteínas cuando estas migran de la tira al gel, se añadió una solución de agarosa 0.5 % p/v en amortiguador de corrida SDS-PAGE y con trazas de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 25°C con un voltaje constante de 50 V por 22 horas a temperatura ambiente en un tampón de corrida SDS-PAGE.

Una vez concluido el proceso de electroforesis, los geles se tiñeron incubándolos en solución de tinción (8 % p/v sulfato de amonio, 2 % ácido fosfórico, 20 %

etanol y 0.1 % de azul de Coomassie G-250) durante, al menos 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los geles se destiñeron los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de manchas.

8.4.9 Análisis densitométrico de los geles

Las imágenes fueron capturadas en un sistema de densitómetro calibrado GS-900 BioRad para el análisis densitométrico, el cual consiste en seleccionar las zonas deseadas a cuantificar y compararlas con un estándar de concentración conocida. En cada uno de los geles se agregó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Lisozima y se corrió junto con las muestras, siendo este el estándar para estimación relativa de las bandas de proteínas. Se utilizó el Software de adquisición y análisis de imágenes ImageLab para el análisis de las imágenes escaneadas de los geles de electroforesis 2D, el cual mide la densidad óptica de los spots de proteínas separadas en los geles. Relacionando las densidades ópticas del estándar y de las muestras, se obtienen la concentración de los spots de proteínas y de las proteínas totales.

9. Resultados y análisis

Para determinar y evaluar los cambios en el contenido de proteínas de *V. cholerae* en sus variantes lisa y rugosa, antes y después del tratamiento con cloro y ozono, se cuantificaron las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE 2D de las muestras sin tratamiento, tratadas con cloro aplicando un valor de CT 15 mg/L min y tratadas con ozono aplicando un valor CT 7.5 mg/L min. Los geles resultantes de la electroforesis SDS-PAGE 2D se obtuvieron digitalmente usando un densitómetro calibrado GS-900 Calibrated Densitometer (BioRad), las imágenes se presentan en las **Figuras 4 y 5**.

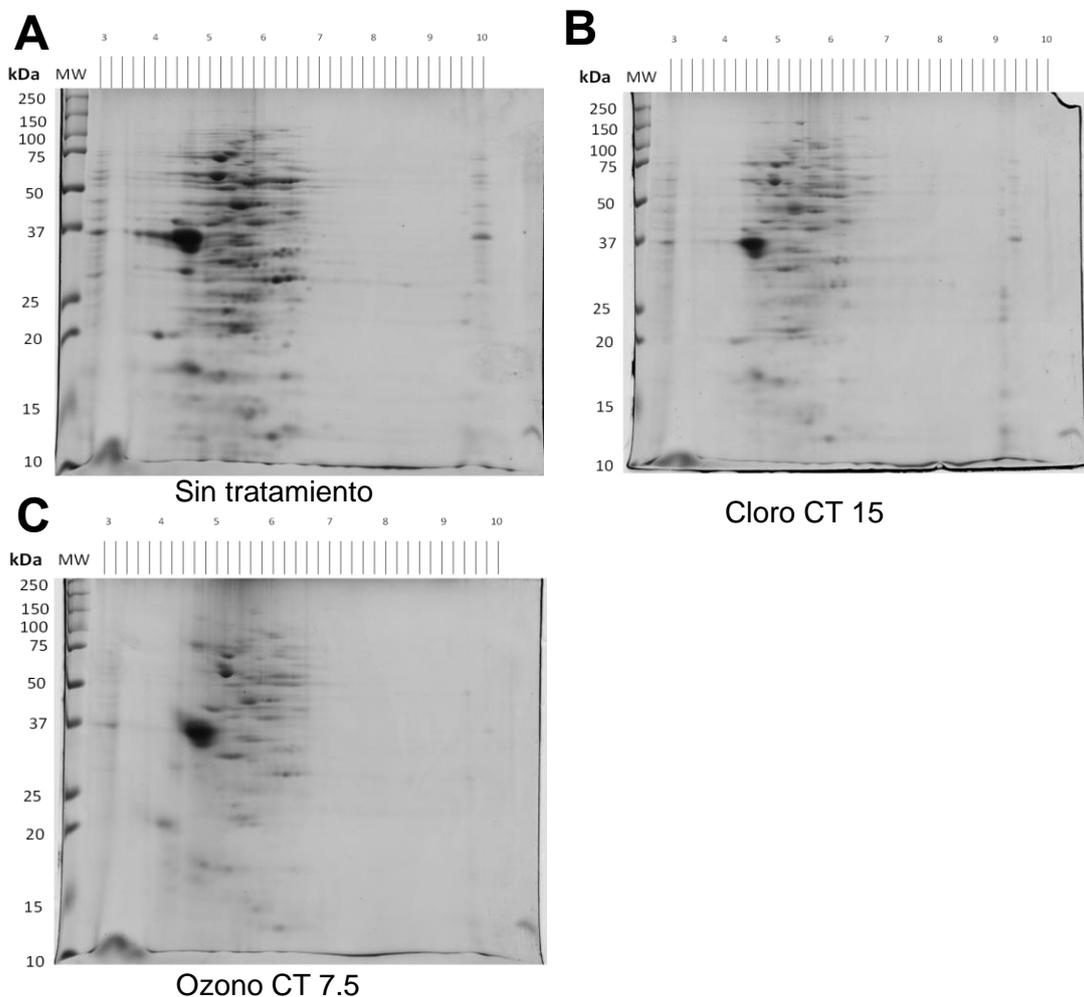


Figura 4. Patrón electroforético en 2D de la muestra *Vibrio cholerae* variante lisa. **(A)** *V. cholerae* sin tratamiento, **(B)** *V. cholerae* tratada con cloro CT 15 mg/L min, **(C)** *V. cholerae* tratada con ozono CT 7.5 mg/L min.

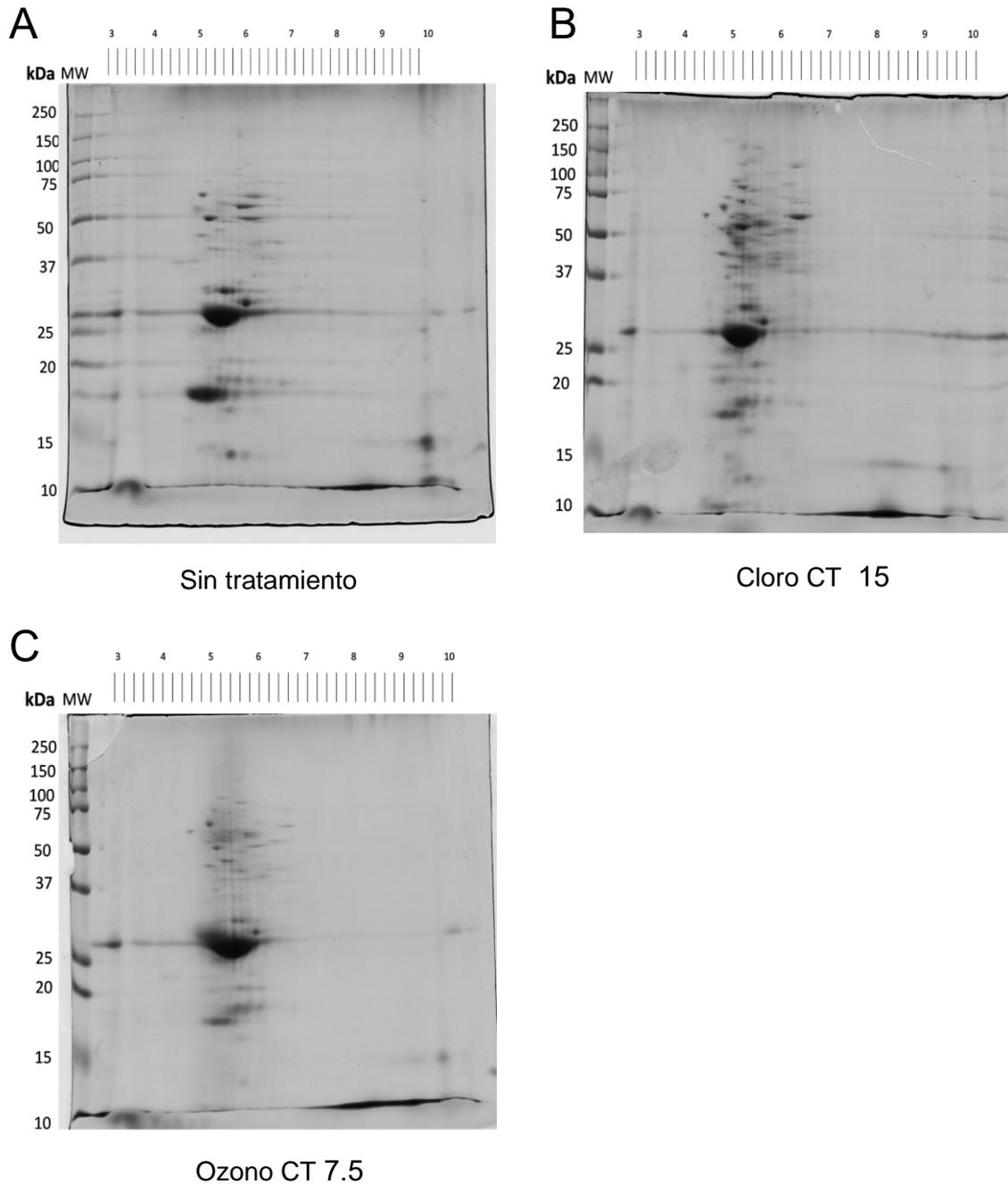


Figura 5. Patrón electroforético en 2D de la muestra *Vibrio cholerae* variante rugosa. **(A)** *V. cholerae* sin tratamiento, **(B)** *V. cholerae* tratada con cloro CT 15 mg/L min, **(C)** *V. cholerae* tratada con ozono CT 7.5 mg/L min.

En las Figuras 4 y 5 se observa el patrón electroforético en 2D bien resuelto de las muestras de *V. cholerae* en un rango de puntos isoeléctricos de las proteínas de pH de 3-10, así como de peso molecular de 15 a 75 kDa.

9.1 Cuantificación de proteínas totales de *V. cholerae* variante lisa y rugosa antes y después del tratamiento con cloro y ozono

Para cuantificar las proteínas totales de las muestras de *V. cholerae* variante lisa y rugosa sin tratamiento, tratadas con cloro CT 15 mg/L min y tratadas con ozono CT 7.5 mg/L min, se usó el software Image Lab (BioRad). Mediante este software, se comparó en el mismo gel la densidad óptica del área de expresión de los spots migrados de proteínas en el gel de electroforesis SDS-PAGE 2D de cada muestra, con un estándar de concentración conocida (Lisozima, 1 µg). El estándar fue sometido a las mismas condiciones de análisis de proteínas que las muestras. Las concentraciones obtenidas se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 6.

Tabla 3. Concentración de proteínas totales de *V. cholerae* antes y después de tratamiento con ozono y cloro.

Concentración de proteínas totales (µg) de <i>V. cholerae</i>			
	Sin tratamiento	Tratamiento Cloro CT 15 mg/L min	Tratamiento Ozono CT 7.5 mg/L min
<i>V. cholerae</i> lisa	325.9759	208.4884	182.0510
<i>V. cholerae</i> rugosa	185.8029	249.7030	197.2154

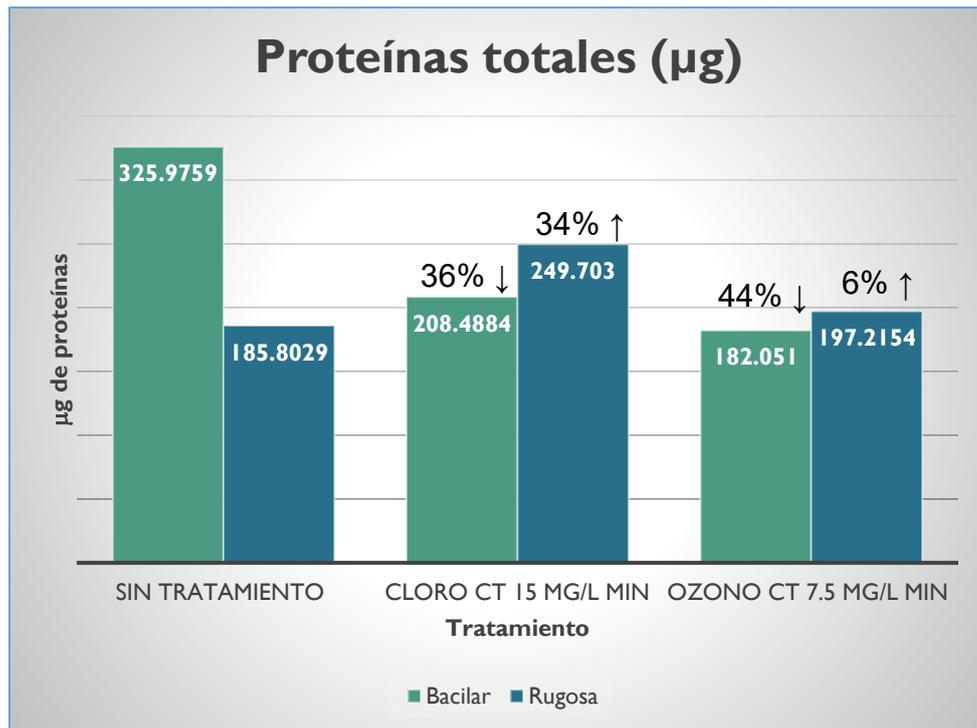


Figura 6. Cantidad de proteínas totales de las variantes lisa y rugosa de *V. cholerae* sin tratamiento (A), tratamiento con cloro CT 15 (B) y tratamiento con ozono CT 7.5 (C).

9.1.1. Efecto del cloro y ozono en la variante lisa de *V. cholerae*

En la Figura 6 se puede observar que hubo una disminución de la concentración de proteínas de la variante lisa al ser tratada con cloro CT 15 y con ozono CT 7.5, disminuyendo un 36.04% y 44.15% respectivamente. Aunque se aplicó la misma concentración de 1 mg/L tanto para cloro y para ozono, se observó que el ozono disminuyó en mayor cantidad la concentración proteínas a los 7.5 minutos de tiempo de contacto, en comparación con los 15 minutos de contacto con cloro. Esto podría deberse a que el mecanismo de acción del ozono consiste en la lisis celular o la ruptura de la pared celular, mientras el cloro tiene que difundirse a través de la membrana celular para llevar a cabo la inactivación, inhibiendo la oxidación de glucosa por grupos sulfhidrilo de enzimas importantes en el metabolismo de carbohidratos (31), (59), (60). El ozono reacciona con las proteínas y provoca la oxidación del esqueleto polipeptídico de la proteína, la

división del enlace peptídico, la reticulación proteína-proteína y un rango de modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos. El ácido hipocloroso (HOCl) presente en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) es el causante de la degradación de proteínas, destruye ciertas enzimas participantes en el metabolismo de carbohidratos por la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (59).

La disminución en la cantidad de proteínas totales fue mayor cuando se trató a la bacteria con ozono que con cloro y en menor tiempo. Esto se observa de manera similar en los resultados obtenidos por Atengueño, 2018 (25), en donde se aplicaron los mismos valores de CT de cloro y ozono para la inactivación de células de *V. cholerae*, observándose mayor daño a la bacteria por lisis celular usando ozono y por lo tanto fuga de proteínas y su degradación.

9.1.2. Efecto del cloro y del ozono en la variante rugosa de *V. cholerae*

En la figura 6 se observa un aumento de 34.39% en la concentración de proteínas totales de la variante rugosa de *V. cholerae* al ser tratada con cloro CT 15 mg/L min y un aumento de 6.14% cuando se trató con ozono CT 7.5 mg/L min. Esto puede ser debido a que la variante rugosa desarrolla exopolisacáridos (EPS) que forman parte de la biopelícula y le proporcionan resistencia a la bacteria a los efectos de los agentes oxidantes (11), (61), (13). Se ha observado que al tratar con ozono a la variante lisa de *V. cholerae* en su estado viable no cultivable y a *Helicobacter pylori* (24), se forman fibrillas de adhesión de EPS observado por microscopía FESEM como respuesta a estos agentes.

De manera similar, Yañez, et al 2018 (32), usó cloro y ozono en la desinfección de la variante rugosa de *V. cholerae* y mediante microscopía FESEM evaluó el daño en la ultraestructura de la bacteria cuando se aplicaban estas sustancias,

sin embargo, no se observaron daños en *V. cholerae* rugosa en ambos tratamientos.

El aumento en la cantidad de proteínas en la variante rugosa de *V. cholerae* después del tratamiento con ozono, se observó de manera similar para la bacteria *Escherichia coli* en un estudio realizado por Ersoy, et al, 2019 (55). En dicho estudio, se aplicó ozono a *Escherichia coli* y a *Enterococcus faecalis* y se observó que en los primeros 30 segundos de contacto, ocurría un aumento en la concentración de proteínas, así como un aumento en la concentración de ADN; los cuales son indicadores significativos para conocer la integridad de la membrana. Al romperse la membrana de las bacterias ocurre una fuga de estas macromoléculas, lo que puede causar posteriormente su degradación por el contacto con el ozono en la solución de prueba (55).

9.2. Diferencias entre los patrones electroforéticos de *V. cholerae* lisa y rugosa antes y después de tratamiento con cloro y ozono

En las Figuras 7 y 8 se presentan los spots de proteínas en los patrones electroforéticos de la variante lisa y la variante rugosa, respectivamente, etiquetados con números para su fácil identificación.

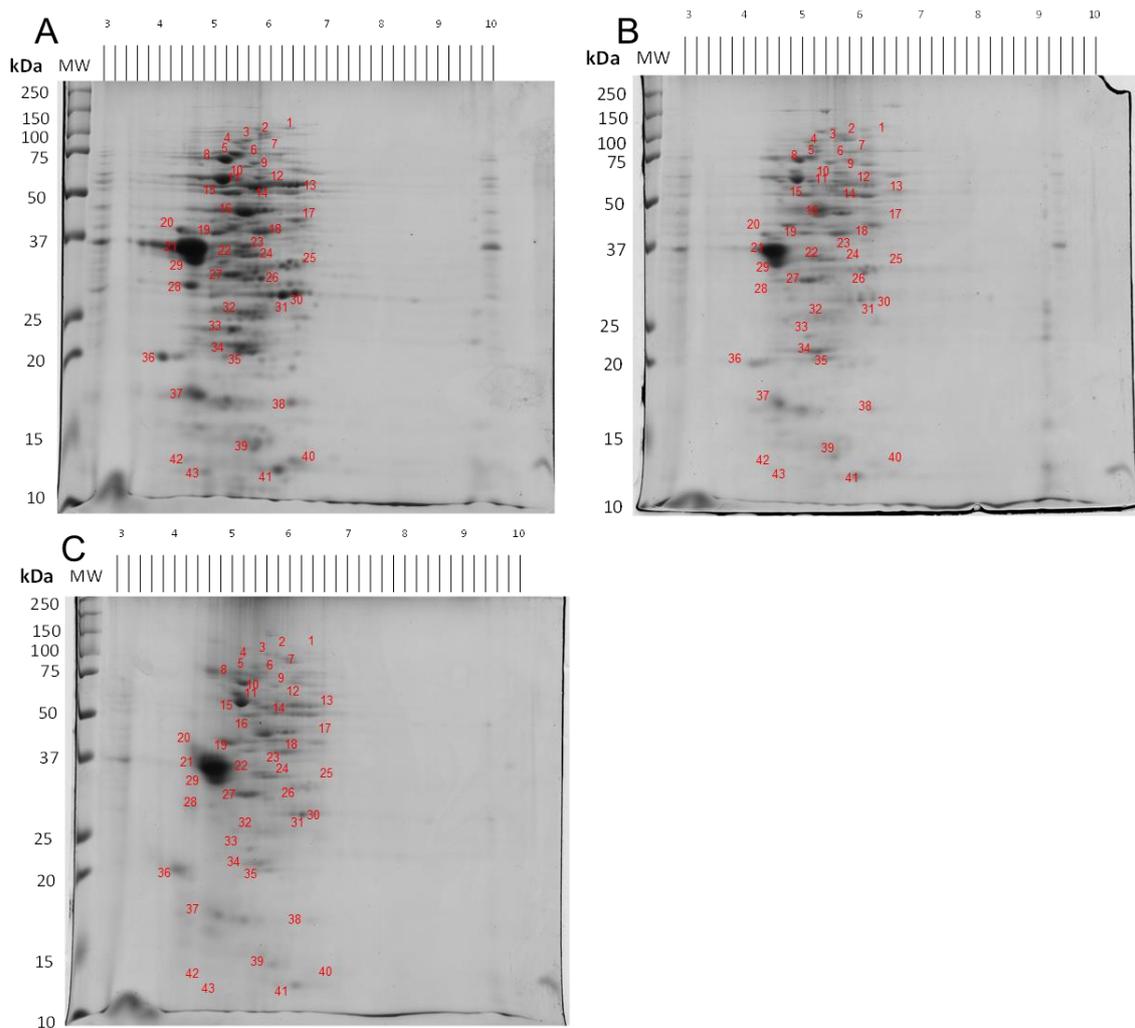


Figura 7. Spots de proteínas de *V. cholerae lisa* sin tratamiento (A), tratamiento con cloro CT 15 mg/L min (B) y tratamiento con ozono CT 7.5 mg/L min (C).

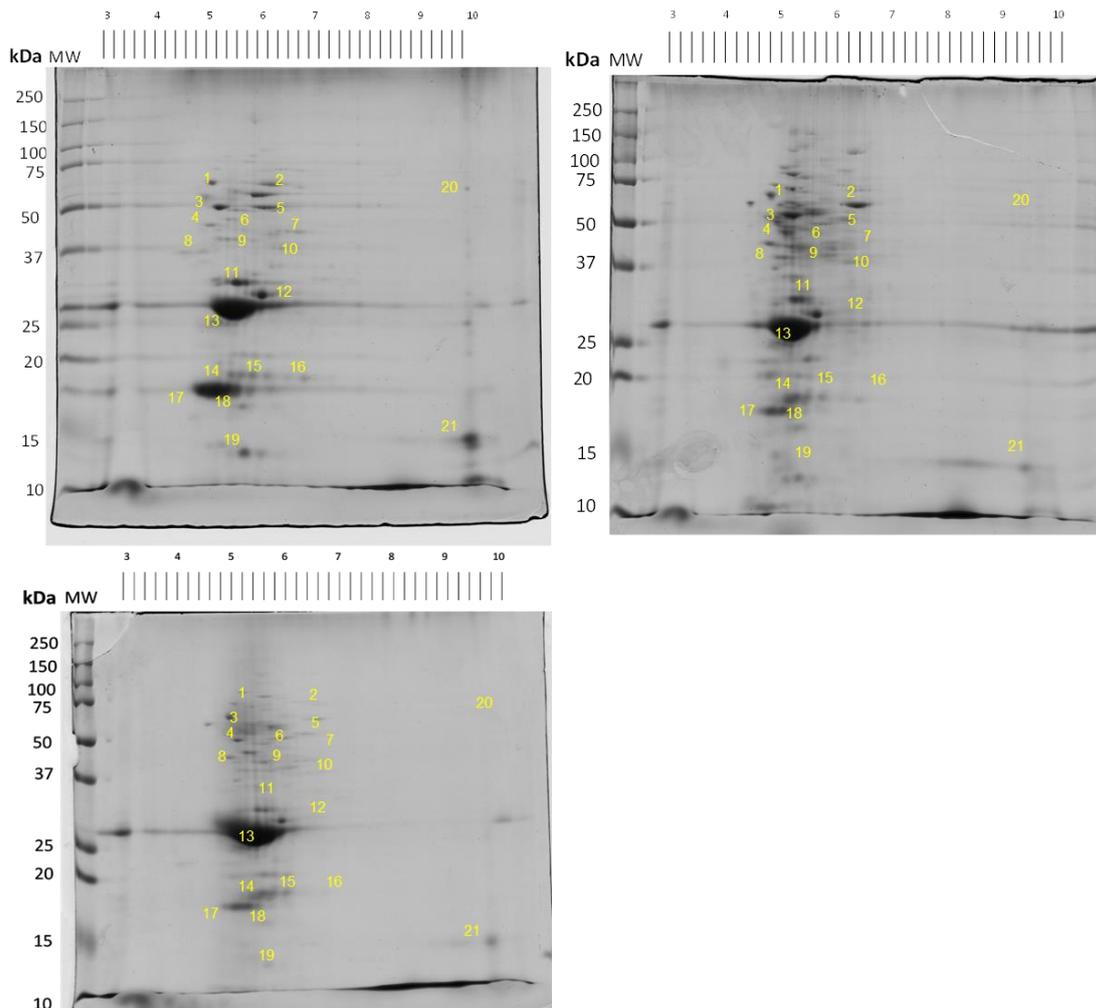


Figura 8. Spots de proteínas *V. cholerae rugosa* sin tratamiento **(A)**, tratamiento cloro CT 15 mg/L min **(B)**, tratamiento ozono CT 7.5 mg/L min **(C)**.

Estos spots de proteínas etiquetados se concentraron en la Tabla 4 para la variante lisa y en la Tabla 5 para la variante rugosa, junto con su peso molecular, punto isoeléctrico, densidad óptica antes de tratamiento, tratada con cloro CT 15 mg/L min y tratada con ozono CT 7.5 mg/L min.

Tabla 4. Densidad óptica de spot de proteínas de *V. cholerae* variante **lisa**.

Proteína #	PM/pl	Sin tratamiento (DO)	Cloro CT 15 mg/Lmin (DO)	Ozono CT 7.5 mg/L (DO)
1	108.1/6.3	188.53	80.71 (57.2%)	33.88 (82.0%)
2	97.4/5.8	280.88	256.26 (8.8%)	195.69 (30.3%)
3	90.0/5.6	315.90	65.70 (79.2%)	49.37 (84.4%)
4	86.6/5.4	145.76	118.26 (18.9%)	105.44 (27.7%)
5	73.3/5.4	1 178.71	391.95 (66,7%)	59.43 (95,0%)
6	78.6/5.5	291.75	102.53 (64.9%)	253.38 (13.2%)
7	73.3/6.2	283.61	117.16 (58.7%)	104.80 (63.0%)
8	70.1/5.2	2 318.53	960.14 (58.6%)	855.78 (63.1%)
9	67.2/5.7	222.64	163.84 (26.44%)	311.32 (139.8%)
10	65.2/5.5	142.04	22.02 (84.5%)	24.59 (82.7%)
11	57.3/5.1	3 849.31	1 462.13 (52.7%)	679.94 (78.0%)
12	58.0/5.8	310.79	186.19 (40.1%)	219.78 (29.3%)
13	54.6/6.5	3 088.29	256.49 (91.8%)	333.64 (89.2%)
14	53.5/6.5	2 157.69	579.32 (73.2%)	374.70 (82.6%)
15	50.4/5.3	1 481.44	354.97 (76.0%)	233.28 (84.2%)
16	44.1/5.5	2 907.32	2 178.42 (25,1%)	293.97 (89,9%)
17	41.6/6.5	796.66	502.98 (36.9%)	186.36 (76.6%)
18	38.2/5.8	1 281.10	603.45 (52.9%)	421.22 (67.1%)
19	38.1/5.0	896.88	280.45 (68.7%)	917.65 (102.3%)
20	38.4/4.4	1 003.46	326.43 (67.5%)	34.6 (96.5%)
21	34.8/4.6	15 138.63	8 501.52 (43.8%)	14 137.14 (6.6%)
22	32.6/5.4	617.64	454.94 (26.3%)	297.16 (51.9%)
23	35.4/5.6	730.27	150.28 (79.4%)	46.96 (93.6%)
24	33.8/5.7	740.86	368.10 (50.3%)	438.92 (40.7%)
25	32.1/6.4	2 047.92	736.01 (64.1%)	318.19 (84.5%)
26	30.2/5.8	655.63	34.26 (94.8%)	24.49 (96.3%)
27	30.7/5.3	740.85	351.23 (52.6%)	88.77 (88.0%)
28	29.1/4.6	1 532.22	121.66 (92.0%)	76.94 (95.0%)

Tabla 4. Continuación

Proteína #	PM/pl	Sin tratamiento (DO)	Cloro CT 15 mg/L min (DO)	Ozono CT 7.5 mg/L min (DO)
29	32.8/4.6	3 287.31	1 549.16 (52.9%)	2 106.04 (35.9%)
30	27.9/6.4	1 052.82	118.50 (88.7%)	163.94 (84.4%)
31	27.8/6.2	1 587.04	208.17 (86.9%)	333.28 (79.0%)
32	25.4/5.6	1 175.00	362.22 (69.1%)	429.58 (63.4%)
33	23.2/5.3	1 488.09	170.80 (88,5%)	94.63 (93,6%)
34	21.1/5.5	2 291.77	721.51 (68,5%)	424.95 (81,9%)
35	20.9/5.6	1 266.91	395.56 (68.8%)	241.68 (80.9%)
36	19.8/4.0	1 216.66	643.14 (47,1%)	917.85 (24,5%)
37	17.3/4.7	3 459.21	1 348.47 (61.0%)	626.67 (81.9%)
38	16.9/6.4	931.32	136.60 (85,3%)	104.81 (88,7%)
39	14.3/5.7	1 314.10	246.31 (81.3%)	145.02 (89.0%)
40	13.0/4.5	484.39	68.48 (85.9%)	56.17 (88.4%)
41	12.3/6.1	847.18	350.25 (58.7%)	254.48 (70.0%)
42	12.6/6.4	155.10	49.25 (68.2%)	626.67 (404.%)
43	12.1/4.8	266.32	49.25 (81.5%)	35.97 (86.5%)

En la Tabla 4 se observa que hubo una disminución en todas las proteínas cuando la bacteria *V. cholerae* variante lisa se trató con cloro y con ozono, excepto en los spots 9, 19 y 42, en donde la densidad óptica de estos aumentó únicamente cuando la bacteria fue tratada con ozono. Las disminuciones más significativas (mayor del 90%) ocurrieron en el spot 5, 20, 23, 26, 28, 33 en el caso de tratamiento con ozono, mientras que, con cloro, los spots fueron 13, 26 y 28.

Se observa que los spots de proteínas con peso molecular menor a 40 kDa disminuyen en mayor cantidad su concentración cuando son tratadas con ozono, mientras que cuando se trata a la variante lisa con cloro, los spots con alto peso molecular (mayor a 70 kDa) disminuyen en menor cantidad su concentración.

Los spots de proteínas identificadas con los números 30 al 40 en la variante lisa se produjeron a niveles más bajos en los proteomas cuando son tratadas con cloro CT 15 mg/L min y aún más bajos en los obtenidos con tratamiento con ozono CT 7.5 mg/L min, por lo que las proteínas de menor tamaño y puntos isoeléctricos ácidos son susceptibles a agentes oxidantes. Las proteínas que son dañadas al someterse a agentes oxidantes como el cloro y el ozono pueden ser observadas por la carbonilación proteica, la cual es el principal marcador de la oxidación de proteínas. Shen et al. 2016 (46) usó la variante electroforesis 2D-Oxyblot para identificar y seleccionar proteínas que servirán como marcadores moleculares en el diagnóstico de Alzheimer.

Tabla 5. Densidad óptica de spot de proteína de *V. cholerae* variante rugosa

Proteína #	PM/pl	Sin tratamiento (DO)	Cloro CT 15 mg/L min (DO)	Ozono CT 7.5 mg/L min (DO)
1	64.2/5.1	348.05	206.28 (40,7%)	41.59 (88,0%)
2	63.2/6.3	572.39	1 485.18 (259,5%)	90.22 (84,2%)
3	50.7/5.3	1 144.21	2 016.17 (176,2%)	261.05 (77,2%)
4	44.5/5.1	131.57	389.53 (296.1%)	321.00 (244.0%)
5	50.8/6.2	1 363.94	381.40 (72,0%)	131.61 (90,4%)
6	46.4/5.7	83.91	247.62 (295.1%)	178.14 (212.3%)
7	42.5/6.8	175.43	67.80 (61.4%)	5.46 (96.9%)
8	37.0/4.7	146.85	439.79 (299.5%)	113.51 (22.7%)
9	40.2/5.5	169.54	415.66 (245.2%)	168.57 (0.6%)
10	36.6/6.5	155.25	271.43 (174.8%)	59.72 (61.5%)

11*	31.3/5.6	2 133.85	1 522.76 (28,6%)	492.71 (76.9%)
------------	----------	----------	------------------	----------------

Tabla 5. Continuación

Proteína #	PM/pl	Sin tratamiento (DO)	Cloro CT 15 mg/L min (DO)	Ozono mg/L min (DO)
12*	29.4/5.3	2 165.99	448.20 (79,3%)	457.17 (78,9%)
13 *	27.2/5.5	23 302.48	24 591.80 (105,5%)	37 477.75 (160.8%)
14	18.6/5.6	563.50	1 556.49 (276.2%)	1 001.39 (177.7%)
15	18.6/6.0	362.80	633.36 (174.6%)	865.51 (238.6%)
16	18.6/7.0	229.26	298.39 (130.2%)	450.79 (196.6%)
17	17.9/5.0	13 060.85	2 418.42 (81,5%)	2 084.47 (84,0%)
18	17.5/5.4	431.23	288.30 (33,1%)	143.66 (66,7%)
19	12.8/5.8	1 449.43	610.01 (57,9%)	179.35 (87,6%)
20	60.6/10.0	54.09	30.95 (42.8%)	0.60 (98.9%)
21	14.0/10.0	3 036.26	490.73 (83.8%)	663.07 (78.2%)

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 5, los spots de proteínas 2, 3, 8, 9 y 10 aumentaron su concentración solamente con tratamiento con cloro. Por otro lado, resalta el spot con número 13, que aumentó 105.5% su densidad óptica cuando se trató con cloro y 160.8% con ozono. Este spot inicialmente se encontraba en alta concentración antes de los tratamientos y al ser tratada aumentó aún más. El autor Fong (61), et al, reportó en 2006 una proteína llamada RbmA importante en la formación de la biopelícula y la expresión de EPS con un peso molecular de 26.4 kDa, que se expresa en la variante rugosa cuando se somete a condiciones de estrés. Así que los spots 11, 12 y 13 pueden ser o estar relacionadas con esta proteína. La proteína RbmA promueve la adhesión célula-célula durante etapas de la formación de la biopelícula (62) y cuando se expone a condiciones de estrés (61), por lo tanto, el aumento en la densidad óptica del spot 13 de la variante rugosa puede ser una medida de resistencia de la bacteria

para mantener la unión célula-célula en la biopelícula ante condiciones de estrés, tanto al aplicarse cloro y ozono.

En la Tabla 5 resalta el spot de proteína número 1 con un peso molecular de 64.2 kDa y un punto isoeléctrico de 5.1, datos similares a la proteína la Bap1 (Biofilm-Associated Protein, por sus siglas en inglés), con peso molecular de 72 kDa. Bap1 tiene como función promover la adhesión de la biopelícula a las superficies bióticas o abióticas (63), (64). Al tratar con cloro la variante rugosa, este spot disminuye un 40.7%, mientras que con ozono disminuye un 88.0%. La proteína Bap1 es un componente hidrófobo de la estructura extracelular de las bacterias, al igual que otros componentes hidrófobos importantes en la formación de la biopelícula de *E. coli* y bacterias de los géneros *Streptomyces* ssp y *Salmonella* spp. Estos componentes son objetos de estudio para el desarrollo fármacos enfocados a la prevención y eliminación de biopelículas (62).

10. Conclusiones

El análisis proteómico mediante electroforesis 2D SDS-PAGE realizado para las variantes lisa y rugosa de *V. cholerae*, indicó que el cloro y el ozono actúan de manera diferente en el contenido proteínico de la bacteria. Con la aplicación del cloro se observó una disminución en el contenido de las proteínas que tienen un peso molecular alto tanto para la variante lisa como rugosa. Mientras que, con la aplicación del ozono, la concentración de proteínas con peso molecular bajo disminuyó en mayor medida en ambas variantes.

El ozono en comparación con el cloro demostró ser más efectivo y en menor tiempo en la degradación de proteínas en la bacteria *V. cholerae* variante lisa. La cantidad de proteínas totales disminuyó en un 36.0418% para dicha variante después de someterlas al proceso de ozonación. Contrariamente, para la variante rugosa se observó un incremento en la concentración de proteínas del 6.1423% cuando se expuso al tratamiento con ozono. Tal incremento puede deberse un aumento en la secreción de exopolisacáridos, ya que se observó un aumento en la cantidad de proteínas en la zona de expresión de la proteína RbmA en los geles de electroforesis SDS-PAGE 2D. Dicha proteína está estrechamente relacionada con la secreción de exopolisacáridos. Así mismo la presencia de exopolisacáridos está dada en la bacteria como mecanismo de resistencia a situaciones de estrés, en este caso a la oxidación.

Se demostró que el ozono tiene mayor efecto sobre proteínas importantes en la formación, estructura y función de la biopelícula de la variante rugosa de *V. cholerae*, disminuyendo la expresión de la proteína Bap1 y aumentando la de RbmA, por lo que el ozono evita que la biopelícula se adhiera a superficies, pero aumentando la unión entre las células de *V. cholerae* variante rugosa.

11. Sugerencias

Los geles de electroforesis SDS-PAGE 2D obtenidos podrán ser usados en futuros proyectos para identificar, por medio de espectroscopía de masas, proteínas características de cada una de las tres variantes, para posteriormente desarrollar marcadores moleculares que ayuden a detectar la presencia de *V. cholerae* y sus variantes en presencia de muestras de agua de interés.

12. Referencias Bibliográficas

1. OMS. Guías Para la Calidad del Agua de Consumo Humano: Cuarta Edición que Incorpora la Primera Adenda. Cuarta edición. WHO Graphics. Ginebra. 2011.
2. World Health Organization. Water, Sanitation and Health Team. Emerging Issues in Water and Infectious Disease. World Health Organization. 2003. [Internet]. [Consultado 22 feb de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf
3. Colwell R. R., Brayton, P., Herrington D., Tall, B., Huq, A., Levine, M. M. Viable but non-Culturable *V. cholera* O1 Revert to a Cultivable State in the Human Intestine. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 1996; 12(1): 28-31.
4. Clemens, J. D., Nair, G. B., Ahmed, T., Qadri, F., Holmgren, J. Cholera. Lancet. 2017; 390(10101): 1539 – 1549.
5. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. 2018; 93(38): 489-500.
6. Weil, A. A., Harris, J. B. *Vibrio cholera*. En: Tang Y. W. editor. Mol Med Microbiol. Vol 2. 2nd edición. Massachusetts USA: Academic Press; 2015. 1079-1098.
7. Teschler, J., Zamorano, D., Utada, A. S. Warner, C. J., Wong, G. L., Linington, R. G., Yildiz, F. Living in the Matrix: Assembly and Control of *V. cholerae* Biofilms. Nat Rev Microbiol. 2016; 13(5): 255-268.
8. Breed, R., Murray, E., Smith, N. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Séptima edición. Baltimore. Sans Tache. 1957.

9. Chaiyanan, S., Chaiyanan, S. Huq, A., Mangel, T., Colwell. Viability of the Nonculturable *V. cholera* O1 and O139. *Syst Appl Microbiol.* 2001; 24(3): 331-341.
10. Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados Para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera. [Internet]. [Consultado 13 de febrero 2019]. Disponible en: http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/06_Manual_Colera.pdf
11. Morris, J. G., Jr., M. B. Sztein, E. W. Rice, J. P. Nataro, G. A. Losonsky, P. Panigrahi, C. O. Tacket, and J. A. Johnson. 1996. *Vibrio cholerae* O1 Can Assume a Chlorine-Resistant Rugose Survival Form that is Virulent for Humans. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(6): 1364–1368.
12. Wai, S., Mizunoe, Y., Yoshida, S. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiology Letters.* 1999; 180(2): 123-131.
13. Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., Yoshida, S. I. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation. *Appl And Environ Microbiol:* 1998; 64 (10): 3648-3655.
14. Ali, A., Rashid, M., Karaolis, D. High-Frequency rugose exopolisaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (11): 5773-5778.
15. Rahman, M., Jubair, M., Alam, M., Weppelmann, T., Azarian, T., Salemi, M., Sakharuk, I., et al. High Frequency Rugose Exopolysaccharide

- Production by *Vibrio cholerae* Strains Isolated in Haiti. PLoS ONE. 2014; 9(11): 1-12.
16. Suzarte, E. Campos, J. Marreno, Y. Rodríguez, B. L. Martínez, E., Ledón, T. Moreno, A. Fando, R. Construcción y Caracterización de Mutantes de *Vibrio Cholerae* Incapaces de Formas Biofilm. CENIC Ciencias Biológicas. 2005; 36(1): 46-51.
17. Yonezawa, H., Osaki, T., Woo, T., Kurata, S., Zaman, C., Hojo, F., Hanawa, T., Kato, S., Kamiya. Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. Anaerobe. 2011; 17(6): 388-390.
18. Silva, A. J., Benitez, J. A. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016; 10(2): 1-25.
19. Yildiz, F. Fong, J. Sadovskaya, I. Grard, T. Vinogradov, E. Structural Characterization of the Extracellular Polysaccharide from *Vibrio cholera* O1 El-tor. PLoS ONE. 2014; 9(1): 1-10.
20. Sutherland, I. The Biofilm Matrix-an Immobilized but Dynamic Microbial Environment. Trends Microbiol. 2001; 9(5): 222-227.
21. Smith, D. R. Maestre-Reyna, M., Lee, G., Gerard, H., Wang. A., Watnick, P. In Situ Proteolysis of the *Vibrio cholerae* Matrix Protein RbmA Promotes Biofilm Recruitment. PNAS. 2015; 112(33): 10491-10496.
22. Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., Kimaya, S. Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK 1402 are Involved in Biofilm Formation. BMC Microbiology. 2009; 9: 197.

23. Nichols, C. A., Guezennec, J., Bowman, J. P. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Environments Whit Special Consideration of the Southern Ocean, Sea Ice, and Deep-Sea Hydrothermal Vents: A Review. *Mar Biothechnol* (NY). 2005; 7(4): 253-271.
24. Orta, M. T., Yañez, I., Casasola, B., Román, P. Effects of Ozone and Chlorine Disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by Molecular Techniques and FESEM Images. *Environ Technol*. 2016; 38(6): 744-753.
25. Atengueño, K., Yáñez, I. Orta, M. T. Daños Estructurales a la Bacteria *Vibrio cholerae* Viable No Cultivable Sometida a Procesos de Desinfección Mediante Ozono y Cloro. XXXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. AIDIS. Guayaquil. 2018.
26. Yildiz. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a Gene Cluster Required for the Rugose Colony Type, Exopolysaccharide Production, Chlorine Resistance, and Biofilm Formation. *Proc Natl Acad USA*. 1999; 96(7): 4028-4033.
27. Metcalf & Eddy. ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización. Tercera Edición. MacGrawHill. Vol 1. 1996
28. Flores, J. L., Martínez, J. C., Casillas, F. J. Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Seguridad. [Internet]. México: Secretaria de Salud; 1999. [Consultado febrero de 2019] Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/sanidad.html>
29. Solomon, C. Casey, P. Mackne, C. Lake, A. Fact sheet. Ozone disinfection. National Small Flows Clearinhouse. 1998

30. Ratnayaka, D., Brandt, M., Johnson, M. Disinfection of water. En: Brandt, M., Johnson, M. *Water supply*. 6th Edition. Butterworth-Heinemann; 2009. p. 475-511.
31. Comisión Nacional del Agua. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento, Desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento. México. 2007. pp 27-140
32. Yáñez, I., Atengueño, K., Pérez, D., Luna, A., Orta, M. T. Efecto del Cloro y el Ozono en la Ultraestructura Celular de *V. cholerae* Variante Rugosa. XXXVI. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental "En Vía al Desarrollo Sostenible" AIDIS. Guayaquil. 2018
33. Washburn, M., Yates, Y. Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3(3): 292-297.
34. Sepehrimanesh, M. Properties of Probiotic Bacteria: A Proteomic Approach. En: Watson, R., Preedy, V. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Academic Press. 2016; 593-604.
35. Guo, M, S., Gross, C, A., Stress-Induced Remodeling of the Bacterial Proteome. *Curr Biol*. 2015; 24(10): 424-434
36. González, J. Electroforesis. En: Gonzalez, J. *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (Terza edizione)*. 3ra Edición. Elsevier Masson. 2010. 211-217
37. Brunelle, J., Green, R. One-Dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). En: Galluzzi, L *Methods in Enzymology*. Academic Press. Vol 541. Baltimore, USA; 2014: 151-159

38. Saraswathy, N Ramalingam, P. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics. Woodhead Publishing Series in Biomedicine. 2011, Pages 159-170
39. Dudhe, P., Kshirsagar, M., Yerlakar, S. A Review on 2D Gel Electrophoresis: A Protein Identification Technique. Int J Sci Info Tech. 2015; 5(1) 856-862.
40. Carrillo, J. G., Candia, M. P., Lugo, R. E., Espinoza, E., Noriega, J. A. Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). INVURNUS. 2013; 8(1):19-26.
41. Friedman, D., Hoving, S., Westermeir, R. Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. En: Galluzzi, L. Methods in Ezimology. Academic Press. 2009. Vol 463: 515-540.
42. Kan, B., Habibi, H., Schmid, M., Liang, W., Wang, R., Wang, D., Jungblut, P. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. Proteomics. 2004; 4(10): 3061-3067.
43. Hommais, F., Laurent, C., Labas, V., Krin, E., Tendeng, C., Soutourina, O., Danchin, A., Bertin, B. Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. Proteomics. 2002; 2(5): 571-579.
44. Asakura, H., Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S., Makino, S. Proteomic Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Oxidation-Induced Viable but Non-Culturable State. Microbiol Immunol. 2013; 51(9): 875-881.

45. Debnath, A., Mizuno, T., Miyoshi, S. Comparative proteomic analysis to characterize temperature-induced viable but non-culturable and resuscitation states in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 2019; 165(7): 737-746.
46. Shen, L., Chen, Y., Yang, A., Chen, C., Liao, L., Li, S., Ying, M., Tian, J., Liu, Q., Ni, J. Redox Proteomic Profiling of Specifically Carbonylated Proteins in the Serum of Triple Transgenic Alzheimer`s Disease Mice. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(4): 469.
47. Sousa, O., Vieira, R., Patel, T., Hofer, E., Mesquita, V., Effects of chlorine on cells of *Vibrio cholerae*. *Food Microbiology*. 2001; 18: 355-359
48. Thampuran, N., Sreeranga, K., Surendran, P. Effect of Chlorine on the Survival of *Vibrio cholerae* on Shrimp. *Fisher Technology*. 2006; 43(2): 180-185
49. Beatty, M., Jack, T., Sivapalasingam, S., Yao, S., Paul, I., Bibb, B., Greene, D., Kubota, K., Mintz, E., Brooks, J. An Outbreak of *Vibrio cholerae* O1 Infections on Ebeye Island, Republic of the Marshall Islands, Associated with Use of an Adequately Chlorinated Water Source. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(1): 1-9.
50. Wennberg, A., Tryland, I., Ostensvik, O., Monshaugen, M., Liltved, H. Effect of water treatment on the growth potential of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Mar Environ Res*. 2013; 83: 2013.
51. 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 de doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 2018.
52. Feng, L., Zhang, K., Gao, M., Shi, C., Ge, C., Qu, D., Zhu, J., et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. *Microbiol Tech.* 2018; 28(8):1233-1246.
53. Ding, W., Jin, W., Cao, S., Zhou, X., Wang, C., Jiang, Q., Huang, H., Tu, R., Han, S., Wang, Q. Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Wat Res.* 2019; 160: 339-349.
54. Mecha. A., Onyango, M., Ochieng, A., Momba, M. Evaluation of synergy and bacterial regrowth in photocatalytic ozonation disinfection of municipal wastewater. *Sci Total Environ.* 2017; 601-602(1): 626-635.
55. Ersoy, Z., Barisci, S., Dinc, O. Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. *LWT – Food Science and Technology.* 2019; 100: 306-31.
56. Pérez, D. Evaluación de la desinfección con ozono en *V. cholerae* en su morfología bacilar, bacilar rugosa y cocoide mediante FESEM. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 2019.
57. Luna, A. Efecto del cloro en la ultraestructura de la bacteria *Vibrio cholerae* en su morfología bacilar, rugosa y cocoide mediante FESEM. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 2019.

58. Atengueño, K. Desinfección mediante cloro y ozono para inactivar *Vibrio cholerae* en su estado viable no cultivable, utilizando microscopía FESEM para evaluar los daños de la bacteria. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 2018.
59. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental, Agua Para Uso y Consumo Humano-Límites Permisibles de Calidad y Tratamientos a que se Debe Someterse el Agua Para su Potabilización. Diario Oficial de la Federación. 22 noviembre 2000. Disponible en: www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html
60. Godoy, P. P., Borrull, C., Palá, M., Bach, P., Nuín, C., Espinel, L., Torres, J., Mirada, G. Brote de Gastroenteritis por Agua Potable de Suministro Público. Gac Sanit 2003; 17(3): 204- 209.
61. Alvarado, V. Evaluación del Exopolisacárido Producido por una Bacteria Psicotolerante aislada del Noreste de México y sus Potenciales Aplicaciones Comerciales. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León. México. 2015.
62. Rahman, S., Ding, T., Oh, D, H. Effectiveness of low concentration electrolyzed water to inactivate foodborne pathogens under different environmental conditions. Int J Food Microbiol. 2010; 139: 17-153.
63. Cataldo, F. On the action of ozone on proteins. Polymer Degradation and Stability. 2003; 82(1): 105-114.
64. Fong, J., Karplus, K., Sachoolnik, G. K., Yildiz, F. H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of

- rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2006; 188(3): 1049-1059.
65. Hollenbeck, E., Fong, J., Lim, J., Estrella, F., Fuller, G., Cegelski, L. Molecular determinants of Mechanical Properties of *V. cholerae* biofilms at the air-liquid interface. Biophys J. 2014. 23(11): 2245-2252.
66. Duperthuy, M., Uhlin, B., Wai, S. Biofilm recruitment of *Vibrio cholerae* by matrix proteolysis. Trends in Microbiology. 2015; 23(11): 667-66.
67. Kaus, K., Biester, A., Chupp, E., Lu, J., Visudharomn, C., Olson, R. The 1.9 Å crystal structure of the extracellular matrix protein Bap1 from *Vibrio cholerae* provides insights into bacterial biofilm adhesion. Journal of Biological Chemistry. 2019; 294(4): 14499-14511.