



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
Ingeniería Ambiental – Agua

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  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
M. en Ing. Beatriz Casasola Rodríguez

TUTORES PRINCIPALES  
Dra. María Teresa Orta Ledesma de Velásquez, IINGEN, Ambiental  
Dr. Guillermo Ruiz Palacios y Santos, INCMNSZ, Infectología

COMITÉ TUTOR  
Dra. Gabriela Moeller Chávez, UPEMOR  
Dra. Sofía Esperanza Garrido Hoyos, IMTA,  
Dra. Clementina Rita Ramírez Cortina, UAM

Ciudad Universitaria, CD.MX. (Abril 2018)



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.



JURADO ASIGNADO:

**Presidente:** Dra. Sofía Esperanza Garrido Hoyos, IMTA,

**Secretario:** Dra. Clementina Rita Ramírez Cortina, UAM

**Vocal:** Dra. María Teresa Orta Ledesma de Velásquez, IINGEN, Ambiental

**1 er. Suplente:** Dr. Guillermo Ruiz Palacios y Santos, INCMNSZ, Infectología

**2 do. Suplente:** Dra. Gabriela Moeller Chávez, UPEMOR

**Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Instituto de Ingeniería UNAM, México D.F.**

TUTOR DE TESIS:

**NOMBRE**

Dra. María Teresa Orta Ledesma de Velásquez

-----  
FIRMA

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi mamá, quien siempre confió en mi y a quien le debo todo lo que soy.

También a mi papá quien es mi guía en todos los aspectos de mi vida y quien siempre me ha apoyado en todos los proyectos que me he planteado.

Está dedicado a todos mis amigos que son mi familia y quienes han sido parte de este proceso de crecimiento personal.

Sin todos ustedes esto nunca hubiera sido posible.

Gracias

## RESUMEN

Una gran cantidad de bacterias de interés ambiental al encontrarse en una situación de estrés tienen la capacidad de entrar en el estado Viable No Cultivable (VNC). Al estar fuera de sus condiciones ideales como en el ambiente acuático adquieren adaptaciones morfológicas que les ayudan a permanecer por largos periodos de forma viable y adquieren resistencia a la desinfección. El estado VNC es hoy en día un tema de interés debido a sus implicaciones en la calidad del agua ya que representan una amenaza a la salud humana. Las bacterias que se encuentran en este estado metabólico mantienen activa su capacidad infectiva pero no pueden ser detectadas por medios de cultivo tradicionales, esto genera falsos positivos en las pruebas de calidad del agua. En este proyecto se evaluó la resistencia a la desinfección con cloro y ozono de las bacterias en el estado VNC y se cuantificó dicha resistencia por medio de técnicas moleculares independientes de cultivo. Las técnicas moleculares desarrolladas fueron adaptadas para detectar la viabilidad de las bacterias de estudio. Las técnicas se basaron en la detección de ADN por medio de PCR tiempo real (qPCR) acoplado a un colorante de viabilidad fluorescente (PMA) para la detección y cuantificación de *Helicobacter pylori*, y para *Vibrio cholerae* basadas en ARN por medio de análisis transcriptómicos para la detección y cuantificación por medio de rt-qPCR.

---

## **ABSTRACT**

A large number of bacteria of environmental interest when in a stressful situation have the ability to enter the Viable Non-Cultivable (VNC) state. Being out of their ideal conditions as in the aquatic environment they acquire morphological adaptations that help them to stay for long periods in a viable form and acquire resistance to disinfection. The VNC status is today an issue of concern due to its implications for water quality as it poses a threat to human health. Bacteria that are in this metabolic state keep their infective capacity active but cannot be detected by traditional culture media; this generates false positives in the water quality tests. In this project, resistance to disinfection with chlorine and ozone of bacteria in the CNV state was evaluated and quantified using independent molecular culture techniques. The molecular techniques developed were adapted to detect the viability of study bacteria based on DNA detection by real-time PCR (qPCR) coupled to a fluorescent viability dye (PMA) for the detection and quantification of *Helicobacter pylori*, and the second based on RNA by means of transcriptomic analysis for the detection and quantification of *Vibrio cholerae* by means of rt-qPCR.

---

# **AGRADECIMIENTOS**

Agradezo a CONACYT por la beca para realizar mis estudios de doctorado

Agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado por medio del fondo "Problemas Nacionales" PDCPN2014-01 número 247605.

# ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 OBJETIVOS.....	16
3 ANTECEDENTES.....	17
3.1 Situación actual de enfermedades infecciosas intestinales.....	17
3.2 Organismos emergentes de transmisión hídrica y sus enfermedades relacionadas.....	19
3.3 Estado viable no cultivable.....	22
3.4 Cambios morfológicos.....	25
3.5 Formación de Biopelícula en el estado viable no cultivable.....	28
3.6 Métodos de detección y viabilidad de las bacterias.....	29
3.6.1 Detección de la viabilidad de bacterias VNC.....	31
3.6.2 Métodos moleculares para detección bacteriana.....	33
3.7 Métodos de desinfección.....	39
3.8 Cinética.....	43
3.8.1 Modelo de Chick-Watson (basado en el tiempo de contacto).....	44
3.8.2 Modelo de Watson (Basado en la concentración).....	45
3.8.3 Modelo de Hom.....	46
3.8.4 Valores CT.....	48
3.8.5 Resistencia a la desinfección entre organismos de origen natural y cultivos puros.....	51
3.8.6 Interacciones de los desinfectantes con las bacterias.....	52
3.9 Ozono.....	54
3.9.1 Ventajas y desventajas del uso de ozono.....	56
3.10 Cloro.....	57
3.10.1 Ventajas y desventajas del cloro.....	59
4 METODOLOGÍA.....	61
4.1 Etapa 1, Microbiología.....	62
4.1.1 <i>H. pylori</i> , Cultivo e inducción del estado VNC.....	62
4.1.2 <i>V. cholerae</i> , Cultivo e inducción del estado VNC.....	63
4.1.3 Cultivo de bacterias viables de <i>V. cholerae</i> .....	65
4.1.4 Inducción del estado viable no cultivable en agua de mar.....	65
4.1.5 Inducción del estado viable no cultivable por medio de C-di-GMP.....	66
4.2 ETAPA 2, Biología Molecular.....	66
4.2.1 Obtención del Transcriptoma de <i>V. cholerae</i> .....	66
4.2.2 Detección y cuantificación por rt-qPCR ( <i>V. cholerae</i> ).....	68
4.2.3 Detección y cuantificación por qPCR ( <i>H. pylori</i> ).....	70
4.2.4 Ensayo de viabilidad con PMA.....	71
4.2.5 Curvas estándar para qPCR.....	72
4.2.6 Ensayo de viabilidad con colorante LIVE/DEAD.....	75
4.3 ETAPA 3, Prueba en agua de pozo.....	76
4.4 ETAPA 4, Desinfección con cloro y ozono.....	79
4.4.1 Desinfección con Ozono.....	79
4.4.2 Desinfección con Cloro.....	82

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	83
5.1 Etapa 1, Microbiología <i>Helicobacter pylori</i> .....	84
5.1.1 Estandarización de cultivos viables e inducción del estado VNC de <i>H. pylori</i> .....	86
5.2 Etapa 1, Microbiología <i>Vibrio cholerae</i> .....	87
5.2.1 Estandarización de cultivos viables e inducción de <i>V. cholerae</i> VNC .....	90
5.3 Etapa 2, Biología molecular, Cuantificación qPCR-PMA .....	90
5.3.1 Etapa 2, Biología molecular, Cuantificación qPCR-PMA.....	93
5.4 Etapa 2, Obtención de Transcriptoma de <i>V.cholerae</i> .....	93
5.5 Etapa 3, Prueba en agua de pozo .....	103
5.5.1 Muestreo Huejutla Hidalgo .....	103
5.5.2 Muestreo pozo la Caldera.....	105
5.6 Etapa 4, Desinfección .....	106
5.6.1 Condiciones de desinfección con ozono .....	106
5.6.2 Condiciones de desinfección con cloro .....	109
5.6.3 Ensayo de desinfección con ozono y cloro de <i>H.pylori</i> .....	112
5.6.4 Ensayo de desinfección con ozono y cloro de <i>V.cholerae</i> .....	121
5.7 Etapa 4, Cinéticas de desinfección de cloro y ozono de <i>H. pylori</i> .....	127
5.7.1 Cinética de Ozono .....	127
5.7.2 Cinética de cloro.....	130
5.8 Etapa 4, Cinéticas de desinfección de cloro y ozono de <i>V.cholerae</i> .....	132
5.8.1 Cinética de Ozono .....	132
5.8.2 Cinética de cloro.....	134
6 RESUMEN DE RESULTADOS .....	136
7 CONCLUSIONES .....	139
8 REFERENCIAS .....	140

## LISTA DE TABLAS

- TABLA 3.1. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES DEFINIDAS EN EL BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DE LA SECRETARIA DE SALUD (SSA) 19
- TABLA 3.2. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES DEFINIDAS POR LA OMS<sup>A</sup> 21
- TABLA 3.3. ESPECIES BACTERIANAS REPORTADAS EN EL ESTADO VNC (PINTO ET AL., 2013) 24
- TABLA 3.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS NO BASADOS EN CULTIVO (RAMAMURTHY ET AL., 2014; RAMÍREZ-CASTILLO ET AL., 2015) 35
- TABLA 3.5. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL CLORO Y OZONO 42
- TABLA 3.6. VALORES DE CT REPORTADOS PARA DESINFECCIÓN CON OZONO 50
- TABLA 3.7. VALORES DE CT REPORTADOS PARA DESINFECCIÓN CON CLORO 50
- TABLA 3.8 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE OZONO COMO DESINFECTANTE DE AGUA 57
- TABLA 3.9 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE CLORO COMO DESINFECTANTE DE AGUA 60
- TABLA 4.1. COMPOSICIÓN DE AGUA DE MAR ARTIFICIAL (MOORE ET AL., 2007) 65
- TABLA 4.2 SECUENCIAS DE LOS PRIMERS Y SONDAS PARA DETECCIÓN DE *V. CHOLERA*E 69
- TABLA 4.3 SECUENCIAS DE LOS PRIMERS Y SONDAS PARA DETECCIÓN DE *H. PYLORI* 71
- TABLA 4.4. TABLA DE CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN FINAL DE DNA, PARA OBTENER UNA CURVA ESTÁNDAR DE 5 PUNTOS. 72
- TABLA 4.5. TABLA DE CÁLCULO DE  $\mu\text{L}$  DE DNA PARA PREPARAR LA CURVA ESTÁNDAR. 73
- TABLA 4.6. ENSAYO PARA OBTENER LA CURVA ESTÁNDAR DEL COLORANTE LIVE/DEAD 76
- TABLA 4.7. NÚMERO DE UFC/ML PRESENTES EN LAS DILUCIONES DE LA PRUEBA DE AGUA DE POZO 78
- TABLA 4.8. TABLA DE CÁLCULO DE  $\mu\text{L}$  DE DNA PARA PREPARAR LA CURVA ESTÁNDAR 82
- TABLA 5.1. UNIDADES BACTERIANAS INICIALES MEDIDAS POR MEDIO DE qPCR CON Y SIN COLORANTE PMA 93
- TABLA 5.2. LECTURAS OBTENIDAS, FILTRADAS (SIN RIBOSOMALES) Y PORCENTAJE FINAL DE LECTURAS USADAS 98
- TABLA 5.3. COMPARACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LA BACTERIA INDUCIDA POR MEDIO AGUA DE MAR ARTIFICIAL A 4°C Y EL EXPERIMENTO CONTROL (BACTERIA EN FASE EXPONENCIAL) 99
- TABLA 5.4. COMPARACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LA BACTERIA INDUCIDA POR MEDIO DEL INDUCTOR DE BIOPELÍCULA C-DI-GMP Y EL EXPERIMENTO CONTROL (BACTERIA EN FASE EXPONENCIAL) 99
- TABLA 5.5. GENES SOBRE-REGULADOS DE MAYOR IMPORTANCIA 100
- TABLA 5.6. PROMEDIO DE VALORES DE DEMANDAS DE OZONO 108
- TABLA 5.7. PROMEDIO DE VALORES DE DEMANDAS DE CLORO 111
- TABLA 5.8. RESULTADOS DE LA DESINFECCIÓN CON OZONO EN EL EXPERIMENTO DE AMPLIO RANGO 112
- TABLA 5.9 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL AGUA EMBOTELLADA 113
- TABLA 5.10. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON OZONO DE *H. PYLORI* EN SU FORMA VNC 114
- TABLA 5.11. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON OZONO DE *H. PYLORI* EN SU FORMA VIABLE CULTIVABLE 114
- TABLA 5.12. RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO 115
- TABLA 5.13. RESULTADOS DE LA DESINFECCIÓN CON CLORO DEL EXPERIMENTO EXPLORATORIO 117
- TABLA 5.14. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON CLORO DE *H. PYLORI* EN SU FORMA VNC 119
- TABLA 5.15. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON CLORO DE *H. PYLORI* EN SU FORMA VIABLE CULTIVABLE 119
- TABLA 5.16. RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO 120
- TABLA 5.17. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON OZONO DE *V. CHOLERA*E EN SU FORMA VNC 122
- TABLA 5.18. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON OZONO DE *V. CHOLERA*E EN SU FORMA VIABLE CULTIVABLE 122
- TABLA 5.19. RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO *VIBRIO CHOLERA*E 123
- TABLA 5.20. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON CLORO DE *V. CHOLERA*E EN SU FORMA VNC 125
- TABLA 5.21. ENSAYO DE DESINFECCIÓN CON CLORO DE *V. CHOLERA*E EN SU FORMA VIABLE CULTIVABLE 125
- TABLA 5.22. RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO 127
- TABLA 5.23. VALORES PARA EL CÁLCULO DE LA CINÉTICA DE CHICK-WATSON Y HOM (OZONO, *H. PYLORI*) 128

- TABLA 5.24. VALORES PARA EL CÁLCULO DE LA CINÉTICA DE CHICK-WATSON Y HOM (CLORO, H. PYLORI) 130
- TABLA 5.25. VALORES PARA EL CÁLCULO DE LA CINÉTICA DE CHICK-WATSON Y HOM (OZONO, V. CHOLERAЕ) 132
- TABLA 5.26. VALORES PARA EL CÁLCULO DE LA CINÉTICA DE CHICK-WATSON Y HOM (CLORO, V. CHOLERAЕ) 134

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1. RELACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES DIARREAS AGUDAS Y EL ACCESO A SERVICIOS DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO (CASASOLA 2017) 18
- FIGURA 3.2. ESQUEMA DE LA PARED Y MEMBRANA CELULAR EN BACTERIAS (LEHNINGER 2006) 27
- FIGURA 3.3. DIAGRAMA EXPERIMENTAL DE UN ENSAYO DE RNA-SEQ 39
- FIGURA 3.4. SUSCEPTIBILIDADES RELATIVAS A LOS AGENTES DESINFECTANTES, DE MENOR A MAYOR RESISTENCIA (HANDBOOK OF WATER AND WASTEWATER MICROBIOLOGY) 53
- FIGURA 3.5. EL AGOTAMIENTO DEL OZONO EN EL AGUA, DE ACUERDO A HOIGNÉ-STAEHELIN-BADER 55
- FIGURA 4.1 CULTIVO E INDUCCIÓN DE H.PYLORI 62
- FIGURA 4.2 CULTIVO E INDUCCIÓN DE V. CHOLERAЕ 64
- FIGURA 4.3 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE V. CHOLERAЕ 67
- FIGURA 4.4. CALCULADORA DE COPIAS GENÓMICAS DE THERMOFISHER 75
- FIGURA 4.5. HUEJUTLA HIDALGO, HUASTECA 77
- FIGURA 4.6. UBICACIÓN DEL POZO “LA CALDERA” 77
- FIGURA 4.4. DIAGRAMA DE GENERACIÓN DE OZONO 80
- FIGURA 4.8 DIAGRAMA DE FLUJO PARA MEDICIÓN DE OZONO RESIDUAL EN FASE LIQUIDA. 81
- FIGURA 5.1. IMÁGENES DE SIEMBRA EN PLACA DE H. PYLORI. 84
- FIGURA 5.2. CULTIVO DE V.CHOLERAЕ EN 3 MEDIOS: MACCONKEY, TCBS, SANGRE CARNERO 88
- FIGURA 5.3. IMAGEN DE LOS CULTIVOS DE LAS REPLICAS PARA LA OBTENCIÓN DE 3 MUESTRAS INDUCIDAS CON CARACTERÍSTICAS SIMILARES 94
- FIGURA 5.4. BACTERIAS VIABLES TEÑIDAS CON CTC 95
- FIGURA 5.5. BANDAS DE CORTES EN LAS LIBRERÍAS Y CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS 96
- FIGURA 5.6. REPORTE DE LA SECUENCIACIÓN DEL EQUIPO ION PROTON 97
- FIGURA 5.7. MEMBRANAS DE COLIFORMES USADAS EN EL MUESTREO 104
- FIGURA 5.8. NIÑOS DE LA POBLACIÓN DE HUEJUTLA E IMÁGENES DEL POZO DE AGUA POTABLE 104
- FIGURA 5.9. IMÁGENES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO “LA CALDERA” 105

## LISTA DE GRÁFICAS

- GRÁFICA 5.1 VIABILIDAD DE H.PYLORI Y MOMENTO ÓPTIMO PARA TRABAJAR CON EL ESTADO VNC 85
- GRÁFICA 5.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA H.PYLORI 86
- GRÁFICA 5.3 VIABILIDAD DE V.CHOLERAE EN LA INDUCCIÓN AL ESTADO VNC POR 3 MÉTODOS 89
- GRÁFICA 5.4 COMPARACIÓN ENTRE EL USO DEL COLORANTE DE VIABILIDAD PMA Y LOS RESULTADOS DE QPCR 92
- GRÁFICA 5.5 COMPARACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA PARA LA CONDICIÓN DE INDUCCIÓN EN AGUA DE MAR ARTIFICIAL Y 4°C. 100
- GRÁFICA 5.6 COMPARACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA PARA LA CONDICIÓN DE INDUCCIÓN EN AGUA DE MAR ARTIFICIAL A 4°C Y LA ADICIÓN DE C-DI-GMP 101
- GRÁFICA 5.7 COMPARACIÓN DE LOS PRIMERS DISEÑADOS COMO MARCADORES PARA DETECTAR EL ESTADO VNC DE V.CHOLERAE USANDO RT-QPCR 102
- GRÁFICA 5.8 COMPARACIÓN DE LOS PRIMERS DISEÑADOS COMO MARCADORES PARA DETECTAR EL ESTADO VNC DE V.CHOLERAE USANDO QPCR-PMA 102
- GRÁFICA 5.9 CONCENTRACIÓN DE OZONO RESIDUAL EN EL TIEMPO EN AGUA DESTILADA 107
- GRÁFICA 5.10 VALORES DE DEMANDAS INICIALES Y DECAIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OZONO RESIDUAL EN EL TIEMPO 108
- GRÁFICA 5.11 DECAIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORO LIBRE EN EL TIEMPO EN AGUA DESTILADA 110
- GRÁFICA 5.12 VALORES DE DEMANDAS INICIALES Y DECAIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORO LIBRE EN EL TIEMPO 111
- GRÁFICA 5.13 DESINFECCIÓN CON OZONO Y LA FORMA VIABLE CULTIVABLE EXP. EXPLORATORIO 113
- GRÁFICA 5.14 EFECTO DEL OZONO SOBRE AMBOS ESTADOS BACTERIANOS DE H.PYLORI EN AGUA EMBOTELLADA A 21°C Y PH 115
- GRÁFICA 5.16 . EFECTO DEL CLORO SOBRE AMBOS ESTADOS BACTERIANOS DE H.PYLORI EN AGUA EMBOTELLADA A 21°C Y PH 120
- GRÁFICA 5.17 . EFECTO DEL OZONO SOBRE AMBOS ESTADOS BACTERIANOS DE V. CHOLERAE EN AGUA EMBOTELLADA A 21°C Y PH 123
- GRÁFICA 5.18 126
- GRÁFICA 5.19 . EFECTO DEL CLORO SOBRE AMBOS ESTADOS BACTERIANOS DE V.CHOLERAE EN AGUA EMBOTELLADA A 21°C Y PH 126
- GRÁFICA 5.20 . RESULTADOS DEL LA CINÉTICA DE DESINFECCIÓN PARA OZONO 129
- GRÁFICA 5.21 . RESULTADOS DEL LA CINÉTICA DE DESINFECCIÓN PARA CLORO 131
- GRÁFICA 5.22 RESULTADOS DEL LA CINÉTICA DE DESINFECCIÓN PARA OZONO 133
- GRÁFICA 5.23 RESULTADOS DEL LA CINÉTICA DE DESINFECCIÓN PARA CLORO 135



# 1 Introducción

Las enfermedades transmitidas por el agua representan un tema de interés global que se estima causa más de 1.9 millones de muertes e innumerables casos de enfermedades cada año a nivel mundial (OMS, 2011). A pesar de la magnitud del problema es difícil monitorear los brotes epidémicos, y la información disponible tiende a ser una subestimación debido a la dificultad de para reportar todos los casos en los sistemas de vigilancia.

Mientras tanto, la situación es alarmante ya que la calidad del agua va empeorando y ésta sigue siendo una de las principales causas de enfermedades y muertes en los países en desarrollo como México. Las causas son diversas desde el incremento en la demanda de agua, el aumento de la resistencia de los agentes patógenos a la desinfección, el aumento de la densidad de población y el crecimiento de la actividad económica que resulta en la descarga de residuos agrícolas, industriales y humanos en el agua, así como la creciente incidencia de desastres naturales relacionados con la calidad del agua como inundaciones, tormentas tropicales y tsunamis, los cuales tienen una enorme repercusión los sistemas de abastecimiento de agua.

Los países que tengan problemas en la infraestructura de los sistemas de distribución del agua y no cuenten con procesos de desinfección adecuados enfrentarán una creciente incidencia de enfermedades, lo cual se traducirá directamente en pérdidas económicas, por lo que más allá de cubrir las necesidades básicas del ser humano, el abastecimiento de agua y los servicios de saneamiento, son factores determinantes para un desarrollo sostenible.

La Organización de la Naciones Unidas (ONU) definió en la Agenda 2030 el objetivo de desarrollo (ODG) N.º 6 dedicado a la gestión del agua y al saneamiento. El ODG 6 contiene ocho metas que cubren todo el ciclo del agua, incluida la gestión del agua potable, de las aguas residuales y los recursos ecosistémicos hídricos, entre otros. Las seis metas cuentan con once indicadores; el primer indicador trata sobre el acceso a una fuente de agua segura y servicios de alcantarillado. El acceso a dichos servicios es de suma importancia en la prevención de enfermedades de origen hídrico. En un análisis realizado por Orta

de Velázquez *et al.* (Orta de Velásquez *et al.*, 2014), se relacionaron los nuevos casos de enfermedades de origen hídrico con el acceso a fuentes de agua segura y alcantarillado. Los resultados muestran una relación directa entre la falta de estos servicios comparados con el número de nuevos casos de diarreas agudas, lo cual implica un serio problema de salud pública cuya tendencia no parece mostrar cambios significativos en su comportamiento.

Aunado a esto, se encuentra la creciente incidencia de nuevos patógenos emergentes asociados al agua, los cuales no sólo tienen la capacidad de crear nuevos brotes epidémicos si no que han adquirido resistencia al medio ambiente o a diversos antibióticos, por lo que el agua limpia y segura es un recurso cada vez más escaso. Dentro de la categoría de patógenos emergentes se encuentran *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori*. Estas bacterias fueron seleccionadas para trabajar en este estudio.

Las bacterias de tipo gastrointestinal se propagan desde el estómago hasta el intestino y luego dejan el cuerpo humano en las heces; si no se eliminan adecuadamente, las bacterias pueden entrar en el sistema de suministro de agua y las aguas superficiales. La evidencia que apoya la hipótesis de la transmisión a través del agua proviene principalmente de dos grupos de estudios: el primero, de estudios epidemiológicos que muestran una asociación entre la prevalencia de las bacterias y el contacto con fuentes relacionadas con el agua y el segundo, de estudios que detectaron o aislaron dichas bacterias de fuentes de agua.

Una gran cantidad de bacterias (patógenas y no patógenas) han incorporado mecanismos que les permiten una supervivencia prolongada en ambientes adversos, por ejemplo, el mantenimiento prolongado en ambientes acuáticos. Esta respuesta puede implicar cambios adaptativos en la morfología celular, como las conversiones a un estado viable pero no cultivable (VNC), una característica común más no exclusiva entre las bacterias bacilares Gram-negativas sometidas a condiciones de estrés. En este estado mantienen la actividad metabólica, respiración celular, capacidad infectiva, transcripción genética, síntesis de proteínas y producción de biomasa, pero no son capaces de replicarse en un medio de cultivo, por lo que impacta directamente en las pruebas de calidad de agua generando imprecisión en los métodos tradicionales de medición de

patógenos, ya que éstos por lo general están basados en el crecimiento en placa de cultivo, pudiendo dar lugar a falsos negativos y como consecuencia una subestimación de patógenos.

Las bacterias en el estado VNC forman parte de las biopelículas dentro de los sistemas de distribución de agua donde escapan a la detección por métodos de cultivo y representan un mayor riesgo para la salud de las personas, ya que estas biopelículas pueden servir como reservorios de población impactando directamente la calidad del agua de consumo sobre todo en ciudades con sistemas de distribución de agua complejos o en comunidades rurales con pozos como sistema de abastecimiento de agua potable. Se ha demostrado que diversas bacterias pueden sobrevivir en ambientes acuáticos hasta por 30 meses cuando se encuentran en biopelículas (Linke et al., 2010) o resistir a concentraciones de cloro residual comúnmente encontradas en los sistemas de distribución domésticos, como es el caso de *H. pylori* (Baker et al., 2002).

Para sobrevivir en las biopelículas ambientales, las bacterias cambian su morfología. En particular, la membrana externa produce algunas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que conforman la matriz de la biopelícula (polisacáridos, eDNA extracelular, lípidos y proteínas). Estas sustancias reaccionan de forma no selectiva con los desinfectantes, reduciendo así el desinfectante disponible antes de que se produzcan reacciones en la superficie celular.

Para detectar y trabajar con bacterias VNC se deben verificar dos atributos funcionales; su incapacidad para formar colonias en placas de agar y la viabilidad celular. Esto último se debe a que la capacidad de crecer en cultivo no puede equipararse a la viabilidad. Para determinar la viabilidad en bacterias, se dispone de algunos métodos basados en la actividad metabólica, el potencial de membrana, la actividad enzimática, la respiración celular y el contenido de ARN/ADN, entre otros. Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una herramienta útil para detectar y cuantificar bacterias en muestras de agua. Sin embargo, el ADN persiste intacto por un periodo después de que las bacterias mueren, debido a esta condición algunos colorantes basados en la integridad de la membrana como la Monoazida

de Propidio (PMA) en combinación con la técnica de qPCR son útiles para fines de viabilidad.

Con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua, así como combatir los problemas de calidad biológica, los sistemas deben someterse a tratamientos de potabilización incluyendo el uso de agentes químicos o procesos físicos que inactivan a los microorganismos que estén presentes en el agua, hasta la entrega al consumidor, siendo la cloración el método más frecuente de desinfección en países en desarrollo.

Para evaluar la resistencia a la desinfección de un microorganismo en particular, se debe medir individualmente y bajo condiciones ideales para obtener valores de CT (Concentración del desinfectante x tiempo de contacto) específicos. Éste es un parámetro útil para comparar la resistencia de diversos organismos a los agentes de desinfección más comunes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado valores de  $CT_{99.9}$  para lograr un 99.9% (3-log) de inactivación de las bacterias, virus y protozoos más comunes.

El hipoclorito se ha utilizado como desinfectante por más de 100 años y es letal para la mayoría de los microorganismos, este proceso tiene grandes desventajas por la recurrencia de subproductos de desinfección (SPD) los cuales pueden ser tóxicos o potenciales cancerígenos. A diferencia del contexto mundial, el uso de ozono en las plantas potabilizadoras municipales en países en vías de desarrollo no es tan común como el cloro o monocloramina por razones económicas, sin embargo, cada vez es mayor la necesidad de cumplir con la normatividad referente al control de la formación de SPD con lo cual el ozono y la luz UV representan una buena alternativa. Las ventajas del uso del ozono en el agua potable son su potencial de oxidación superior a otros desinfectantes y su rápida descomposición del ozono residual a oxígeno. Dependiendo de la calidad del agua, el ozono también puede formar SPD por lo que se debe de tomar en cuenta la calidad del agua, previa a un proceso de desinfección con ozono.

Se sabe que el cloro reacciona con diversos compuestos celulares debido a su capacidad oxidante causando daño a diferentes niveles celulares, incluyendo daño a la membrana, fragmentación de las proteínas, inhibición de la producción de ATP y daño a los ácidos nucleicos. Sin embargo, el uso de cloro tiene

limitaciones significativas cuando se trata de inactivar organismos complejos como algunos tipos de protozoarios.

El ozono es un oxidante fuerte y un poderoso desinfectante que se ha utilizado durante más de 100 años. La incorporación de ozono en las plantas de tratamiento de agua se planificó inicialmente para cumplir con la reglamentación de subproductos de desinfección. Muchos autores han demostrado que el ozono es un microbicida eficaz para las bacterias patógenas transmitidas a través del agua. El principal mecanismo de inactivación de la desinfección del ozono es la peroxidación lipídica de los ácidos grasos de la membrana externa de las bacterias.

Debido a lo anterior expuesto, es indispensable elaborar estrategias para el mejoramiento de la calidad del agua y la protección de la salud. Las estrategias a desarrollar para preservar la calidad del agua, deben estar basadas en objetivos de salud y la satisfacción de los consumidores; para ello es necesario dirigir metodologías en las que se evalúen y controlen los tratamientos en múltiples etapas de la distribución, la desinfección terminal como barrera de seguridad, la distribución y una buena gestión en el abastecimiento.

En este proyecto de investigación se trabajó con el cultivo e inducción de las bacterias al estado VNC y se monitoreó la viabilidad de las bacterias durante su cultivo e inducción al estado VNC. Se generaron metodologías moleculares independientes de cultivo para detectar y cuantificar las bacterias. También se obtuvieron valores de resistencia CT para cloro y ozono y se comparó la resistencia relativa del estado VNC de las bacterias.

## 2 objetivos

### Objetivo Principal

Establecer la resistencia de *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* a la desinfección por cloro y ozono en agua mediante el desarrollo y aplicación de técnicas moleculares en el estado viable cultivable y viable no cultivable.

### Objetivos Particulares

- Identificar el estado viable no cultivable de *v. cholerae* y *h. pylori* verificando su presencia en medio acuoso mediante colorantes fluorescentes
- Determinar una región activa única del estado viable no cultivable por medio del análisis transcriptómico (RNA-seq) para la detección y cuantificación de *V. cholerae* en medio acuoso
- Adaptar la técnica qPCR-PMA para la detección y cuantificación de *H.pylori* en medio acuoso
- Determinar experimentalmente las dosis y tiempos de contacto de ozono y cloro para inactivar (3-log) las bacterias *V. cholerae* y *H. pylori* presentes en medio acuoso
- Determinar la resistencia a la desinfección y estimar las constantes cinéticas de las formas viables y viables no cultivables de *V. cholerae* y *H. pylori* mediante un diseño factorial.

## 3 Antecedentes

### *3.1 Situación actual de enfermedades infecciosas intestinales*

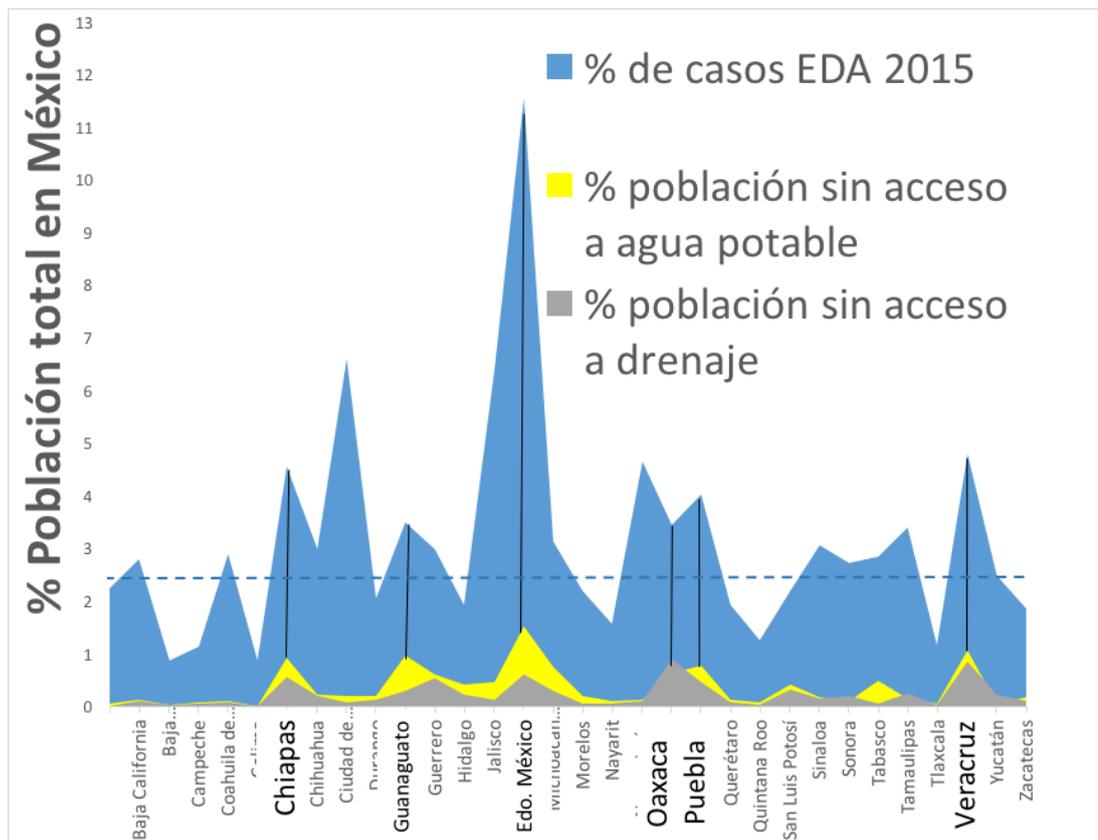
Las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20% de la demanda de consultas en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Alrededor de 5.5 millones de casos nuevos de diarreas se reportan anualmente. Desde la década del 2000 ya no se encuentra a las enfermedades diarreicas agudas (EDA) dentro de las 10 principales causas de muertes ya que han sido desplazadas por las enfermedades del corazón, diabetes mellitus, tumores y accidentes. Sin embargo, en 2015 se posicionó en segundo lugar dentro de las 20 principales causas de enfermedad. Los grupos de edad mayormente afectados son los que se encuentran en los extremos de la vida, principalmente, los menores de 1 año de edad con 585 defunciones y una tasa de mortalidad por EDA de 30.8 por cada 100 000 habitantes (DGIS, 2015).

De acuerdo a la encuesta intercensal del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2015 el 86% de la población total cuenta con agua entubada, sin embargo, estados como Oaxaca y Veracruz presentan rezagos y su cobertura es de únicamente del 75% de su población. El 81% de la población total cuenta con acceso a drenaje o fosa séptica y el 68% de los hogares cuenta con taza de baño funcionando con agua corriente.

En la **Figura 3.1** se observa a los estados de Chiapas, Guerrero, Estado de México, Distrito Federal, Oaxaca y Veracruz, con más casos de EDA relacionados directamente con la población sin fuentes seguras de agua potable y sistemas de saneamiento adecuados (Excluyendo al Distrito Federal). Esto refleja que la mayor incidencia de casos está relacionada con la falta de servicios de saneamiento así como accesos a fuentes de agua segura. La OMS ha informado que la mejora de la calidad del agua puede reducir la carga global de enfermedades en aproximadamente un 4%. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de realizar todos los esfuerzos posibles para alcanzar este objetivo.

En México la información epidemiológica de las enfermedades diarreicas es recabada por diversas fuentes tanto para los casos nuevos como para las defunciones. Existen dos sistemas que recaban la información; uno está basado en los casos notificados por las unidades médicas en todo el país (Sistema de Notificación Semanal) y el otro (Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones) que recaba información de las muertes. Además, ambos forman parte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).

En el boletín epidemiológico semanal se registran los casos nuevos reportados para 14 padecimientos, como Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo. En la **Tabla 3.1** se muestran las enfermedades de tipo gastrointestinal definidas en el boletín epidemiológico de la secretaria de salud (SSA).



**Figura 3.1.** Relación entre las enfermedades diarreicas agudas y el acceso a servicios de agua potable y alcantarillado (Casasola 2017)

**Tabla 3.1.** Enfermedades gastrointestinales definidas en el boletín epidemiológico de la secretaria de salud (SSA)

Enfermedades Gastrointestinales	
<p>Cólera Fiebre tifoidea Fiebre paratifoidea Salmonelosis Shigelosis Absceso hepático amebiano Ascariasis Infecciones intestinales por otros organismos</p>	<p>Intoxicación alimentaria bacteriana Amebiasis intestinal Infecciones debidas a protozoarios Giardiasis Otras Helmintiasis Enterobiasis</p>

### ***3.2 Organismos emergentes de transmisión hídrica y sus enfermedades relacionadas***

Desde la década de 1950 comenzó el estudio de los organismos emergentes y la comunidad médica ha estado desde entonces trabajando con las enfermedades que estos patógenos provocan. Hoy estos patógenos son un fuerte problema microbiológico debido a que los microorganismos han adquirido resistencias al medio ambiente y han adquirido resistencia a múltiples antibióticos lo que los vuelve más difíciles de erradicar. El agua es un medio de transporte para muchas bacterias, en especial las del tipo gastrointestinal. Este medio les confiere diversas resistencias que las convierte en un problema de salud.

Las enfermedades de transmisión hídrica representan una carga global que se estima causa más de 2.2 millones de muertes anuales, siendo los casos de diarrea y enfermedades gastrointestinales las más significativas. Se estima que estas enfermedades transmitidas por el agua tienen un costo económico asociado de 1 billón de dólares al año tan sólo en los Estados Unidos (OMS 2015).

Existen múltiples factores que producen la entrada de organismos a los sistemas de abastecimiento los cuales generan brotes epidémicos. Por ejemplo, el tipo de infraestructura de abastecimiento y los recubrimientos químicos de las tuberías así como la arquitectura de los sistemas puede potenciar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Roturas o fugas en las tuberías conducen a eventos de baja presión con lo cual los patógenos podrían entrar en el sistema. La inadecuada o nula filtración del agua superficial, o la desinfección incompleta o interrumpida de

las aguas subterráneas, son factores responsables de la entrada de patógenos a los sistemas de distribución de agua. Eventos climatológicos son otro factor clave que contribuye a los brotes, ya que introduce contaminantes en las fuentes de agua por la escorrentía procedente de abundantes lluvias o inundaciones. Los cambios de temperatura pueden alterar la dinámica de los microorganismos en tuberías donde los microorganismos planctónicos pueden quedar atrapados en las biopelículas y estos pueden ser liberados en el agua que fluye.

Diversos organismos infecciosos pueden causar enfermedades en los seres humanos. Actualmente, se estima que son 1,407 especies de patógenos que infectan a los seres humanos, que incluyen bacterias (538 especies), virus (208 tipos), protozoos parásitos (57 especies), y varios hongos y helmintos. Un depósito del agente infeccioso puede ser un ser vivo o un medio de soporte (agua, suelo) que le permite al patógeno sobrevivir y multiplicarse. El cuerpo humano es un ejemplo de un ser vivo que alberga numerosos agentes patógenos, en cambio el agua es un depósito no vivo de agentes infecciosos que tiene consecuencias graves en la salud de la población. En la **Tabla 3.2** se muestran los organismos y las enfermedades que causan los organismos patógenos de origen hídrico. También se muestra cuáles de estos patógenos son considerados como emergentes (Vouga and Greub, 2016).

El posible desarrollo de una enfermedad y el tiempo de incubación depende de factores tales como la dosis mínima infecciosa (DMI), la patogenicidad, la susceptibilidad del huésped y las características ambientales. Las bacterias entéricas tienen una DMI en el intervalo de  $10^7$  a  $10^8$  células, pero es mucho más baja con algunas especies, tales como *Shigella spp.*, ( $10^1$ - $10^2$ ), *Campylobacter spp.*, (alrededor de 500), *E. coli O157:H7* ( $10^6$ - $10^8$ ), y *V. cholera* ( $10^3$ ).

Los patógenos emergentes de transmisión hídrica han aparecido una y otra vez por numerosas razones, sin embargo el desarrollo de técnicas de detección más precisas e independientes de cultivo ha descubierto la presencia de estos organismos de los cuales no se tenía idea de su existencia (Ramírez-Castillo et al., 2015).

**Tabla 3.2.** Enfermedades gastrointestinales definidas por la OMS<sup>a</sup>

Organismo patógeno	Enfermedades de origen hídrico	Importancia a la salud <sup>c</sup>	Persistencia en fuentes de suministro de agua <sup>d</sup>
<i>*Campylobacter spp.</i> , <i>C. jejuni</i>	Diarrea, gastroenteritis	Alta	Moderada
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrea	Alta	Alta persistencia
<i>*Escherichia coli</i> <i>Enterohemorrágica (EHEC)</i> <i>Enteropatógena (EPEC)</i> <i>Enterotoxigena (ETEC)</i> <i>Enteroinvasiva (EIEC)</i>	Diarrea aguda, diarrea con sangre y gastroenteritis	Alta	Moderada
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis	Alta	Se multiplica
<i>*Legionella pneumophila</i>	Legionelosis	Alta	Se multiplica
<i>Non-tuberculous mycobacteria</i>	Enfermedad pulmonar	Baja	Se multiplica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones en pulmones, tracto urinario y riñón	Moderada	Se multiplica
<i>Salmonella enterica serotipo Typhi</i>	Fiebre tifoidea, Fiebre paratifoidea y otras salmonelosis serias	Alta	Moderada
<i>Shigella spp.</i>	Disentería bacilar o shigelosis	Alta	Corta
<i>*Vibrio cholerae</i>	Gastroenteritis, cólera	Alta	Corta y larga
<i>*Helicobacter pylori</i>	Gastritis crónica, úlceras y cáncer gástrico	Baja	Moderada

**\* Bacterias consideradas como organismos emergentes (Vouga and Greub, 2016)**

<sup>a</sup> Adaptado de tabla 7.1 en "WHO Guidelines for drinking water quality"; <sup>b</sup> Información obtenida de Cabral et al. [29], Straub and Chandler [25], and Nygård [30]; <sup>c</sup> La importancia para la salud se relaciona con la gravedad del impacto, incluyendo la asociación con brotes; <sup>d</sup> Período de detección de la fase infecciosa en agua a 20 ° C: corto, hasta 1 semana; Moderado, 1 semana a 1 mes; Largo, más de 1 mes. (Ramírez-Castillo et al., 2015)

### ***3.3 Estado viable no cultivable***

Las células viables pero no cultivables fueron reconocidas hace 30 años y desde su reconocimiento, una enorme controversia surgió con respecto a la importancia ecológica de este estado. Las preguntas de si ¿Es un proceso de degradación y sin importancia real para los ciclos de vida bacteriana? o si se trata de la estrategia de adaptación de las bacterias para hacer frente a condiciones de estrés, han sido las preguntas principales de este estado metabólico.

La capacidad de entrar en el estado VNC puede ser ventajosa para las bacterias, pero plantea un riesgo para la salud humana. Si las células VNC están presentes, el número total de bacterias viables en una muestra será subestimada por el método de recuento de Unidades Formadoras de Colonias debido a la inherente no culturabilidad de las células VNC. Aún peor, si todas las bacterias de la muestra están en estado VNC, la muestra puede considerarse libre de gérmenes debido a la no detección. Para las especies bacterianas que causan infecciones humanas, la subestimación o no detección de células viables en muestras control de calidad de la industria alimentaria y de los sistemas de distribución de agua, pueden representar serios riesgos para el público. Los riesgos surgen del hecho de que las bacterias patógenas pueden ser no virulentas en el estado VNC pero recuperar la virulencia después de la reanimación en células cultivables en condiciones adecuadas.

En un período de casi 10 años se estableció que las células VNC a pesar de no ser detectadas por medios de cultivo convencionales, son capaces de producir nueva biomasa y consumir nutrientes, mantener activo el metabolismo, la respiración celular, la integridad de membrana y la transcripción de genes con el ARN mensajero (mRNA). A lo largo de los años, el estado VNC comenzó a ser aceptado como una estrategia de supervivencia de las células expuestas a circunstancias ambientales adversas. Es importante señalar que el estado VNC no es un estado de esporulación, ya que las esporas son formas metabólicamente inertes. Las esporas son mucho más resistentes a condiciones ambientales adversas y también pueden ser revertidas mediante un proceso llamado germinación mientras que en el estado VNC este proceso se llama resucitación.

Otro estado con el cual se puede confundir el estado VNC es con el estado de latencia de las bacterias, en el cual exhiben casi las mismas propiedades, sin embargo, en el estado de latencia la actividad metabólica está por debajo de los límites de detección mientras que en el estado VNC las células tienen una amplia expresión de funciones metabólicas.

En general, las células VNC tienen una mayor resistencia física y química que las células cultivables, lo que podría deberse a su reducida tasa metabólica y a una pared celular reforzada por el aumento de la reticulación del peptidoglicano (Signoretto, 2008). En términos de estrés físico, las células VNC de *V. vulnificus* son más resistentes a la destrucción mecánica por sonicación, y las de *Mycobacterium smegmatis* son más resistentes a altas temperaturas. En términos de estrés químico, se observó una mayor tolerancia frente a baja salinidad y pH, etanol, cloro y antibióticos en células VNC de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter jejuni* y *Enterococcus faecalis*, respectivamente. Se ha demostrado que *V. vulnificus* en estado VNC tiene una mayor resistencia a una variedad de desafíos, incluyendo calor, pH bajo, etanol, antibióticos, metales pesados, estrés oxidativo y osmótico, que aquellos que crecen en fase exponencial (Li et al., 2014).

En 2016, se hizo una revisión del estado VNC en bacterias y se presentó una lista de 60 géneros y más de 100 especies que entran en dicho estado, algunas de éstas se encuentran en la **Tabla 3.3**.

Bacterias reportadas con estado VNC			
<p><b>Acetobacter</b> <i>A. aceti</i> (Millet &amp; Lonvaud-Funel, 2000)</p> <p><b>Acinetobacter</b> <i>A. calcoaceticus</i> (Lemke &amp; Leff, 2006)</p> <p><b>Aeromonas</b> <i>A. hydrophila</i> (Oliver, 2010)</p> <p><i>A. salmonicida</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Agrobacterium</b> <i>A. tumefaciens</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Alcaligenes</b> <i>A. eutrophus</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Arcobacter</b> <i>A. butzleri</i> (Fera et al., 2008)</p> <p><b>Bifidobacterium</b> <i>B. lactis</i> (Lahtinen et al., 2008) <i>B. longum</i> (Lahtinen et al., 2008) <i>B. animalis</i></p> <p><b>Burkholderia</b> <i>B. cepacia</i> (Oliver, 2005) <i>B. pseudomallei</i> (Oliver, 2005)</p>	<p><b>Campylobacter</b> <i>C. coli</i> (Oliver, 2005) <i>C. jejuni</i> (Oliver, 2005) <i>C. lari</i></p> <p><b>Citrobacter</b> <i>C. freundii</i> (Dhiaf et al., 2008)</p> <p><b>Cytophaga</b> <i>C. allerginae</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Enterobacter</b> <i>E. faecium</i> <i>E. aerogenes</i> (Oliver, 2005) <i>E. cloacae</i> (Oliver, 2005) <i>E. agglomerans</i> (Rowan, 2004) <i>E. faecalis</i> (Oliver, 2005) <i>E. hirae</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Enterococcus</b> <i>E. amylovora</i> (Oliver, 2010)</p> <p><b>Escherichia</b> <i>Erwinia</i> <i>E. coli</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Francisella</b> <i>F. tularensis</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Helicobacter</b> <i>H. pylori</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Klebsiella</b> <i>K. aerogenes</i> (Oliver, 2005) <i>K. pneumoniae</i> (Oliver, 2005) <i>K. planticola</i> (Oliver, 2005)</p>	<p><b>Lactobacillus</b> <i>L. plantarum</i> (Oliver, 2005)</p> <p><i>L. lindneri</i> (Suzuki et al., 2006) <i>L. paracollinoides</i> (Suzuki et al., 2006) <i>L. lactis</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Legionella</b> <i>L. pneumophila</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Listeria</b> <i>L. monocytogenes</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Oenococcus</b> <i>O. oeni</i> (Millet &amp; Lonvaud-Funel, 2000)</p> <p><b>Pasteurella</b> <i>P. piscicida</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Pseudomonas</b> <i>P. aeruginosa</i> (Oliver, 2005) <i>P. fluorescens</i> (Oliver, 2005) <i>P. syringae</i> (Oliver, 2005) <i>P. putida</i></p>	<p><b>Ralstonia</b> <i>R. solanacearum</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Rhizobium</b> <i>R. leguminosarum</i> (Oliver, 2005) <i>R. meliloti</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Rhodococcus</b> <i>R. rhodochrous</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Salmonella</b> <i>S. enteritidis</i> (Oliver, 2005) <i>S. enterica</i></p> <p><b>Serratia</b> <i>S. marcescens</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Shigella</b> <i>S. sonnei</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Sinorhizobium</b> <i>S. dysenteriae</i> (Oliver, 2005) <i>S. flexneri</i> <i>S. meliloti</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Vibrio</b> <i>V. alginolyticus</i> (Oliver, 2010) <i>V. campbellii</i> (Oliver, 2005) <i>V. cholerae</i> (Oliver, 2005) <i>V. harveyi</i> (Oliver, 2005) <i>V. mimicus</i> (Oliver, 2005) <i>V. parahaemolyticus</i> (Oliver, 2005) <i>V. proteolytica</i> <i>V. shiloi</i> (Oliver, 2005) <i>V. fischeri</i> (Oliver, 2005)</p> <p><b>Xanthomonas</b> <i>X. axonopodis</i> (Oliver, 2010) <i>X. campestris</i></p> <p><b>Yersinia</b> <i>Y. pestis</i> (Pawlowski et al., 2011)</p>

Tabla 3.3. Especies bacterianas reportadas en el estado VNC (Pinto et al., 2013)

Las dos propiedades clave de las células VNC son la viabilidad y la no culturabilidad, por lo que la presencia y abundancia de células VNC puede determinarse comparando el número de células viables con el de células cultivables en la muestra. Como regla general, si el número de células cultivables cae a un nivel indetectable mientras que el número de células viables permanece alto, entonces la población de la muestra se ha convertido en células VNC. Por lo tanto, la primera etapa importante para la detección de células VNC es la estimación de las células cultivables restantes en la muestra mediante una técnica convencional de recuento en placa. Para este paso, es importante usar un medio rico sin ningún estrés adicional, ya que algunas células pueden haberse lesionado durante la exposición a diferentes estados de estrés para la inducción del estado VNC y pueden ser incapaces de crecer en medios selectivos o diferenciales con antibióticos. Estas células dañadas tienen una mayor sensibilidad a los componentes del medio de crecimiento que no son normalmente inhibitorias, pero no se consideran como células VNC, ya que son cultivables en medios no selectivos (Pinto et al., 2013).

El segundo paso importante para la detección de células VNC es la estimación de células viables. Un método común implica el uso de un procedimiento de tinción diferencial y una enumeración microscópica directa. En el capítulo 3.7 se estudian a fondo estos métodos de detección.

### ***3.4 Cambios morfológicos***

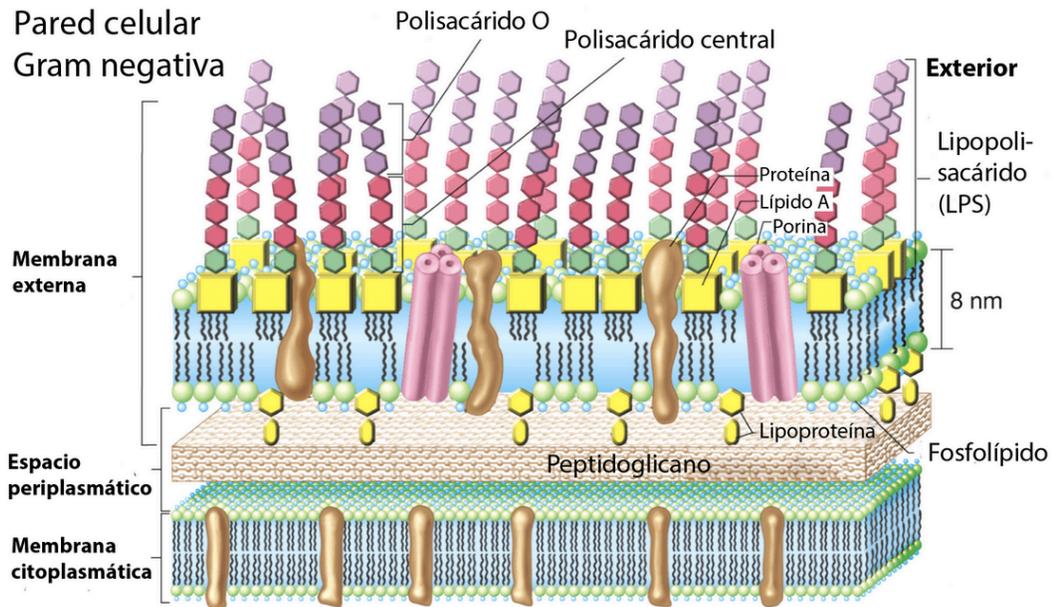
Uno de los cambios más representativos del estado VNC es el que sufren las células VNC en relación a la forma y composición de la pared celular, la composición de membrana y la expresión génica. Los cambios morfológicos en las bacterias expuestas a condiciones estresantes ya fueron ampliamente reportados en *Campylobacter* spp, *Salmonella bovis* moribund y *V. cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Se sugirió que estas alteraciones morfológicas podrían funcionar como un mecanismo de las células bacterianas para afrontar condiciones ambientales estresantes. En estas situaciones desfavorables, la disminución del tamaño permitiría que las células tuvieran la superficie más grande para la absorción de nutrientes mientras se mantiene la

menor cantidad de masa celular. En la **Figura 3.2** se observa una imagen de la pared celular (exclusiva de bacterias) con el fin de mostrar los componentes de la pared celular y entender los cambios morfológicos.

El cambio morfológico más notable es la reducción de tamaño; existen dos mecanismos por los cuales se se explica la reducción del tamaño celular durante la inanición. El primero responde a que las bacterias no cambian de tamaño antes de llevar a cabo la división celular. El segundo mecanismo implica que las células no se dividen y en cambio solo modifican su tamaño y por lo tanto pasan de formas bacilares alargadas a formas cocoides más pequeñas. También se reporta la formación de vesículas para la reducción del tamaño.

Se han reportado otros cambios en la membrana celular, el más notable es el encogimiento de la membrana citoplasmática. La formación de polisacáridos extracelulares también se ha reportado y estos están estrechamente ligados con la formación de biopelícula. Los cambios en la composición química del peptidoglicano en la pared celular evaluada por el grado de oligomerización de los muropeptidos es una prueba que se puede utilizar para evaluar los cambios en la pared celular (**Signoretto and Canepari, 2008**).

Se han observado cambios estructurales de los péptidos en la pared celular relativamente grandes y un aumento en el porcentaje de ácidos grasos de cadena corta y larga seguida de una reducción en el contenido de lípidos de la membrana en células VNC de *Vibrio vulnificus*. Estos resultados muestran que los cambios en los ácidos grasos juegan un papel importante en la protección de la fluidez de la membrana celular durante el estrés ambiental. En términos de proteínas, se observó una obvia reducción en la proteína de membrana (6,3 kDa) en el estado VNC de *Staphylococcus aureus*. Además, después de entrar en el estado VNC, la estructura de los péptidos en la pared celular mostró cambios relativamente grandes (**Pinto et al., 2013**).



**Figura 3.2.** Esquema de la pared y membrana celular en bacterias (Lehninger 2006)

Se ha descrito una extensa lista de condiciones ambientales desfavorables para inducir el estado VNC en bacterias, por ejemplo, la inanición es una condición de inducción, también las temperaturas fuera de aquellas que son permisivas para el crecimiento de células, la luz solar, baja disponibilidad de oxígeno, una alta concentración de sales y el pH no óptimo. No existe un estudio comparativo sobre el efecto de diversas condiciones de inducción para el estado VNC en todas las bacterias. Tal estudio podría ser útil para determinar qué condiciones conducen a inducciones del estado VNC más rápido en bacterias de importancia ambiental y por consiguiente tratar de evitarlas.

Para explorar los factores de inducción físicos, muchos estudios se han llevado a cabo con experimentos de inducción con los principales agentes patógenos transmitidos por el agua; tales como *E. coli* O157, *C. jejuni*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Además del factor de baja temperatura, se han detectado células que entran en el estado VNC durante procesos de esterilización a alta temperatura tales como la pasteurización de la leche. Organismos como *C. jejuni* y *V. vulnificus* han sido confirmados en entrar en el estado VNC bajo estrés oxidativo y *L. monocytogenes* y *B. cereus* pueden entrar en el estado VNC por tratamiento con un campo eléctrico pulsante. Las células de *E. coli* O157: H7 se

indujeron a un estado VNC por desinfección UV aunque dicho trabajo ha sido muy cuestionado (Zhang et al., 2015). Todos estos hallazgos apoyan la idea de que varios tipos de factores de estrés físico como la desinfección en las plantas de tratamiento, pueden generar un cierto grado de resistencia en los patógenos por un uso indiscriminado de la desinfección con cloro. Por lo tanto, es importante prestar atención a la utilización racional de los desinfectantes durante el proceso de desinfección del agua (Zhao et al., 2017). Diversos factores pueden inducir el estado VNC, sin embargo esto dependerá de cada organismo.

### ***3.5 Formación de Biopelícula en el estado viable no cultivable***

La colonización de superficies asociadas a la formación de biopelículas ocurre en todo tipo de ambientes naturales y artificiales, y en una gama de diferentes superficies. Los microorganismos, suelen formar biopelículas como un mecanismo para soportar condiciones adversas.

La adherencia en superficie por lo general se produce por medio de un polisacárido extracelular secretado por las células. Esta sustancia (el glicocalix, o limo) es una matriz de polisacárido polianiónico hidratado producida por polimerasas adheridas al componente lipopolisacárido de la pared celular. En cualquier etapa del desarrollo de una biopelícula, partes de la biopelícula se pueden desprender por los esfuerzos cortantes del movimiento del agua. Esta actividad puede resuspender los microorganismos de la biopelícula dentro del sistema público del agua, lo que les permite colonizar otras partes del sistema de abastecimiento si las condiciones son apropiadas. Las biopelículas son ecosistemas microbianos heterogéneos muy complejos y pueden consistir de bacterias, algas y protozoarios.

Las complejas comunidades de microorganismos que se encuentran en las biopelículas juegan un papel importante en las reacciones catalizadas por microorganismos en entornos naturales, particularmente en la degradación de moléculas orgánicas y en la nitrificación y otros procesos de transformación de minerales.

Las bacterias en la naturaleza existen en dos modos distintos, el sésil (adherido a un sustrato) y los estados planctónicos. Diferentes especies han desarrollado

diversas estrategias para asegurar que toman la mejor ventaja de cualquiera de los dos modos, dependiendo de las circunstancias ambientales en cualquier momento. Las moléculas orgánicas adsorbidas, denominadas películas acondicionadoras, alteran las propiedades físicas de la superficie y por lo tanto, la adhesión de las bacterias. Además, estas moléculas de biopelículas de acondicionamiento sirven como un sustrato energético concentrado y estimulan el metabolismo activo, el crecimiento celular y la reproducción celular de bacterias adheridas a la superficie. La posterior colonización de las superficies y la rápida reproducción de las diversas especies de bacterias unidas, combinadas con una extensa producción de polímeros extracelulares heterogéneos por parte de los organismos, conducen al rápido desarrollo de las biopelículas.

Las sustancias microbianas exopoliméricas (EPS) incluyen una amplia diversidad de moléculas liberadas por los microorganismos tanto en su entorno natural como en condiciones de laboratorio. Aunque inicialmente se utilizó el término EPS para describir los polisacáridos extracelulares, estudios recientes han revelado que estas matrices son más complejas, incluyendo lipopolisacáridos, glicolípidos, lípidos, proteínas o péptidos y ácidos nucleicos. La composición química de los EPS depende de la genética de las células microbianas y del entorno físico-químico en el que se desarrolla la matriz de la biopelícula.

Algunas bacterias crecidas en las biopelículas son más resistentes a tratamientos de desinfección que las mismas especies bacterianas en la fase acuosa de los sistemas de distribución de agua. Lo que hace a los agentes biocidas menos eficaces y permite la proliferación de patógenos potenciales. La presencia de corrosión en un sistema aumentará el área de superficie disponible y permitirá la formación de micro-nichos que están protegidos a la acción de desinfectantes circulantes. Por otra parte, la presencia de biopelículas y protozoos tiene un efecto protector doble para las bacterias en el sistema, debido a que aumenta la carga de materia orgánica e inactiva los niveles residuales de desinfectante como el cloro.

### ***3.6 Métodos de detección y viabilidad de las bacterias***

En los últimos años, se han producido numerosos avances en los métodos de detección y caracterización de patógenos en el agua. Los métodos de detección

desempeñan un papel importante en el monitoreo de la calidad del agua, la vigilancia y la evaluación cuantitativa del riesgo microbiano; por lo tanto, tienen una gran influencia en la implementación de las mejores prácticas para mitigar y prevenir amenazas que permitan alcanzar el objetivo de la seguridad del agua.

Tanto para el uso de cultivos como en los métodos moleculares, se han seleccionado patógenos indicadores para el control de la calidad del agua con el fin de indicar la presencia de una gran cantidad de patógenos en el agua. Un ejemplo es *E. coli* que ha sido ampliamente utilizada debido al hecho de que los métodos de detección de estos patógenos son relativamente fáciles y baratos; sin embargo, pueden tener la desventaja de no proporcionar información sobre el origen del huésped, la viabilidad de los organismos y la mayor parte de las veces no se correlacionan con otros patógenos presentes en el agua, tales como los virus y protozoos. Por lo tanto, el agua caracterizada como libre de patógenos mediante el control de *E. coli*, puede estar contaminada con virus o protozoos.

Actualmente, no hay un método unificado para abarcar la recopilación y el análisis de una muestra de agua para todos los microorganismos patógenos de interés. Los desafíos de los métodos de detección son las diferencias físicas entre los principales grupos de patógenos, la baja concentración de patógenos en un gran volumen de agua que normalmente requiere enriquecimiento y la concentración de las muestras antes del procesamiento de detección o la presencia de inhibidores en la muestra que procede de aguas contaminadas.

Los requisitos más importantes para un análisis fiable incluyen: especificidad, sensibilidad, reproducibilidad de los resultados, velocidad, automatización y bajo costo. A pesar de que los métodos dependientes de cultivo se utilizan ampliamente para la detección de patógenos en el agua, estos métodos están limitados por su baja sensibilidad y el excesivo tiempo necesario para obtener resultados fiables. Además, como existe una amplia distribución ambiental de patógenos humanos que existen en un estado viable pero no cultivable como es el caso de *E. coli*, *Helicobacter pylori* y *V. cholerae*, los resultados falsos negativos pueden surgir de métodos dependientes de cultivo (Ramírez-Castillo et al., 2015)

### *3.6.1 Detección de la viabilidad de bacterias VNC*

La determinación de la viabilidad en muestras microbianas es uno de los análisis rutinarios más realizados en laboratorios de microbiología en todo el mundo. El método más usado implica el crecimiento de colonias en una superficie de agar nutriente durante un período de incubación. La determinación de la viabilidad usando este método puede ser cualitativa; ¿Se forman colonias? o cuantitativa ¿Cuál es la concentración de células viables en la muestra?. El método de recuento en placa se basa en la premisa de que una sola bacteria puede crecer y dividirse para dar una colonia entera, y esta amplificación proporciona un alto nivel de sensibilidad con la capacidad de detectar bacterias viables a densidades muy bajas. Sin embargo, a pesar de su uso generalizado, no puede considerarse un enfoque universal, ya que el 95% de todas las especies cultivadas y publicadas pertenecen a sólo 5 de los 53 filos existentes. Además, se ha reconocido desde hace tiempo que las células microbianas pueden existir en estados, latentes o estados intermedios de vida en los que no formarán colonias en los medios nutritivos, pero pueden tener otras actividades medibles (y por lo tanto pueden tener un papel importante en el desarrollo de enfermedades). En el caso de las muestras adquiridas ambientalmente, se ha estimado que el 1% (o menos) de los microorganismos observables son marcados como viables por el método de conteo en placas. Sin embargo, en la industria, la detección y cuantificación de células viables de especies bien caracterizadas son importantes para el control de la calidad, mientras que en muestras ambientales, a pesar de las limitaciones, la enumeración de bacterias viables proporciona información sobre la calidad del suelo y del agua, la contaminación ambiental y la biorremediación (Lu et al., 2015).

En la actualidad, el método utilizado para detectar células VNC se basa principalmente en dos características clave de las células VNC, la viabilidad y la no culturabilidad. Generalmente, si las bacterias pierden la culturabilidad pero siguen siendo viables, se puede considerar que han entrado en el estado VNC. Por lo tanto, el uso de la técnica convencional de conteo de placas para confirmar que las células están en un estado no cultivable es el primer paso usado para detectar células VNC, seguido por la estimación de células viables usando otros métodos.

La viabilidad se puede definir como la capacidad de las células de mantener homeostasis y actividad metabólica aun cuando éstas no se dividen por un periodo

de tiempo corto o bajo condiciones específicas. Existen varios métodos para detectar la viabilidad y la mayoría de estos logran detectar múltiples actividades fisiológicas como: captación de glucosa (2-NBDG), contenido de ATP (bioluminiscencia), actividad respiratoria (CTC), polarización de membrana, permeabilidad de membrana (tinción de PMA, qPCR-PMA) y expresión de ARN (rt-qPCR). La citometría de flujo, la espectrometría de masas (MALDI-ToF) y la qPCR son las técnicas más utilizadas para detectar diferentes estados metabólicos (Bottari et al., 2006; de Velásquez and Noguez, 2017; Kuehl et al., 2011; Morishige et al., 2015).

También se ha propuesto la detección de ARM mensajeros (mARN) bacterianos como marcadores para la viabilidad celular porque son moléculas muy inestables con semividas muy cortas dentro de la célula. Por lo tanto, se podría esperar que mientras las bacterias VNC estén vivas, deberían producir algunas moléculas de mARN. Esta fue la técnica que se utilizó en este proyecto en combinación con la PCR de transcripción inversa en tiempo real rt-qPCR.

El PCR de transcripción inversa se utiliza comúnmente en muchas especies bacterianas para determinar la viabilidad de las células en combinación con la monoazida de propidio (PMA) o la monoazida de etidio (EMA), los cuales son colorantes del ADN de alta afinidad que sólo puede entrar en células con membranas dañadas consideradas ("muertas") y unirse covalentemente al ADN celular mediante fotocátalisis con luz visible. Las membranas de células 'vivas' suponen una barrera para esta molécula. El tratamiento con PMA es seguido por la extracción de ADN genómico y su análisis por qPCR. Se ha demostrado que la unión cruzada covalente de PMA con el ADN da lugar a una fuerte inhibición de la amplificación por PCR del ADN modificado. El resultado del tratamiento es que sólo el ADN no modificado de células intactas que contienen ADN que no está reticulado a PMA puede amplificarse, mientras que la amplificación por PCR del ADN modificado de células comprometidas con membrana se suprime eficazmente.

También se han desarrollado nuevos métodos de detección para separar células basándose en sus estados fisiológicos. Las técnicas de fluorescencia combinadas con métodos de detección óptica directa son muy utilizados. Entre estas técnicas, se ha demostrado que la citometría de flujo (CF) es una poderosa herramienta para

analizar rápidamente las poblaciones célula por célula y puede aplicarse en muchas áreas. El principio por el cual funciona se basa en que las partículas en suspensión son bombeadas en una corriente de flujo estrecha intersectada por uno o más rayos láser. Las partículas individuales, tales como células microbianas, se iluminan individualmente con la dispersión de luz resultante y la emisión de fluorescencia detectada a longitudes de onda apropiadas. Recientemente, (Mathur, 2016) analizaron el avance de la CF y la introducción de nuevos fluorocromos que permiten estudiar la viabilidad de las células, la estructura de la membrana y su integridad, y el potencial de membrana en un nivel de célula única. El uso de sondas y colorantes personalizados para la detección de cambios en objetivos específicos y actividades intracelulares permite el uso dirigido de CF para determinar las características estructurales y funcionales de una población de células VNC (Zhao et al., 2017).

### *3.6.2 Métodos moleculares para detección bacteriana*

Los métodos moleculares pueden ser muy específicos para detectar determinadas especies y proporcionar más información filogenética sobre patógenos. Estos métodos permiten el uso de indicadores alternativos que se relacionan fácilmente con la fuente del organismo patógeno. Esto permite la discriminación entre los patógenos humanos y animales, y el seguimiento de la fuente de contaminación. Los métodos moleculares parecen ser más adecuados para las evaluaciones del riesgo para la salud debido a su especificidad.

Hoy en día, hay una serie de diferentes métodos moleculares para detectar diversos patógenos que se utilizan para evaluar la calidad microbiológica del agua, la eficacia de la eliminación de patógenos en las plantas de tratamiento de agua potable y de aguas residuales, y como herramientas de seguimiento de fuentes microbianas. En la (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) se enumeran varios ejemplos de métodos de detección y sus límites de detección. Las técnicas moleculares, tales como la PCR, ofrecen herramientas sensibles y analíticas para detectar una variedad de patógenos, incluyendo nuevas cepas emergentes y presentan la posibilidad de automatización.

Los desafíos de las técnicas moleculares incluyen: la necesidad de métodos de concentración de agua (por ejemplo, para virus, ultrafiltración y protocolos de

floculación directa como métodos de concentración). Las técnicas de purificación reproducibles por ADN o ARN a partir de muestras heterogéneas. Además, la validación de los resultados es muy importante ya que la alta sensibilidad en las técnicas moleculares introduce un alto riesgo de resultados falsos positivos.

Método de detección	Patógeno	Límite de detección	Matriz	Fuente
PCR	<i>E. coli</i>	1 UFC /100 mL	Agua de consumo contaminada	Tsem et al.,1998
	<i>Enterotoxigenic E. coli (ETEC)</i> <i>Cryptosporidium and Giardia</i>	4 UFC/mL 1 a 10 oquistes y 5–50 quistes	Muestras de agua inoculadas con bact Muestras de agua ambientales	Ram et al., 2006 Rochelleet et al., 1997
Multiplex PCR	<i>E. coli</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>P. aeruginosa y Salmonella sp.</i> <i>L. monocytogenes, V. cholerae</i>	10 <sup>1</sup> UFC a 10 <sup>2</sup> UFC,	Agua contaminada y agua superficial	Fan et al., 2008
PCR cuantitativa (qPCR)	<i>V. parahaemolyticus,</i> <i>S. typhimurium, S. flexneri,</i> <i>C. perfringens y E. coli</i>	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>4</sup> IFC 200 mg de muestra fecal ó 100 células/L	Agua residual, agua superficial y biopelículas artificiales	lishi et al., 2014 lishi et al., 2014 b Fykse et al., 2012 Masago et al., 2006
	<i>H.pylori</i> <i>V.cholerae</i> <i>C. hominis, C. parvum, C. meleagridis, C. wrairi</i> <i>L. monocytogenes en biopelículas</i>	1 UFC/100 mL 1 quiste 6x10 <sup>2</sup> UFC/Cm <sup>2</sup>		Guy et al 2003 Le cann et al., 2004 Guilbaud et al., 2000
Chip de ADN (microarreglos)	<i>Bacillus anthracis, Brucella abortus, C. botulinum, Coxiella burnetii,</i> <i>Francisella tularensi, Rickettsia prowazekii, C. perfringens, S. aureus,</i> <i>V. cholerae, V. alginolyticus, Yersinia pestis</i>  <i>Alexandrium cantenella, Fusarium sporotrichioides</i>	10 a 500 fg de ADN	Agua de muestras ambientales y agua de mar	Wilson et al., 2002 Maynard et al., 2005 lee et al., 2010 Brinkman et al, 2013 Amoako 2012
Biosensores	<i>Y. pestis</i> <i>B. anthracis</i> <i>Comamonadaceae, Proteobacteria, Bacteroidetes,</i> <i>Planctomycetes y Elusimicrobia</i> <i>C. parvum</i> <i>E. coli 0157:H7</i> <i>V. cholerae</i>	1 a 1.3 x10 <sup>5</sup> células  10 <sup>5</sup> quistes /mL 40 células/mL 8 UFC/mL 30 ng/ 7x10 <sup>5</sup> celulas/mL	Agua potable, agua subterraena, agua superficial y cultivos en suspensión	Kramer et al., 2007 Min et al., 2002 Ra et al., 2006 Lang et al., 2009 Strepparava el at., 2012

**Tabla 3.4.** Métodos de detección de patógenos no basados en cultivo (Ramamurthy et al., 2014; Ramírez-Castillo et al., 2015)

(Amoako et al., 2013; 2012; Brinkman et al., 2013; Fan et al., 2008; Fykse et al., 2012; Guilbaud et al., 2005; Guy et al., 2003; Hoshino et al., 2008; Ishii et al., 2014a; 2014b; Jothikumar et al., 2005; Kramer et al., 2007; Lautenschlager et al., 2013; Le Cann et al., 2004; Lee et al., 2008; 2010; Long et al., 2008; 2009; Masago et al., 2006; Maynard et al., 2005; Min and Baeumner, 2002; S. Park et al., 2010; Y. Park et al., 2008; Ram et al., 2008; RAO et al., 2006; Rochelle et al., 1997; Strepparava et al., 2012; Tsen et al., 1998; Wilson et al., 2002)

### 3.6.2.1 *Detección por RNA-seq*

La identificación de la transcripción y la cuantificación de la expresión génica han sido actividades básicas en la biología molecular desde el descubrimiento de la función del ARN como el principal intermediario entre el genoma y el proteoma. El poder de la secuenciación de ARN radica en el hecho de que esta técnica se puede llevar a cabo para el descubrimiento y la cuantificación, los cuales pueden combinarse en un único ensayo de secuenciación de alto rendimiento llamado RNA-secuenciación (RNA-seq). La adopción generalizada de ARN-seq se ha extendido mucho más allá de la comunidad genómica y se ha convertido en una técnica estándar del conjunto de herramientas utilizado en diversas disciplinas.

La técnica de RNA-Seq se utiliza para analizar la continuamente cambiante expresión celular. Específicamente, RNA-Seq facilita la capacidad de observar transcripciones genéticas de genes alternativos, modificaciones post-transcripcionales, fusión de genes, mutaciones y cambios en la expresión génica en el tiempo, o diferencias en la expresión génica en diferentes grupos o tratamientos.

Antes de RNA-Seq, la expresión génica se estudiaba mediante hibridación basada en microarreglos. Los problemas con los microarreglos incluyen artefactos de hibridación cruzada, mala cuantificación de los genes con baja expresión y altamente expresados, y la necesidad de conocer la secuencia a priori.

Un prerrequisito crucial para un exitoso estudio ARN-seq es que los datos generados tienen el potencial de responder a las preguntas biológicas de interés. Esto se logra definiendo primero un buen diseño experimental, es decir, eligiendo el tipo de biblioteca, la profundidad de secuenciación y el número de réplicas apropiadas para el sistema biológico estudiado, y el segundo planificando una adecuada ejecución del experimento de secuenciación, asegurando que los datos de adquisición no se contaminan con sesgos innecesarios.

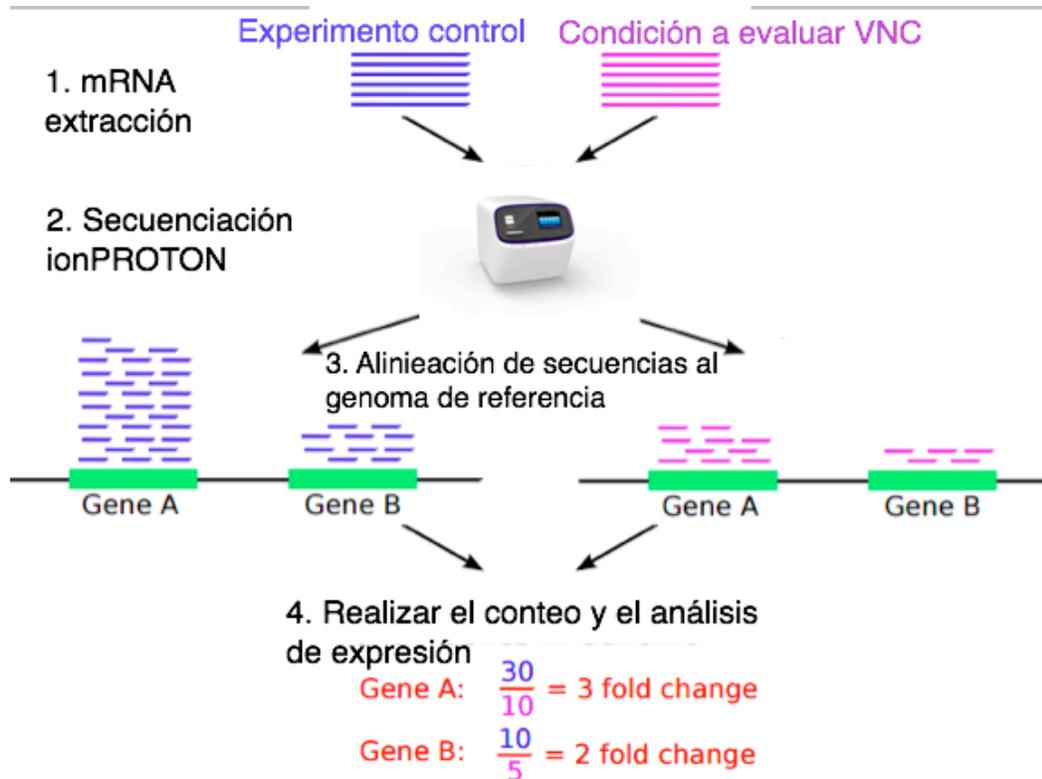
Un aspecto importante del diseño experimental es el protocolo para la extracción de ARN utilizado para eliminar el altamente abundante ARN ribosomal (ARNr), que normalmente es más del 90% del ARN total en la célula, dejando sólo alrededor del 10% que comprende el ARN mensajero (mRNA) el cual es el que se utiliza.

Otro factor importante es la profundidad de la secuenciación o el tamaño de la librería, que es el número de lecturas secuenciadas para una muestra dada. Se registrarán más transcripciones y su cuantificación será más precisa a medida que la muestra se va a un nivel más profundo. Sin embargo, la profundidad depende de los objetivos del experimento (Conesa et al., 2016).

Por último, un factor crucial del diseño es el número de réplicas, que es el número de repeticiones que deben incluirse en un experimento RNA-seq. Este número dependerá e tanto de la cantidad de variabilidad técnica en los procedimientos RNA-seq como de la potencia estadística deseada (es decir, la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas en los genes entre grupos experimentales) (Haas et al., 2012).

El análisis bio-informático realizado en este proyecto fue el análisis de expresión diferencial, el cual requiere que los valores de expresión génica se comparen entre las muestras. Estos enfoques se basan en la normalización de los datos para lo cual existen métodos basados en conteos totales o efectivos, y tienden a funcionar mal cuando las muestras tienen distribuciones de transcripciones muy distintas. Algunos métodos de normalización que toman esto en cuenta son TMM, DESeq, PoissonSeq y UpperQuartile. El paquete NOISeq R contiene una amplia variedad de gráficos de diagnóstico para identificar fuentes de sesgos en los datos de ARN-seq y aplicar procedimientos de normalización apropiados en cada caso.

La secuencia experimental a seguir en un ensayo de RNA-seq se muestra en la (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Diagrama experimental de un ensayo de RNA-Seq

### 3.7 Métodos de desinfección

Los métodos de desinfección tienen por objetivo garantizar la potabilidad en la planta de tratamiento de agua y hasta el agua corriente del consumidor.

Los procesos de potabilización están en función de la calidad del agua de las fuentes de abastecimiento. Si la calidad es buena, sólo será necesario llevar a cabo la desinfección; pero si esta no tiene la calidad adecuada, entonces será necesario involucrar diversas operaciones unitarias como oxidación, coagulación, floculación, sedimentación y filtración.

En cualquier comparación de métodos de desinfección ciertas consideraciones deben ser analizadas desde el principio por su relevancia en la mayoría de los métodos. La calidad del agua cruda (en especial, su contenido de sólidos y material que reaccionará con el desinfectante), el tipo tratamiento del agua antes de la desinfección y la manera en que el desinfectante se aplicará al agua afectará directamente la eficacia de todos los desinfectantes. También se debe considerar

las diferencias en la respuesta a los desinfectantes entre los organismos obtenidos directamente de muestras ambientales y los que han sido aclimatados al cultivo en laboratorio para garantizar su inactivación.

Los desinfectantes son usados como un método de barrera para eliminar la contaminación biológica del agua, sin embargo los procesos de desinfección utilizados en una planta de tratamiento se aplican en diversos puntos del proceso y estos se clasifican de la siguiente manera:

- Oxidación previa al tratamiento en la que los oxidantes se añaden al agua al principio del proceso de tratamiento.
- Desinfección primaria: un componente común del tratamiento primario del agua potable, e importante porque los medios filtrantes granulares no eliminan todos los patógenos microbianos del agua.
- Desinfección secundaria - utilizada para mantener la calidad del agua alcanzada en la planta de tratamiento en todo el sistema de distribución hasta la llave.

El uso de cloro como desinfectante es la práctica más común en muchas plantas de potabilización y en varios lugares sigue siendo el principal método de desinfección. Sin embargo, existen ciertos mecanismos de resistencia que presentan algunos microorganismos o dosis demasiado altas que generan otros compuestos tóxicos llamados subproductos de desinfección (SPD) por lo que se han buscado alternativas a esta práctica.

Un desinfectante deberá cumplir con las siguientes cualidades para poder ser una alternativa a la cloración:

- Amplio poder desinfectante sobre una amplia gama de organismos
- Fácil de usar y seguridad en el manejo
- Fácil de controlar con técnicas analíticas para determinar la concentración
- Poder residual para evitar la re-contaminación a través del sistema de distribución
- Sin efectos de toxicidad secundaria

Por lo general los desinfectantes siguen tres mecanismos de desinfección; el primero involucra la destrucción o el daño de los principales constituyentes de la célula por medio del ataque a éstos; el segundo implica la interferencia del metabolismo del rendimiento energético que hace que las enzimas no funcionen; el tercero trata con la intervención de la biosíntesis y el crecimiento por medio de la prevención de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas o la síntesis de la pared celular. En la **Tabla 3.5** se muestran las principales características de los desinfectantes estudiados en este estudio.

**Tabla 3.5.** Características principales del cloro y ozono

Agente	Aplicación	Variables dependientes	Método de acción	Requerimientos y desventajas	Concentración y tiempo de contacto	Residual	Subproductos
Cloro	Reducción de patógenos  Versatilidad y economía Fácil de usar y controlar	pH (Se favorece a pH7)	Oxida los componentes celulares (Grupos SH y ácidos nucleicos)  Destrucción de la pared celular que genera la liberación de compuestos vitales citoplasmáticos	Reacciona con impurezas orgánicas y los convierte en sustancias cancerígenas como trihalometanos.  Existe la resistencia microbiana. Genera olor y sabor	0.5 ppm x 15 min (CT 7.5 min mg /L)	Alto	Trihalomentanos y ácidos haloacéticos
Ozono	Más eficiente que el cloro libre para inactivar virus y esporas bacterianas y quistes	Temperatura (Se favorece la transferencia pero se obtienen mejores resultados a temp. Superiores a 20°C)	El ozono promueve el proceso de oxidación ya que posee un alto potencial de oxidación.  Reacciona con sustancias citoplásmicas y lleva a cabo la degradación del ADN cromosómico en bacterias	Muy inestable y se descompone rápidamente en agua. Su vida útil es demasiado corta para asegurar un residuo.  Alto costo de operación y debe ser generado cuando se utiliza	0.2 -0.4 ppm x 10 min (CT :2-4 mg min/L)	Bajo	Bromatos

### 3.8 Cinética

Hace apenas más de cien años, Kronig y Paul (1897) publicaron que la tasa de desinfección de las bacterias dependía de la concentración del desinfectante y de la temperatura del experimento. Madsen y Nyman en 1907 y Chick en 1908 sugirieron que la desinfección era análoga a los procesos de reacción química. Esto se conoció como la **hipótesis mecanística** de la desinfección (Lee y Gilbert 1918). Sin embargo, se planteó otra hipótesis para explicar la desinfección. Esta hipótesis se basó en el supuesto de que existía una distribución de resistencias al desinfectante químico dentro de la población microbiana. Esto se conoce como la **hipótesis vitalista** de la desinfección química. Las discusiones sobre cuál de las dos hipótesis era correcta fue un tema importante de la época.

Una de las características principales que la **hipótesis mecanística** no podía explicar era la cola de las curvas de tiempo de supervivencia logarítmica. El modelo mecanístico de Chick-Watson, se basó en la cinética de reacción química de primer orden (Watson 1908; Phelps 1911). Dado que este modelo matemático sólo podía tratar con curvas lineales de tiempo de supervivencia logarítmica, las desviaciones de la recta se explicaron por la presencia de variaciones en la resistencia poblacional (Chick 1908). Los Vitalistas fueron más allá y sugirieron que toda la desinfección se debía a la "variación permanente en la resistencia de la población a los desinfectantes" (Lee y Gilbert, 1918). En 1942, Withell describió un método para obtener la distribución de resistencias dentro de la población y sugirió de nuevo que la **hipótesis Vitalista** era una explicación más razonable para las observaciones de desinfección que la hipótesis Mecánica.

Varios modelos matemáticos fueron examinados a partir de la literatura y se dividieron en dos clases de principios: los que apoyan la hipótesis Mecánica y los que apoyan la hipótesis Vitalista. En casi todos los modelos mecanicistas presentados para tener en cuenta la no linealidad de las curvas de tiempo de supervivencia logarítmica, se sugirió una etapa de población intermedia, con diferentes tasas de desinfección para cada uno de los diferentes estados microbianos (Cerf 1977).

Existen muchos modelos matemáticos para la cinética de desinfección, pero como Prokop y Humphrey (1970) expresaron: "En su mayor parte son demasiado complicados para ser de utilidad práctica". En general, se utiliza preferentemente el modelo lineal-logarítmico simple de Chick-Watson o el modelo empírico más útil (Hom, 1972) de desinfección, que permite un ajuste a los datos no lineales de supervivencia en el tiempo. La cuestión de si la desinfección subyacente se produce a través de un proceso Mecánico o Vitalista, o ninguno de los dos o ambos, todavía está abierta a debate.

En la publicación de (Johnston *et al.*, 2000) demostró que el tamaño del inóculo inicial de la prueba de desinfección podría tener un impacto muy grande en el resultado de la prueba. Puesto que, desde el punto de vista Vitalista, la distribución de la resistencia al biocida dentro de la población era permanente e idéntica, por ejemplo, ya sea  $1 \times 10^8$  bacterias por mL ó 1000 bacterias por mL, se habrían obtenido curvas de supervivencia idénticas de diferentes tamaños de inóculos de partida. sin embargo, cambios pequeños en los tamaños de los inóculos de ensayo (de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$ ) dieron lugar a resultados muy diferentes de reducción de tiempo de registro. Esto sugirió que las bacterias estaban alterando la concentración del desinfectante durante el curso de la desinfección. Aunque algunas pruebas se presentaron para ayudar a demostrar este punto, un modelo matemático revisado, basado en motivos mecánicos, era insuficiente.

A continuación se muestran los principales modelos de desinfección que son utilizados actualmente; el modelo de Chick-Watson y el modelo de Hom. Existen otros modelos que se basan en la capacidad de los microorganismos para reducir el nivel efectivo biocida durante la propia prueba de desinfección.

**3.8.1 Modelo de Chick-Watson (basado en el tiempo de contacto)**

El modelo más utilizado para describir la desinfección del agua es la ley de Chick-Watson. Este es un modelo de pseudo primer orden y puede ser representado matemáticamente como sigue :

Modelo de Chick 1908

$$\frac{dN}{dt} = -kN \dots\dots\dots 3.1$$

Integrando ecuación 3.1, obtenemos

$$\ln \left( \frac{N_t}{N_0} \right) = -kt \dots \dots \dots 3.2$$

Donde:

$dN/dt$ = Es la velocidad de inactivación

$k$ = constante de letalidad específica de pseudo primer orden (litros/ miligramos minutos)

$N$ = Número de organismos

$n$ = Coeficiente de dilución (litros/ miligramos minutos)

$t$ = Tiempo de contacto

**3.8.2 Modelo de Watson (Basado en la concentración)**

Watson, utilizando datos proporcionados por Chick, redefinió la ecuación para obtener una relación empírica que incluye los cambios en la concentración del desinfectante.

$$k = k' C^n \dots \dots \dots 3.3$$

Donde:

$k$ = Constante de velocidad de inactivación

$k'$ = Constante de agotamiento

$C$ = concentración del desinfectante (miligramos/Litro)

$n$ = coeficiente de dilución

Combinando ambas expresiones propuestas por Chick y Watson (ec. 3.2 y 3.3) se obtiene la expresión propuesta por Has san Kara 1984:

$$\frac{dN_t}{dt} = -k' C^n N_t \dots \dots \dots 3.4$$

Integrando la ecuación 3.4:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kC^n T \dots\dots\dots 3.5$$

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kC^n T} \dots\dots\dots 3.6$$

En forma lineal :

$$\ln C = -\frac{1}{n} \ln t + \frac{1}{n} \ln \left[ \frac{1}{k} \left( -\ln \frac{N_t}{N_0} \right) \right] \dots\dots\dots 3.7$$

El valor de n se puede obtener graficando C vs t en escala logarítmica para un nivel de inactivación.

Si el valor de:

n=1 tanto la concentración como el tiempo son igual de importantes

n>1 la concentración es más importante que el tiempo

n<1 el tiempo es más importante que la concentración

**3.8.3 Modelo de Hom**

Mientras que el modelo de Chick-Watson funciona bien para la inactivación con cloro, para el ozono el comportamiento parece ser distinto; una fase rápida inicial, seguida de una fase lenta

$$\frac{dN}{dt} = -k_m N C^n t^{m-1} \dots\dots\dots 3.8$$

Donde:

m= es una constante empírica

t= tiempo de contacto

Asumiendo que la concentración del desinfectante se mantiene constante durante el transcurso del tiempo de contacto, la ecuación 3.8 se integra como sigue:

$$\log \frac{N}{N_0} = -kC^n t^m \dots\dots\dots 3.9$$

Asumiendo un decaimiento de primer orden, el número de moléculas destruidas por unidad de tiempo es proporcional al número de moléculas restantes y que la concentración del desinfectante está dada por:

$$C = C_0 e^{-kt} \dots\dots\dots 3.10$$

Donde

C= es la concentración final de ozono al final del tiempo de contacto

C<sub>0</sub>= L a concentración inicial en el tiempo cero

k<sup>t</sup> =es la constante de velocidad de primer orden.

La sustitución y la integración de la ecuación en la ley de Hom es la siguiente:

$$\log \frac{N}{N_0} = -kmC_0^n \int_0^T e^{-k^n t^n} t^{m-1} dt \dots\dots\dots 3.11$$

Esta expresión se basa en tres supuestos:

- La velocidad de decaimiento del oxidante no es una función del organismo presente.
- El decaimiento del desinfectante químico es independiente del nivel de inactivación de la reacción.
- Las estimaciones de parámetros de ley de velocidad son independientes de las características del agua.

La expresión no puede ser integrada a una forma reducida ya que los límites de integración están relacionados con el tiempo de contacto. Sin embargo se puede resolver numéricamente.

#### **3.8.4 Valores CT**

Los valores de CT (concentración X tiempo de contacto) proporcionan una base para comparar la eficacia de diferentes desinfectantes para la inactivación de microorganismos específicos y para comparar la resistencia relativa de diferentes microorganismos a los desinfectantes. En algunos casos, los valores de CT derivados de la exposición a diferentes concentraciones del mismo desinfectante en condiciones específicas de pH y temperatura muestran poca variación mientras que en otros casos se observa una amplia gama de valores de CT.

Es difícil discernir las razones por las cuales se encuentran valores CT muy diferentes al considerar los resultados de una sola investigación o al considerar los resultados de varias investigaciones. Estos factores en algunos casos dificultan la precisión de los requisitos de desinfección. El uso de valores de CT para evaluar la práctica de desinfección o establecer criterios de desinfección para su uso en el campo debe hacerse con mucha precaución y la incorporación de factores de seguridad apropiados en los valores de CT es necesaria. Algunos problemas importantes en la aplicación de los resultados de los valores de CT en el diseño de un proceso de desinfección son: a) el fracaso de los datos de desinfección para seguir las tasas exponenciales descritas por las ecuaciones empíricas de CT, b)

las diferencias en la resistencia a la desinfección entre diferentes aislamientos de la misma especie y entre especies dentro de los grupos de (bacterias, virus, quistes), C) los efectos del "Estado metabólico del microorganismo" tales como la agregación, las condiciones de crecimiento previo y los efectos protectores que no pueden ser tomados en cuenta en los valores, D) influencia de las condiciones experimentales (configuraciones del reactor, intensidad de mezcla, variaciones de la concentración desinfectante, etc.) sobre las tasas de inactivación, E) Los problemas relacionados con la relevancia de los datos de laboratorio con las condiciones de campo.

El uso de los valores de inactivación CT están respaldados por las ecuaciones de Chick-Watson asumiendo ciertas condiciones como se muestra a continuación:

A partir de la ecuación de Chick podemos obtener el valor CT:

$$\frac{dN_t}{dt} = -k' C^n N_t \dots \dots \dots 3.12$$

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = -kt \dots \dots \dots 3.13$$

Para un nivel de sobrevivencia  $N_t/N_0=0.001$  (3 log) el lado izquierdo de la ecuación se convierte en la constante K,:

$$k=C^n t^m \dots \dots \dots 3.14$$

La constante de velocidad k difiere por desinfectante, concentración de desinfectante, organismo y temperatura. Una completa inactivación del microorganismo no es factible según este modelo.

En los casos donde la turbiedad del agua es baja n es igual a 1, haciendo que la desactivación de bacterias se convierta en una reacción de primer orden. Cuando la constante n es "casi igual" a 1, la ley de Watson se puede abordar como:

$$k = Ct \dots \dots \dots 3.15$$

Varios niveles de desactivación se puede lograr, esto a menudo se expresa como una reducción logarítmica:

Reducción log = desactivación 90%

Reducción log = desactivación 99%

Reducción log = desactivación 99,9%

Reducción de 4 log = desactivación 99,99%

Algunos datos de CT reportados para bacterias se muestran en la (**Tabla 3.6**) y (**Tabla 3.7**).

**Tabla 3.6.** Valores de CT reportados para desinfección con ozono

Organismo	CT (min mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Fuente
Bacteria (general)	CT <sub>99</sub> =1	15	7	EPA 1999 Droste 2000
<i>Giardia Lamblia</i>	CT <sub>90</sub> = 0.24	20	6 a 9	UEPA 2001
<i>Giardia Lamblia</i>	CT <sub>90</sub> = 0.32	15	6 a 9	CDC R. Schulz 2005
<i>Cryptosporidium</i>	CT <sub>99</sub> =7.8	20	6 a 9	Ross 1976
<i>Cryptosporidium</i>	CT <sub>99,9</sub> =12	20	7	Baker 2002
<i>Escherichia coli</i>	CT <sub>99</sub> =0.035	11	6 a 9	Baker 2002
<i>Helicobacter pylori</i>	CT <sub>99</sub> =0.27	15	7	Baker 2002
<i>Escherichia coli</i>	CT <sub>99</sub> =0.11	15	7	Baker 2002

**Tabla 3.7.** Valores de CT reportados para desinfección con cloro

Organismo	CT (min mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Fuente
<i>Giardia Lamblia</i>	CT <sub>90</sub> = 21	20	7	Droste 2000
<i>Giardia Lamblia</i>	CT <sub>99</sub> = 34	20	7	CDC
<i>C. jejuni</i>	CT <sub>99</sub> =0.5	25	8	CDC
<i>Vibrio cholerae</i>	CT <sub>99,9</sub> =0.3	20	7	CDC
<i>Escherichia coli</i>	CT <sub>99,9</sub> =0.2	23	7	CDC
<i>Escherichia coli</i>	CT <sub>99</sub> =0.125	25	7	NCBI
<i>B. pseudomallei</i>	CT <sub>99</sub> =0.5	21	7	Rose 2004
<i>Helicobacter pylori</i>	CT <sub>99</sub> =0.080	15	7	Baker 2002

### ***3.8.5 Resistencia a la desinfección entre organismos de origen natural y cultivos puros***

La resistencia o sensibilidad a los agentes desinfectantes de algunas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas ha sido estudiada. Esta resistencia dependerá de la cepa bacteriana con la que se trabaje, ya sea que provenga de un cultivo puro o de un medio natural.

La resistencia comparativa a los desinfectantes entre las bacterias Gram-negativas varía mucho. Se ha observado que *Pseudomonas alcaligenes*, un contaminante bacteriano común en piscinas yodadas, puede crecer bien en aguas de piscinas que han sido esterilizadas con filtros de membrana. A partir del agua de las piscinas contaminadas que contienen una variedad de bacterias, se aisló un cultivo puro de *P. alcaligenes*. Las pruebas posteriores mostraron que estas células de origen natural eran significativamente más resistentes al yodo libre que las células del mismo organismo que habían sido sub-cultivadas una vez en agar soya tripticasa. De hecho, las pruebas estándar a la desinfección usando las células que habían sido sub-cultivadas en un medio de laboratorio enriquecido sugirieron que *P. alcaligenes* nunca podría ser encontrado en piscinas que habían sido desinfectadas (suposición errónea). El descubrimiento de que las células de origen natural eran extremadamente resistentes al yodo explicó las concentraciones relativamente altas de *P. alcaligenes* que se acumulaban en el agua de la piscina que se había yodado durante varias semanas.

Posteriormente en los años 70 se publicaron una serie de trabajos que demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* aislada de hospitales podía crecer rápidamente en agua destilada y podían alcanzar altas concentraciones de células que permanecían estables durante mucho tiempo. Las células que se producen naturalmente y que se hicieron crecer en agua destilada reaccionaron de manera muy diferente a los esfuerzos químicos y físicos en comparación con las células crecidas en medios de cultivo de laboratorio convencionales. Por ejemplo, las células naturales de *P. aeruginosa* fueron significativamente más resistentes al cloro y a los compuestos de amonio cuaternario y glutaraldehído alcalino que las células sub-cultivadas.

En las aguas desinfectadas con cloro, las bacterias naturales pueden ser de uno a dos órdenes de magnitud más resistentes a los desinfectante que las células del mismo organismo que han sido sub-cultivadas en medios de cultivo de laboratorio convencionales. Dado que las pruebas estándar de desinfección emplean necesariamente células bacterianas sub-cultivadas, pueden crearse falsos datos si se utilizan como un criterio absoluto para el diseño de un proceso de desinfección. Estos resultados podrían explicar las frecuentes diferencias entre las pruebas que se realizan en condiciones de laboratorio y las que se realizan en condiciones de campo.

Si las bacterias pudieran utilizarse en su estado natural, se podría explorar la posibilidad de superar las diferencias entre las condiciones de laboratorio y de campo utilizando estos sistemas experimentales. La capacidad de algunas bacterias Gram-negativas de crecer en agua hace posible producir y controlar un gran número de células para tales estudios (**National Research Council, 1980**).

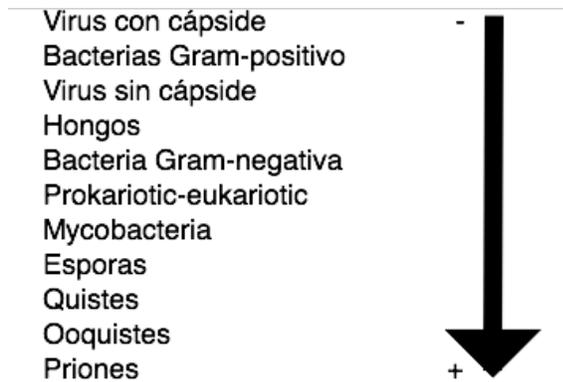
Por lo anterior es necesario la aplicación de técnicas independientes de cultivo como ya se mencionó en este trabajo en el capítulo 3.7.

### ***3.8.6 Interacciones de los desinfectantes con las bacterias***

Cuando se utilizan desinfectantes oxidantes como las diferentes formas del cloro, la acción de la desinfección se enfocará primero en la mayoría de las estructuras exteriores de la célula (pared celular y membrana citoplasmática). Todas las eubacterias (excepto las micoplasmas) tienen una pared celular, que confiere rigidez mecánica a la célula y protege la membrana citoplasmática subyacente. Una bacteria Gram-negativa típica tiene una capa de peptidoglicano mucho más delgada y más próxima a la membrana citoplásmica. Estas estructuras externas al peptidoglicano de las bacterias Gramn-egativas tienen un espacio periplásmico, mientras que la región más externa se denomina membrana externa. Esta parte externa compleja específica de las bacterias Gram-negativas, contiene lipoproteína (ligada covalentemente a la capa de peptidoglicano) lipopolisacáridos y fosfolípidos.

Las bacterias Gram-negativas son generalmente menos sensibles a los biocidas que las bacterias Gram-positivas debido a su membrana externa (**Figura 3.4**). Sin

embargo, las bacterias Gram-negativas parecen ser más resistentes al cloro. La pérdida de permeabilidad de la membrana será el primer efecto letal del cloro en *E. coli*, debido al daño a la membrana externa, produciendo un desequilibrio en el gradiente iónico transmembrana. Cuando los niveles de cloro sub-letal están presentes, la inhibición de la respiración será el primer efecto.



**Figura 3.4.** Susceptibilidades relativas a los agentes desinfectantes, de menor a mayor resistencia (Handbook of wáter and wastewater microbiology)

Los primeros sitios atacados por el ozono son la pared celular y la membrana, ya sea a través de glicoproteínas, glicolípidos o ciertos aminoácidos como el triptófano. Algunos estudios sugieren que el ozono altera las proteínas y los enlaces saturados de ácidos grasos en las estructuras de la membrana, dando lugar a la lisis celular. La inactivación de bacterias por el ozono está atribuida a una reacción oxidante. Sin embargo, algunos investigadores creen que la desinfección con ozono es un resultado de la reacción directa del ozono, mientras que otros creen que el mecanismo es por radicales hidroxilo es el más importante para la desinfección.

Una vez que se supera la pared celular, la membrana citoplasmática es el blanco preferido de los desinfectantes para concentraciones bajas. Se sabe que varias sustancias alteran la membrana citoplasmática. Estos agentes pueden provocar una fuga de material intracelular y una modificación de la permeabilidad de las células, aunque también pueden producirse otros efectos. La lisis bacteriana, por la ruptura de la pared celular, es un fenómeno bastante extraño que sólo se produce con dosis masivas de desinfectantes, principalmente con ozono,. Una vez

que la membrana celular está dañada, se produce una fuga de material celular y puede afectar a los constituyentes celulares internos. Sin embargo, la fuga se considera mejor como una medida de la interrupción de la barrera de la permeabilidad de la célula, y puede reflejar un efecto bacteriostático en vez de la muerte celular. Una vez que se ha realizado la permeabilización de la membrana, las enzimas respiratorias se oxidan a través de sus grupos sulfhidrilos.

### 3.9 Ozono

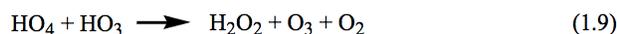
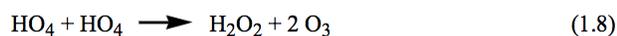
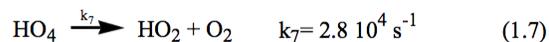
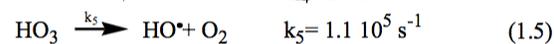
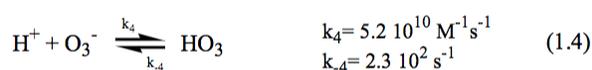
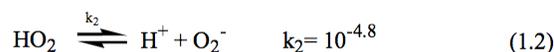
El ozono es un oxidante potente y posee múltiples usos en el tratamiento del agua, incluida la oxidación de sustancias orgánicas. Tiene una alta eficacia germicida contra una amplia gama de organismos patógenos incluyendo bacterias, protozoarios y virus. Sin embargo, el ozono no puede ser utilizado como un desinfectante secundario debido a la desintegración rápida de las concentraciones residuales de ozono (menos de 30 minutos), por lo que es utilizado como desinfectante primario. El ozono es 14 veces más soluble que el oxígeno en agua y aumenta con la presión. A medida que la temperatura aumenta, el ozono se vuelve menos soluble y menos estable en el agua; Sin embargo, la desinfección y las tasas de oxidación química permanecen relativamente estables. La temperatura prácticamente no tiene efecto sobre la tasa de desinfección de las bacterias a pesar de la reducción de la solubilidad y de la estabilidad reducida a temperaturas más altas.

El ozono gaseoso ( $O_3$ ) se forma in-situ haciendo pasar aire seco u oxígeno a través de un campo eléctrico de alta tensión. El aire enriquecido en ozono obtenido se añade directamente al agua mediante difusores porosos en la base de torres de contacto. El ozono que sobra se hace pasar por un destructor de ozono y se expulsa a la atmósfera. La importancia principal de los procesos de oxidación para la desinfección es que gran parte del ozono generalmente será consumido por otras sustancias que suelen estar presentes en el agua y habrá que satisfacer esa demanda antes de asegurar la desinfección.

Las posibles especies presentes en una solución de ozono son: el ozono y sus radicales ozonidos ( $\bullet O_3$  2.08 V), y los radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ , 2.80 V). La oxidación

con ozono molecular se produce lentamente en contraste con la oxidación con radicales hidroxilo que se produce muy rápidamente.

En la (**Figura 3.5**) se observa el decaimiento del ozono en agua y dado que la reacción con OH es la etapa de descomposición inicial, la estabilidad de una solución de ozono es por lo tanto altamente dependiente del pH y disminuye a medida que aumenta la alcalinidad.



**Figura 3.5.** El agotamiento del ozono en el agua, de acuerdo a Hoigné-Staehelin-Bader

Los parámetros de calidad del agua, como el pH, tienen un impacto significativo en la ozonización. Se requieren diferentes dosis de ozono para diferentes niveles de pH. Un pH más alto facilita la descomposición del ozono debido al aumento de la formación de radicales hidroxilo; Mientras que un pH inferior (inferior a 7,0) ralentiza la descomposición del ozono, lo que resulta en concentraciones más elevadas de ozono molecular. La velocidad de descomposición del ozono aumenta significativamente (debido a la formación del radical OH) cuando el pH es mayor que 8,0. Los residuos de ozono son difíciles de mantener a niveles de pH superiores a 9,0. Mientras que el ozono molecular es fácilmente medido, el radical hidroxilo es difícil de medir.

Se sabe que el ozono ataca los enlaces insaturados, formando aldehídos, cetonas o compuestos carbonílicos. Además, el ozono puede participar en reacciones electrofílicas, particularmente compuestos aromáticos y en reacciones nucleófilas

con muchos de los componentes de la célula microbiana. Los carbohidratos y los ácidos grasos reaccionan sólo ligeramente con el ozono, pero los aminoácidos, las proteínas, los grupos funcionales de la proteína (por ejemplo, los enlaces disulfuro) y los ácidos nucleicos reaccionan muy rápidamente con él ozono. Es probable, por lo tanto, que los microbios se inactiven a través del ozono que actúa sobre la membrana citoplasmática (debido al gran número de proteínas funcionales), la estructura proteica de una cápside viral o ácidos nucleicos de microorganismos. Los radicales libres formados por la descomposición del ozono son generalmente menos efectivos para la inactivación microbiana que el ozono molecular, porque las células microbianas contienen una alta concentración de iones bicarbonato que apagan la reacción de los radicales libres y muchas células microbianas también contienen catalasa, peroxidasa o superóxido dismutasa para controlar los radicales libres producidos por la respiración aeróbica.

Algunas bacterias contienen pigmentos carotenoides y flavonoides que los protegen del ozono. Estos factores pueden explicar los estudios sobre las bacterias heterótrofas, las cuales pueden ser menos susceptibles a la inactivación del ozono que *Giardia* (Wolfe et al., 1989). Estos resultados sugieren que los radicales libres proporcionan poco beneficio en términos de destrucción microbiana.

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

Desde el punto de vista de la eficacia biocida, el ozono es el desinfectante más potente que se utiliza en los suministros de agua. Los tiempos de contacto y la concentración para inactivar o matar los agentes patógenos transmitidos por el agua son mucho más bajos que los del cloro libre o cualquier otro desinfectante.

En la tabla **Tabla 3.8** se muestran las principales ventajas y desventajas del uso de ozono como desinfectante de agua.

**Tabla 3.8** Ventajas y desventajas del uso de ozono como desinfectante de agua

Ventajas	Desventajas
Potente oxidante	No proporciona un residual estable
Oxida hierro y manganeso (Elimina color)	Costo relativo alto por su gasto en inversión y energético de operación
Tiempos de contacto cortos	Altamente corrosivo
Baja generación de Sub Productos Desinfección	Tecnología más compleja
No deja sabor en el agua	Olor en el área de trabajo
No existe el crecimiento de bacterias después del tratamiento	Produce material biodegradable que debe ser removido
Incrementa el oxígeno disuelto	
Mejora el proceso de floculación y el tratamiento biológico	

### 3.10 Cloro

En todo el mundo, el mecanismo de desinfección más aplicado en los sistemas de abastecimiento de agua es el que emplea el cloro y sus compuestos derivados como agentes desinfectantes. Fue introducido masivamente a principios del siglo XX y constituyó una revolución tecnológica, que complementó el proceso de filtración que ya era conocido y utilizado para el tratamiento del agua. La cloración incrementó en 50% la esperanza de vida de los países desarrollados.

La clave de su éxito es su accesibilidad en casi todos los países del mundo, su razonable costo, su alta capacidad oxidante, que es el mecanismo de destrucción de la materia orgánica, y su efecto residual. Todo ello permite en forma bastante simple, asegurar la inocuidad del agua desde que se produce hasta el momento que se usa, lo que resulta muy beneficioso, tanto en sistemas pequeños como en grandes ciudades con redes de distribución extendidas.

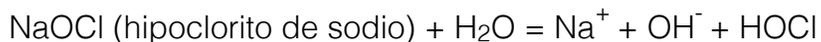
La eficacia de la desinfección con cloro depende no sólo del propio patógeno, sino también del pH y la temperatura del agua. En general, la desinfección es más

eficaz a temperaturas más altas y pH más bajo. El apego a la materia particulada, la agregación, la encapsulación del patógeno, la ingestión por protozoos y la turbidez del agua también pueden afectar la eficacia del cloro.

La cantidad de cloro que se va a dosificar equivale a la demanda total de cloro (la cual está estrechamente ligada a la calidad química y microbiológica del agua) a la que debe adicionarse la cantidad de cloro residual esperada en el extremo de la red. Por lo tanto, antes de llevar a cabo el proceso de desinfección es conveniente realizar ensayos de consumo instantáneo de cloro. Este ensayo se denomina “ensayo de demanda de cloro”.

El valor CT (Concentración por tiempo de contacto) máximo que se puede aplicar al agua es 56 mg min/L (1.9 mg/L de hipoclorito de sodio durante 30 minutos). Para agua turbia, la dosis se duplica con un factor CT máximo resultante de 112 mg min /L. La operación habitual es mantener un residual de 0.5 mg/L por 30 minutos para alcanzar un CT de 15 mg min /L.

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



La especie desinfectante es el ácido hipocloroso (HOCl), el cual se disocia en iones hidronio (H<sup>+</sup>) e hipoclorito (OCl<sup>-</sup>) y adquiere sus propiedades oxidantes:



Las reacciones son reversibles y dependiente del pH:

Entre pH 3.5 y 5.5 , HOCl es la especie predominante

Entre pH 5.5 y 9.5 , ambas especies de HOCl y OCl<sup>-</sup> existen en diversas proporciones

Por encima de pH 8 , OCl<sup>-</sup> predomina

Las diferentes concentraciones de las dos especies significan una considerable diferencia en la propiedad bactericida del cloro, ya que estos dos compuestos presentan diferentes propiedades germicidas. En realidad, la eficiencia de HOCl es por lo menos 80 veces mayor que la del OCl<sup>-</sup>.

El OCl<sup>-</sup> y especies de HOCl se refieren comúnmente como cloro libre, el cual es extremadamente reactivo con numerosos componentes de la célula bacteriana. El HOCl puede producir reacciones de oxidación, hidrólisis y desaminación con una variedad de sustratos químicos, y produce lesiones fisiológicas que pueden afectar a varios procesos celulares.

En un sistema de abastecimiento de agua, la cloración se realiza normalmente al final del tratamiento, después de la etapa de filtración. A ello a veces se le denomina post-cloración. A veces se realiza una cloración previa a cualquier otro tratamiento, llamado en este caso, pre-cloración. Ésta se lleva a cabo con el propósito de controlar las algas que puedan obstruir los filtros y eliminar el gusto y el olor del agua. En este caso y cuando el agua sin tratar lleva algunos materiales orgánicos llamados “precursores” (materia orgánica, ácidos húmicos, etc.), se pueden generar los subproductos de la desinfección. Los constituyentes más característicos de los SPD de la cloración son los trihalometanos (THM).

### *3.10.1 Ventajas y desventajas del cloro*

El cloro es un desinfectante que tiene ciertos limitantes en términos de salubridad y seguridad, pero al mismo tiempo tiene un largo historial como un desinfectante efectivo.

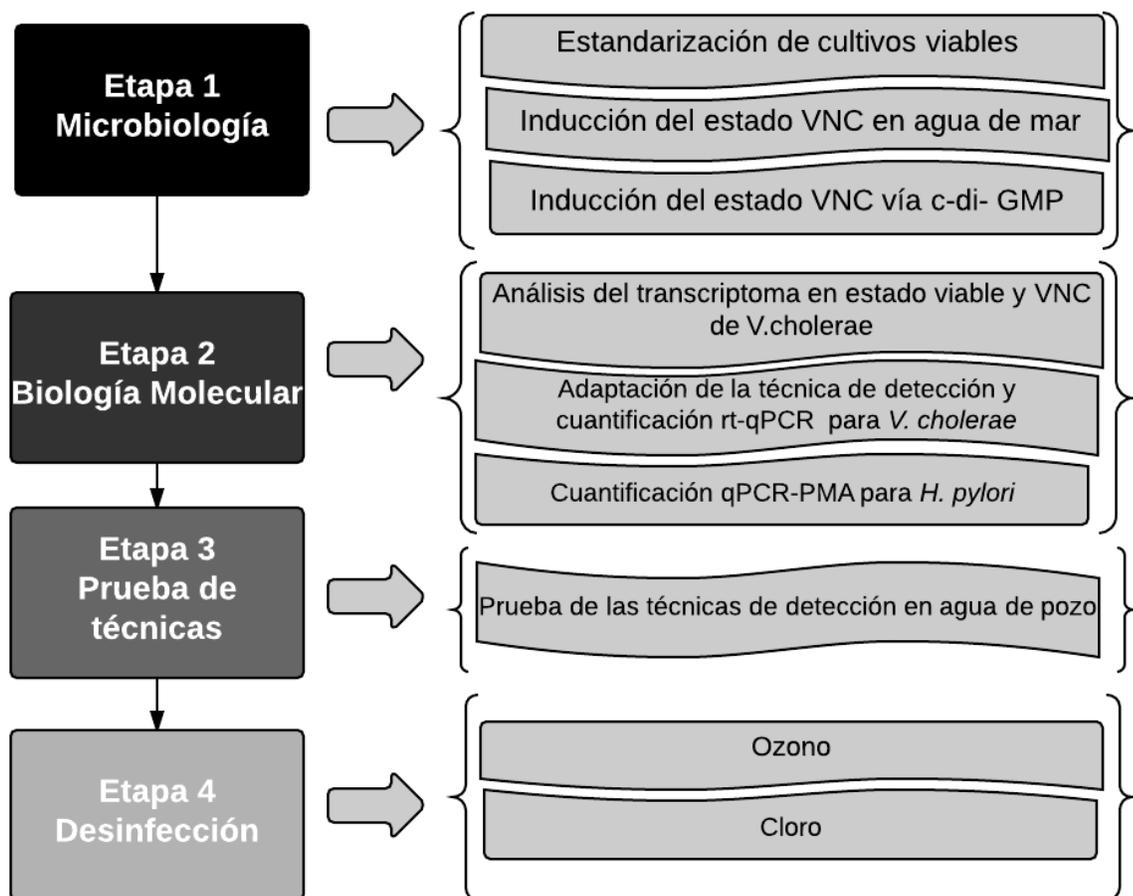
En la tabla **Tabla 3.8** se muestran las principales ventajas y desventajas del uso de ozono como desinfectante de agua.

**Tabla 3.9** Ventajas y desventajas del uso de cloro como desinfectante de agua

Ventajas	Desventajas
<p>La cloración es una tecnología bien establecida.</p> <p>En la actualidad la cloración es más eficiente en términos de costo que la radiación UV o la desinfección con ozono</p> <p>El cloro residual que permanece en el efluente del agua residual puede prolongar el efecto de desinfección</p> <p>De fácil medición</p>	<p>El cloro residual, aún a bajas concentraciones, es tóxico a los organismos acuáticos y por ello puede requerirse la descloración.</p> <p>Todas las formas de cloro son muy corrosivas y tóxicas.</p> <p>El almacenamiento, el transporte y el manejo presentan riesgos cuya prevención requiere normas más exigentes de seguridad industrial.</p> <p>El cloro oxida ciertos tipos de materiales orgánicos del agua residual generando compuestos más peligrosos (tales como los trihalometanos ).</p> <p>El nivel total de sólidos disueltos se incrementa en el agua efluente.</p> <p>El cloro residual es inestable en presencia de altas concentraciones de materiales con demanda de cloro, por lo cual pueden requerirse mayores dosis para lograr una desinfección adecuada.</p> <p>Algunos parásitos presentan resistencia a dosis bajas de cloro, incluyendo los oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>, los quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Giardia lamblia</i>, y los huevos de gusanos parásitos.</p>

## 4 Metodología

Este proyecto se llevó a cabo en 4 etapas las cuales se detallan a continuación:

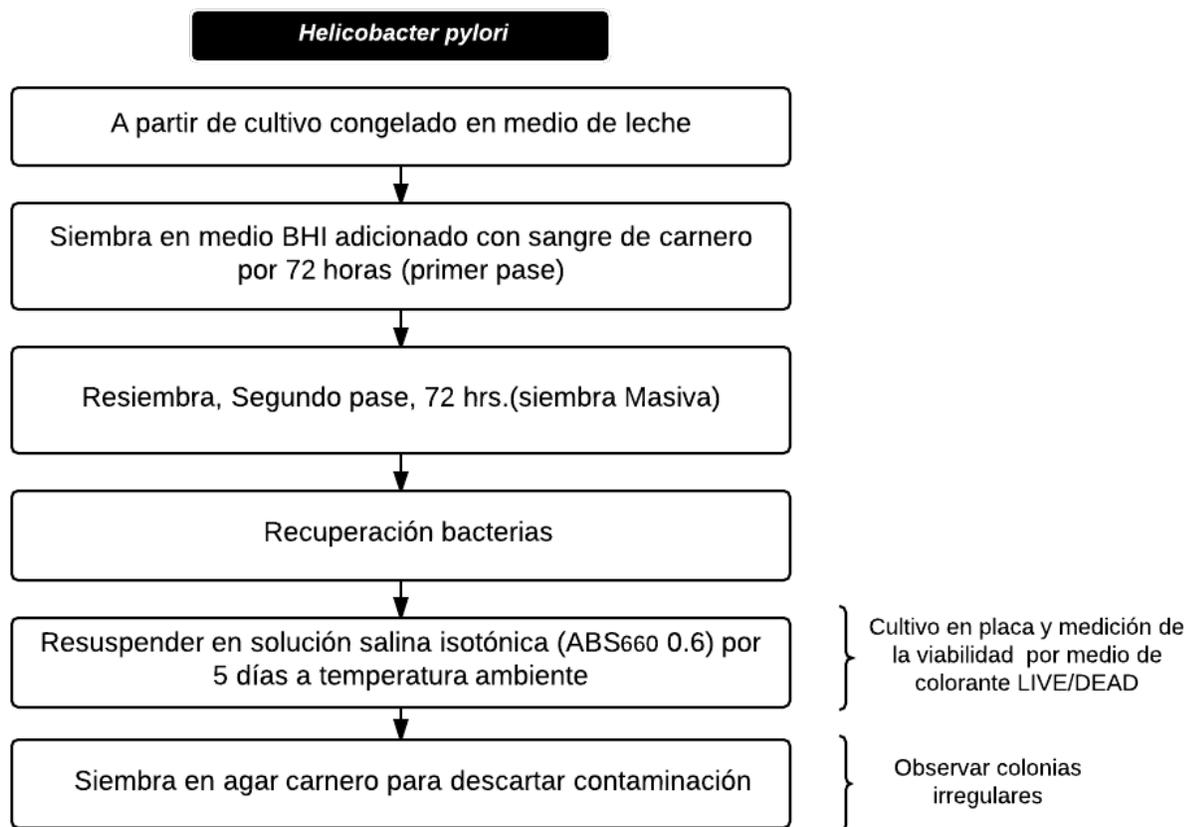


#### 4.1 Etapa 1, Microbiología

Para llevar a cabo el crecimiento y la inducción del estado VNC de *H.pylori* y *V: cholerae* se siguió la siguiente metodología:

##### 4.1.1 *H. pylori*, Cultivo e inducción del estado VNC

En la figura **Figura 4.1** se muestra el diagrama de flujo del cultivo e inducción de la bacteria *H. pylori*.



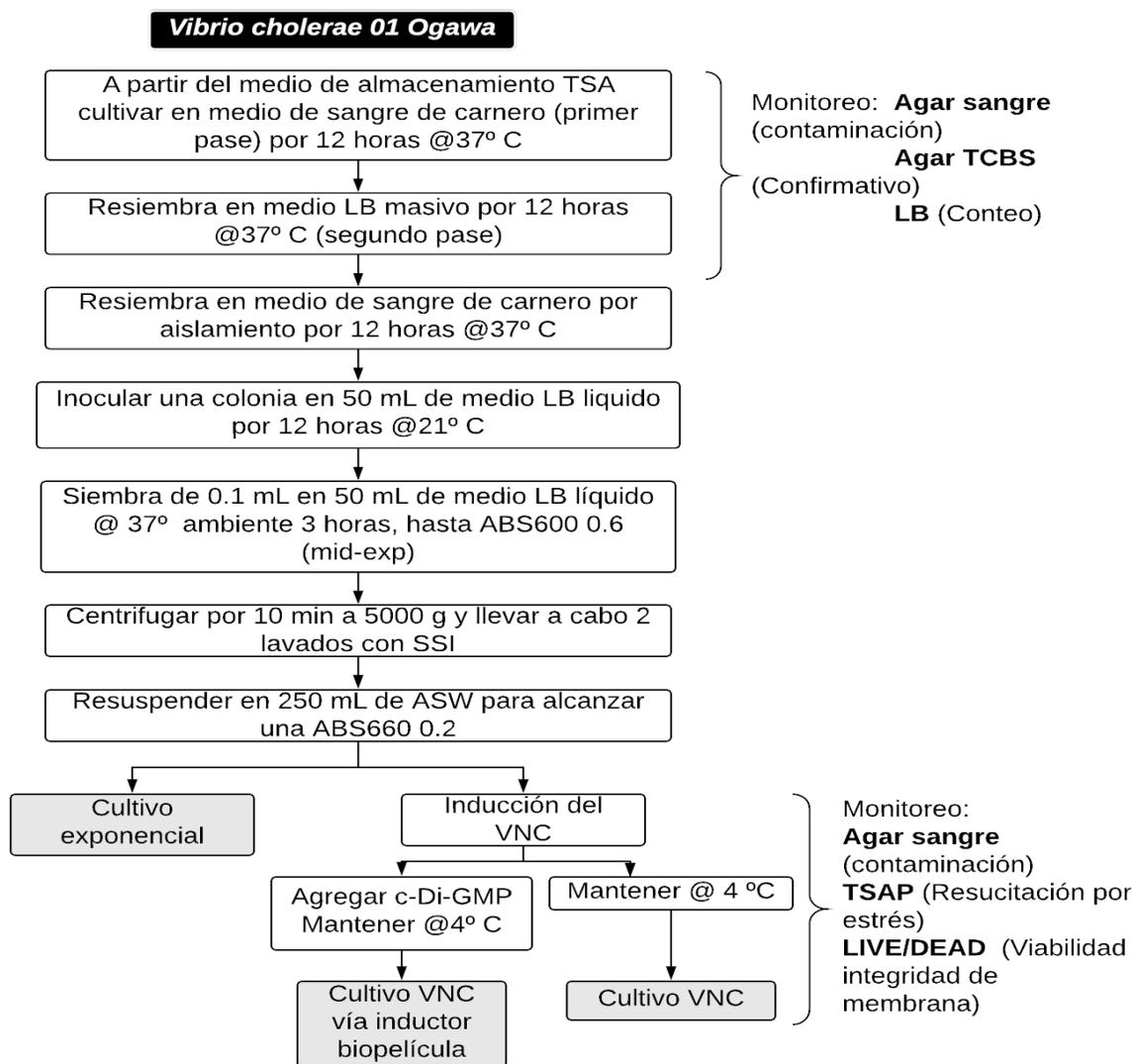
**Figura 4.1** Cultivo e inducción de *H.pylori*

La dosis mínima infectiva publicada para monos Rhesus por *H. pylori* es de alrededor de  $10^4$  UFC/mL (Solnick et al., 2001), pero se ha detectado la presencia

de *H. pylori* en biopelículas de 10 y 30 meses de antigüedad con una concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> y  $2.5 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente (Linke et al., 2010). A partir de estas concentraciones se propuso trabajar con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para la prueba de detección en agua de pozo, debido a que es una concentración cercana a lo que se podría encontrar en los sistemas de distribución de agua. Para el experimento de desinfección se trabajó con una suspensión de *H.pylori* ajustada a una  $ABS_{660}$  de 0.6 que equivale a una concentración en la escala de McFarland de 3, lo cual corresponde aproximadamente a  $9 \times 10^8$  UFC/mL, sin embargo en el caso de las formas VNC no se puede hablar de UFC por lo que se utilizó únicamente el valor de la absorbancia.

#### 4.1.2 *V. cholerae*, Cultivo e inducción del estado VNC

En la figura **Figura 4.2** se muestra el diagrama de flujo del cultivo e inducción de la bacteria *V. cholerae*.



**Figura 4.2** Cultivo e inducción de *V. cholerae*

La dosis mínima infectiva publicada para *V. cholerae* es de alrededor de  $10^4$  - $10^6$  UFC/mL (KOTHARY and BABU, 2001). En muestras de agua se ha encontrado  $10^3$  UFC/mL (Johnson et al., 2010). A partir de estas concentraciones se propuso trabajar con una concentración desde  $1 \times 10^6$  UFC/mL para la prueba de detección en agua de pozo, debido a que es una concentración cercana a lo que se podría encontrar en los sistemas de distribución de agua. Para el experimento de desinfección se trabajó con una suspensión de *V. cholerae* ajustada a una  $ABS_{660}$

de 0.6 que involucra una concentración en la escala de Mc Farland de 3, lo cual corresponde aproximadamente a  $9 \times 10^8$  UFC/mL, sin embargo en el caso de las formas VNC no se puede hablar de UFC por lo que se utilizó únicamente el valor de la absorbancia.

#### 4.1.3 Cultivo de bacterias viables de *V. cholerae*

Los cultivos bacterianos se realizarán a partir de microorganismos aislados y previamente caracterizados, los cuales fueron proporcionados por el área de microbiología del departamento de infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Las cepas que se utilizaron fueron: *Vibrio cholerae* 01 Ogawa El tor aislada del brote en agua de pozo en 2014 en Huejutla Hidalgo. El medio de aislamiento es TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) y el medio de cultivo es McConkey, el medio para el conteo y medición de la disminución de la viabilidad es LB (Luria Bertani) y el medio para resucitar bacterias dañadas es TSAP (Agar de soya tréptico adicionado con piruvato de sodio).

#### 4.1.4 Inducción del estado viable no cultivable en agua de mar

La inducción del estado viable no cultivable se realizó en una solución salina similar al agua de mar (ASW), con la composición que se muestra en la **Tabla 4.1**. Los cultivos se mantuvieron a 4°C.

**Tabla 4.1.** Composición de agua de mar artificial (Moore et al., 2007)

Componente	Concentración final (mM)	Masa molecular (g/mol)	Concentración (g/L)
NaCl	481	58.4	28.09
MgSO <sub>4</sub>	28	120.4	3.37
MgCl <sub>2</sub>	27	95.2	2.57
CaCl <sub>2</sub> - 2 H <sub>2</sub> O	10	147.0	1.47
KCl	9	74.5	0.67

\* La solución debe ser filtrada (0,22 micras) o esterilizada para evitar contaminación

#### 4.1.5 Inducción del estado viable no cultivable por medio de C-di-GMP

Para llevar a cabo la inducción vía el señalizador C-di-GMP se siguió la metodología para la inducción en agua de mar artificial pero en este caso se adicionó 0.5 mM de c-di-GMP (Plate and Marletta, 2012).

## 4.2 ETAPA 2, Biología Molecular

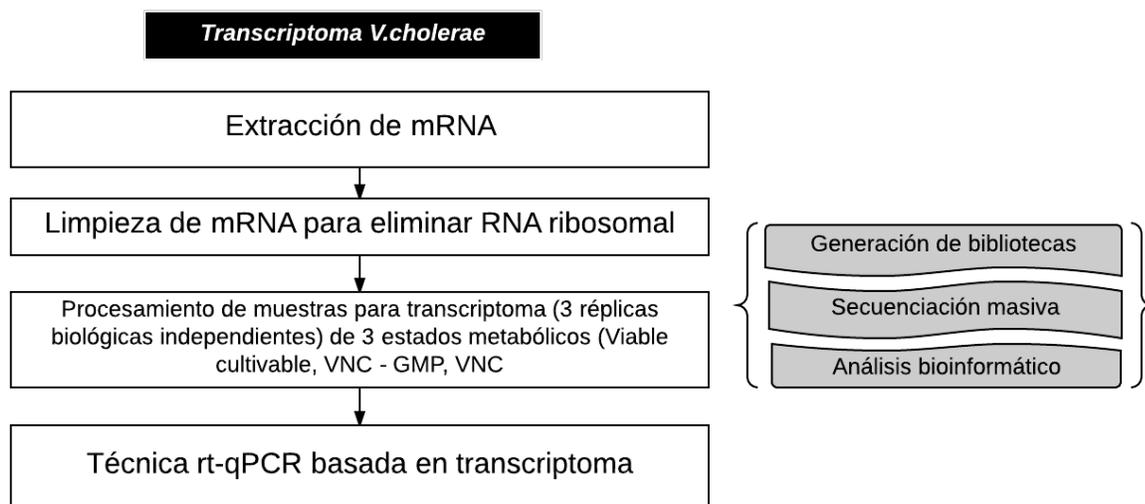
En esta etapa se trabajará con los cultivos bacterianos obtenidos de los experimentos de desinfección y se utilizarán los ácidos nucleicos (ADN y ARN) para llevar a cabo la detección y cuantificación. Esta etapa está dividida en 2, la primera consiste en la obtención del transcriptoma de *V. cholerae* y la segunda en el montaje de la técnica de detección y cuantificación por medio de qPCR-PMA (*H. pylori*) y rt-qPCR (*V. cholerae*). A continuación se muestra un diagrama de esta etapa.

### 4.2.1 Obtención del Transcriptoma de *V. cholerae*

Se utilizaron las cepas de *V. cholerae* O1 en este estudio y se obtuvo el ARN de las cepas inducidas al estado viable no cultivable por medio del inductor c-d-GMP y sin inductor, y de bacterias viables cultivables en la fase exponencial con 3 réplicas biológicas independientes.

Uno de los principales problemas en la generación de transcriptomas a partir de ARN mensajero es la eliminación del ARN ribosomal que se encuentran de manera abundante en la célula y que interfiere con el aislamiento y detección de ARNs mensajeros cuya concentración se encuentre limitada.

Para la extracción de RNA mensajero se utilizó el kit “Ribo-pure ambion” y para la purificación se utilizó en kit “Microbe express, ambion”. en la **Figura 4.3** se muestra el diagrama de flujo para la obtención del transcriptoma de *V. cholerae*.



**Figura 4.3** Diagrama de flujo para la obtención del transcriptoma de *V. cholerae*

#### 4.2.1.1 Generación de bibliotecas y secuenciación masiva paralela.

Una vez enriquecida la muestra, el ARN es fragmentado con RNasa III, purificado para posteriormente unir adaptadores a los extremos de cada fragmento. Después se llevará a cabo una reacción de transcripción inversa y posterior amplificación para obtener una biblioteca de cDNA que represente los transcritos, pero también en el sentido de transcripción. Cada uno de estos fragmentos se secuenció en el equipo Ion Torrent proton.

#### 4.2.1.2 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los datos generados representa uno de los aspectos más importantes en el análisis de transcriptomas. Como primer paso, las lecturas ("reads") obtenidas directamente del secuenciador son analizadas para eliminar las secuencias con mala calidad, repetidas y de longitud muy corta, y las restantes fueron primero alineadas al genoma ribosomal debido a que aún utilizando un kit de purificación no se logra eliminar por completo todas las secuencias del RNA ribosomal.

Las lecturas restantes fueron alineadas a los cromosomas I y II de *V. cholerae* N16961 (números de acceso NC\_002505 RefSeq y NC\_002506). Esta estrategia

nos permitió, por un lado, reducir la complejidad de la búsqueda de homólogos, y por otro lado, evitar el ensamblaje erróneo y la producción de secuencias quiméricas. La metodología de RNA-Seq permite la cuantificación de los transcritos.

Una vez que se han obtenido los transcritos para las bacterias, se realizará un análisis para determinar las diferencias entre cada uno de ellas en cuanto a expresión génica. Se compararán los resultados de los transcritos en ambos estados, VNC y fase de crecimiento logarítmica, para determinar qué transcrito nos definiría el estado VNC (Mandlik et al., 2011).

Para la realización de los estudios transcriptómicos se utilizó el programa NOIseq, el cual es un recurso integral que satisface las necesidades para un análisis robusto y consciente de los datos de la expresión diferencial de RNA-seq.

Se buscó la máxima diferencia que se encontrara entre los estados metabólicos analizados. Se seleccionó gen con más diferencia en expresión y se diseñaron los primers y la sonda para ese gen.

#### ***4.2.2 Detección y cuantificación por rt-qPCR (V. cholerae)***

Para la adaptación de la técnica de detección y cuantificación por medio de qPCR se seguirá la siguiente metodología.

Con la secuencia obtenida del transcriptoma se generaron los primers y la sonda específicas y se llevó a cabo primero la extracción de RNA por medio del kit “RNeasy” seguida de una digestión del DNA contaminante por medio de la DNase I.

La detección y cuantificación se realizó con un equipo de PCR tiempo real marca Applied Biosystems Fast 7500, con la enzima SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum Taq. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y se utilizó un control positivo con ADN puro correspondiente a *V. cholerae*, un control negativo (*H. pylori*). La cuantificación de la expresión se llevó a cabo comparando los controles con qPCR y rt-qPCR.

Se llevó a cabo la estandarización de la mezcla de reacción variando concentración de sonda y cebadores y manteniendo fija la concentración de ADN templado. También se realizó con los *primers* y la sonda fija y moviendo la cantidad de ARN.

El gen al que se generó la técnica de detección rt-qPCR fue:

Aminoimidazole riboside kinase

Accesión number NP\_233045.1

Refseq number WP\_001882506.1

Las secuencias de los *primers* y sondas utilizados se muestran en la tabla **Tabla 4.2**.

**Tabla 4.2** Secuencias de los primers y sondas para detección de *V.cholerae*

<b>HpyF (25nm)</b>	5' CAGTTTCTAACCGGGACTCAG 3'
<b>HpyR (25nm)</b>	5' CCTTGCCCGACACAATTTG 3'5'
<b>HpyP (10nm)</b>	(6FAM) AGAGGGATCTGGAAGTCAGCTATCGC (BHQ1) 3'

La secuencia del termociclador fue la siguiente:

*1° etapa, 1 ciclo de 30 min @50°C*

*2° etapa, 1 ciclo de 2 min @95°C*

*3° etapa, 45 ciclos de 0:15 segundos @95°C y una extensión de 1 minuto @60°C*

La química de los ensayos de rt-qPCR y qPCR fue la siguiente:

RT-qPCR		qPCR	
1x	μL	1x	μL
H2O	3.5	H2O	4.5
Master Mix (2X)	12.5	Master Mix (2X) Platinum	12.5
Primer F	1	Primer F	1
Primer R	1	Primer R	1
Sonda P	1	Sonda P	1
Superscript III Plat	1	DNA	5
RNA	5	ROX	0.1
ROX	0.1		
25		25	

#### 4.2.3 Detección y cuantificación por qPCR (*H. pylori*)

La detección de *H.pylori* se realizó con la extracción de DNA la cual se hizo en el equipo NucliSENS® easyMAG®, y se checó la calidad del DNA por medio de la relación 260/280 por medio de un equipo “nano drop” y “Qbit”. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

Para la implementación de la técnica de qPCR fue necesario probar la reacción general completa con los cebadores y la sonda. Una vez obtenidas las señales positivas, se realizó una prueba de concentraciones para detectar los intervalos de amplificación de la reacción y para asegurarse de trabajar con las concentraciones de reactivos ideales, esto se realizó probando una serie de concentraciones de cebadores, sondas y DNA. Después se probó la obtención de las curvas estándar y finalmente se probó con muestras del procesos de desinfección.

Se utilizó las siguientes secuencias de cebadores y sonda de tipo TaqMan específicas para la subunidad ureA del gen urea; debido a que ha sido reportado como altamente específica (McDaniels *et al.*, 2005) y no muestra homologías cruzadas con bacterias relacionadas o subespecies de *Helicobacter*.

Las secuencias de los *primers* y sondas utilizados se muestran en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3** Secuencias de los primers y sondas para detección de *H. pylori*

<b>HpyF (25nm)</b>	GGGTATTGAAGCGATGTTTCCT
<b>HpyR (25nm)</b>	GCTTTTTTGC- CTTCGTTGATAGT
<b>HpyP (10nm)</b>	6FAM- AAACCTCGTAACCGTGCATACCCCTATTGAG-TAMRA

Las condiciones utilizadas en el equipo de PCR fueron; 10 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

La mezcla de reacción incluyó los siguientes elementos:

<b>qPCR 1x</b>	<b>μL</b>
H2O	4.5
Master Mix (2X) Platinum	12.5
Primer F	1
Primer R	1
Sonda P	1
DNA	5
ROX	0.1
	<b>25</b>

#### 4.2.4 Ensayo de viabilidad con PMA

Se utilizó el colorante Monoazida de propidio Biotum(PMA) con una concentración de 20 mM almacenada a -20 ° C en la oscuridad.

Se tomó 1μL de PMA y se añadió a 200 μL del cultivo celular en tubos de micro centrífuga de 1.5 ml. Se dejó en incubación de 5 minutos en la oscuridad, agitando de vez en cuando las muestras. Después las muestras fueron expuestas a la luz durante 5 minutos con una lámpara halógena de 650 W.

Las muestras en los tubos fueron colocadas en posición horizontal sobre hielo (para evitar el calentamiento excesivo) y se colocaron a alrededor de 20 cm de la fuente de luz, después de foto inducidas las células se procedió con la extracción de DNA.

4.2.5 Curvas estándar para qPCR

La generación de las curvas estándar se llevó a cabo de la siguiente forma:

Conociendo el tamaño del genoma de *Helicobacter pylori* (n=1,667,867 pb).

Conociendo la masa del DNA, multiplicando por el peso en gramos de un par de bases

$$m = n \cdot x$$

$$x = 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp}$$

$$m = 1,667,867 \text{ pb} \cdot 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp}$$

$$m = 1.82798 \times 10^{-15} \text{ g}$$

Dividiendo la masa del genoma por el número de copias de la secuencia de interés en el genoma de *H. pylori*, en este caso UreA está presente una vez.

$$1.82798 \times 10^{-15} \text{ g} \left( \frac{1 \times 10^{12} \text{ pg}}{1 \text{ g}} \right) = 0.001828 \text{ pg}$$

$$\frac{0.001828 \text{ pg}}{1 \text{ copia de ureA}} = \left( \frac{0.001828 \text{ pg}}{\text{genoma}} \right) \left( \frac{\text{genoma}}{1 \text{ copia}} \right) = \frac{\text{pg}}{1 \text{ copia}}$$

Se realizó la curva estándar con 5 puntos correspondientes a 5 diluciones decimales, las cuales se multiplicaron por el peso del genoma por copia y se obtuvo la cantidad de DNA que se necesitó para obtener dicha curva. La concentración final se obtuvo dividiendo la masa de DNA necesaria entre 5 µL (volumen de DNA en la reacción de qPCR). La concentración de la curva estándar se muestra en la (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Tabla de cálculo de la concentración final de DNA, para obtener una curva estándar de 5 puntos.

<b>copias</b>	<b>Masa de ADN necesaria (g)</b>	<b>Concentración final (µL)</b>
<b>3x10<sup>6</sup></b>	5.48x10 <sup>3</sup>	1096.78
<b>3x10<sup>5</sup></b>	548.39	109.67
<b>3x10<sup>4</sup></b>	54.83	10.967
<b>3x10<sup>3</sup></b>	5.48	1.0967
<b>3x10<sup>2</sup></b>	0.54	0.1096

Ejemplo de cálculo de la la (**Tabla 4.4**).

$$3 \times 10^6 * 0.001828 \text{ pg} = 5.48 \times 10^3$$

$$\frac{5.48 \times 10^3 \text{ g de DNA necesarios}}{5 \mu\text{L de DNA de reacción}} = 1096.78 \text{ g de DNA necesarios}$$

Calcular el volumen de DNA necesario para obtener las distintas diluciones esperadas.

A partir de una extracción de DNA, se obtiene por medio de densidad óptica la concentración de material genético en  $\mu\text{g/mL}$ . Si ésta concentración es alta ( $>10$ ) se realiza una dilución 1:10 para crear una solución stock diluida. (10 en 90).

En este ejemplo la concentración de DNA de la extracción fue:

$$16.47 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0.01647 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

$$\text{Dilución 1:10} = 0.001647 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} = 1647 \frac{\text{pg}}{\mu\text{L}}$$

**Tabla 4.5.** Tabla de cálculo de  $\mu\text{L}$  de DNA para preparar la curva estándar.

Dilución	fuerce de Dna	C1, inicial (pg/ $\mu\text{L}$ )	V1 gDNA, ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de diluyente, ( $\mu\text{L}$ )	V2, ( $\mu\text{L}$ )	C2 Final de dilución, (pg/ $\mu\text{L}$ )	Número de copias resultantes del gen UreA/5 $\mu\text{L}$
1	stock	1647	66.59	33.40	100	1096.789339	3.00E+06
2	D1	1096.789339	10	90	100	109.6789339	300000
3	D2	109.6789339	10	90	100	10.96789339	30000
4	D3	10.96789339	10	90	100	1.096789339	3000
5	D4	1.096789339	10	90	100	0.109678934	300

Ejemplo de cálculo de la **Tabla 4.5** (Volumen final del dilución 100  $\mu\text{L}$ )

$$\frac{\frac{1096.78 \text{ pg}}{\mu\text{L}} * 100 \mu\text{L}}{1647 \frac{\text{pg}}{\mu\text{L}}} = 66.59 \mu\text{L}$$

$$100 \mu\text{L} - 66.59 \mu\text{L} = 33.4068 \mu\text{L}$$

Por lo tanto para preparar la solución stock se realizó una dilución 1:10 del DNA y se tomó 67  $\mu\text{L}$  de solución stock y 33  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. A partir de esta se tomó 10  $\mu\text{L}$  de solución y se diluyó en 90  $\mu\text{L}$ , hasta obtener las 5 diluciones.

En la siguiente dirección de internet de la marca Thermofisher es posible hacer los cálculos. Se debe modificar la masa molar a 660 g/mol/bp. Se debe poner el tamaño del genoma del organismos de interés y se debe seleccionar custom DNA fragment. La concentración desdeada se deberá multiplicar por 5 ya que en la reacción de PCR se utilizan 5  $\mu\text{L}$  (Último acceso Julio 2017). En la **Figura 4.4** se muestran los valores que deben ser introducidos para obtener los valores de concentración de ADN en una muestra.

<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>

**ThermoFisher SCIENTIFIC** Search All Search Contacto Sign In Orden Rápida

## DNA Copy Number and Dilution Calculator

This calculator provides instructions on how to dilute a DNA stock solution to obtain specific DNA copy number per  $\mu\text{L}$ .

1. If you know that the weight of your DNA (molar mass per bp) is different from the average weight of DNA basepair, change the value. Otherwise just use the default value.
2. Choose the organism your DNA originates from, or choose "Custom DNA fragment". If you choose a custom fragment, fill in the length of the fragment.
3. Fill in the measured concentration of your stock solution.
4. Fill in the desired concentration (copies/ $\mu\text{L}$ ) and volume.

The application will automatically calculate the pipetting volumes required for the desired dilution.

Molar mass per base pair:  (g/mol)/bp

Custom DNA fragment

Fragment length (nt):

Molar mass(g/mol):

Copies/ng:

*Escherichia coli*  
 Bacteriophage lambda  
 *Drosophila melanogaster*  
 *Homo sapiens* (human)  
 Custom DNA fragment

---

Stock solution

Measured concentration (ng/ $\mu\text{L}$ ):

Copies/ $\mu\text{L}$  in stock:

**Figura 4.4.** Calculadora de copias genómicas de Thermofisher

### 4.2.6 Ensayo de viabilidad con colorante LIVE/DEAD

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad por medio de colorantes fluorescentes se utilizaron el cultivos de *H.pylori* y de *V.cholerae* y se generaron las respectivas curvas de calibración, las cuales cuales consistieron en dos suspensiones de bacteria, la primera obtenida de la fase exponencial y la cual sería el control de 100% de viabilidad y una suspensión tratada con etanol puro durante una hora y en agitación, la cual representó el valor de 0% de viabilidad. A partir de estas dos suspensiones se crearon puntos intermedios como se muestra en la (**Tabla 4.6**).

Se utilizó un fluorómetro marca BIORAD versafióor y se utilizaron los filtros de emisión (510/10 nm) y de excitación (480/20 nm). Para 1 mL de muestra se agregó 3  $\mu\text{L}$  de la mezcla de colorantes (1-5  $\mu\text{L}$  de SYTO9 y 1.5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (PI). Una vez actuando la mezcla de colorantes se dejó incubar en la oscuridad por 15 minutos y luego fue leída la intensidad de fluorescencia. En algunos casos

también se observó al microscopio de fluorescencia. Un control blanco fue medido cada vez el cual era agua destilada.

**Tabla 4.6.** Ensayo para obtener la curva estándar del colorante LIVE/DEAD

Tubo	Bacteria 100% viable (mL)	Bacteria 0% viable (mL)
1	1	0
2	0.8	0.2
3	0.6	0.4
4	0.4	0.6
5	0.2	0.8
6	0	1

### 4.3 ETAPA 3, Prueba en agua de pozo

Para comprobar que las técnicas de detección y cuantificación molecular funcionan de manera correcta y no presentan interferencias en matrices de agua real, se deberá probar utilizando agua de fuentes reales tomando en cuenta realizar el muestreo en zonas donde se pueda encontrar *V. cholerae* y *H. pylori*.

Para saber si existía interferencia en la muestra de reacción se utilizó un kit de control interno TaqMan® Exogenous internal Positive control reagents, para el cual se utilizó la siguiente reacción, con un volumen final de 25 µL:

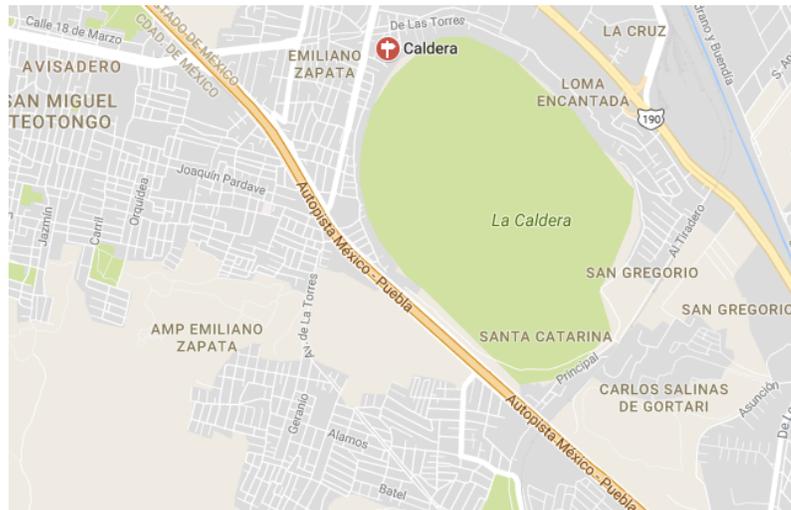
qPCR	µL
Taq Man master mix 2x	12.25
Exo IPC 10X MIX	2.5
Exo IPC DNA 50X	0.5
Primer HpyF (5µM)	0.25
Primer HpyR (5µM)	0.25
Sonda (400 nM) HpyP1	0.25
H2O	4
DNA	5
	<b>25</b>

Se realizaron dos muestreos, el primero se realizó en la ciudad de Huejutla Hidalgo, una población a 336 km de la Ciudad de México y en donde se presentó el brote de cólera en 2013. En la **(Figura 4.5)** se muestra la ubicación del la región de estudio.



**Figura 4.5.** Huejutla Hidalgo, Huasteca

El segundo muestreo se realizó en el pozo “La Caldera” el cual abastece a la zona poniente de Ciudad Nezahualcóyotl. En la **(Figura 4.6)** se muestra la ubicación de la planta de tratamiento “la caldera”.



**Figura 4.6.** Ubicación del pozo “La Caldera”

Los parámetros medidos se muestran en la lista a continuación y están basados en la NOM-127-SSA-1994, sin embargo, los inhibidores más importantes de la técnica de qPCR son: la concentración de sales (NaCl), materia orgánica, ácidos húmicos y fúlvicos. Por esta razón los parámetros marcados con asterisco fueron los de mayor relevancia:

- Cloro residual
- Nitritos
- Nitratos
- Conductividad
- Dureza\*
- Carbón Orgánico Total\*
- Turbiedad
- pH
- Temperatura
- SST
- SDT
- Coliformes fecales UFC/ 100 mL
- Coliformes totales UFC/100 mL

Se inoculó en agua de pozo con una concentración conocida de bacterias para observar la sensibilidad de la técnica. En la (**Tabla 4.7**) se muestra el número de UFC presentes en las diluciones evaluadas.

**Tabla 4.7.** Número de UFC/mL presentes en las diluciones de la prueba de agua de pozo

Dilución	Número de UFC/mL
0	$1 \times 10^6$
1	$1 \times 10^5$
2	$1 \times 10^4$
3	$1 \times 10^3$
4	$1 \times 10^2$

#### **4.4 ETAPA 4, Desinfección con cloro y ozono**

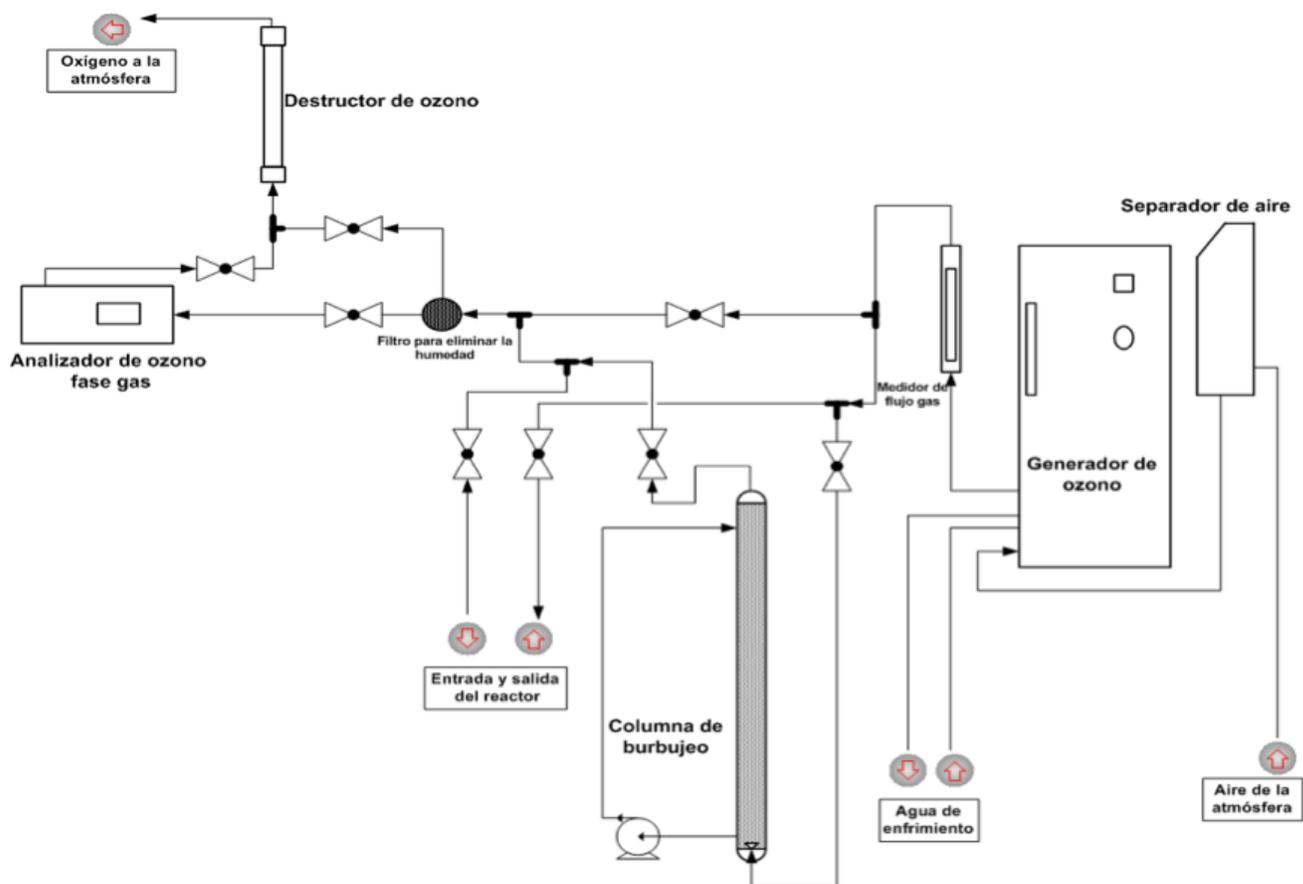
Se llevó a cabo la desinfección con cloro (hipoclorito de sodio NaClO) y con ozono disuelto en agua. Para obtener las condiciones óptimas de desinfección se realizaron pruebas preliminares que incluyeron el análisis de la demanda inicial de desinfectante al entrar en contacto con la solución bacteriana, así como los análisis de decaimiento de la concentración tanto de cloro libre como de ozono residual. A continuación se detalla la metodología seguida tanto para ozono como para cloro.

##### **4.4.1 Desinfección con Ozono**

La obtención de agua saturada de ozono, se produjo con un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con una capacidad de producción de 1.9 g de O<sub>3</sub>/h. Se utilizó un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA) que concentra el oxígeno hasta en un 80% (v/v), y una unidad de destrucción catalítica de ozono (PCI OZONE & CONTROL SYSTEMS INC, Fairfield Crescent, Westalwell NJ 07006) donde el excedente de ozono es transformado nuevamente a oxígeno para poder ser liberado en forma segura al ambiente.

Se utilizó una columna de burbujeo de vidrio de 2 L de volumen con un diámetro de 5.5 cm de diámetro interno, el cual fue previamente lavado y desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 20% y posteriormente enjuagado con agua destilada.

Se llenó la columna con 1 L de agua destilada y se suministró al reactor el ozono mediante un difusor de gas de vidrio poroso (10 µm de tamaño de poro), a una concentración aproximada de 35 mg/L, con un flujo de 0.4 L/min y se dejó burbujear por 15 minutos para estabilizar la generación. En la (**Figura 4.4**) se muestra un diagrama del sistema de generación de agua saturada en ozono.

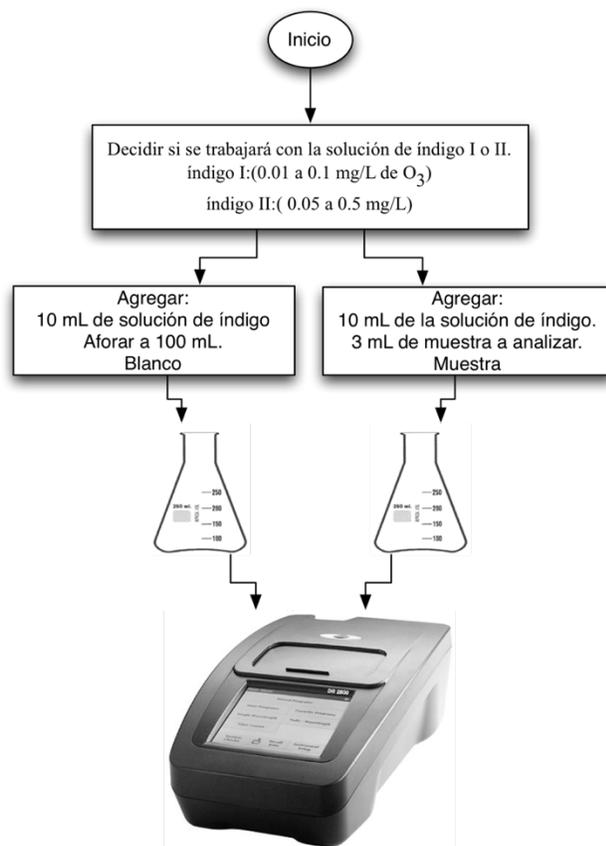


**Figura 4.7.** Diagrama de generación de ozono

#### 4.4.1.1 Metodología para la medición de la concentración de ozono en fase líquida

Para la medición de ozono en fase líquida se utilizó el método colorimétrico de índigo (Bader & Hoigné, 1985): Este método relaciona la disminución de la absorbancia con el incremento de la concentración de ozono, debido a que el ozono actúa sobre el reactivo de índigo decolorando la solución, pasando de una solución color azul a una incolora. La disminución de absorbancia fue determinada mediante un espectrofotómetro (HACH DR2800) a una longitud de onda de 600 nm (AWWA, 1992).

La solución madre de índigo que se utilizó se preparó de acuerdo a (Bader & Hoigné, 1985), y el procedimiento para tomar lectura de las muestras se detalla en la (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Diagrama de flujo para medición de ozono residual en fase líquida.

#### 4.4.1.2 Pruebas de desinfección

Una vez alcanzada una concentración residual entre 3-5 mg/L dentro de la columna de burbujeo, se tomó 900  $\mu\text{L}$  de la solución stock de ozono y 100  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana.

El experimento se realizó de 2 formas, en la primera, las muestras se dejaron por un periodo de tiempo correspondiente para crear un CT (concentración\* tiempo)

específico para cada experimento, y en la segunda se modificó el CT aumentando la concentración, pero dejando las muestras durante 1 minuto.

Al finalizar se le agregó 1 mL de una solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Tiosulfato de sodio) esterilizada para detener la reacción de oxidación, durante un tiempo de contacto de 1 minuto. Los valores de CT que se probaron en este proyecto se muestran en la (Tabla 4.8):

**Tabla 4.8.** Tabla de cálculo de µL de DNA para preparar la curva estándar

CT (mg min/ L) <i>H. pylori</i>	CT (mg min/L) <i>V. cholerae</i>
0	0
0.2	0.5
0.4	1
0.6	1.5
1.5	7.5
3	18
4	
5	
6	
8	
10	

#### 4.4.2 Desinfección con Cloro

La desinfección con cloro se llevó a cabo utilizando hipoclorito de sodio NaClO al 15% y se realizaron diluciones para alcanzar una concentración de cloro libre de 1-5 mg/L. Para llevar a cabo la medición del cloro libre se utilizó un equipo HACH test kit 58700-00 y utilizando sobres de cloro libre DPD (HACH cat. 21055-69).

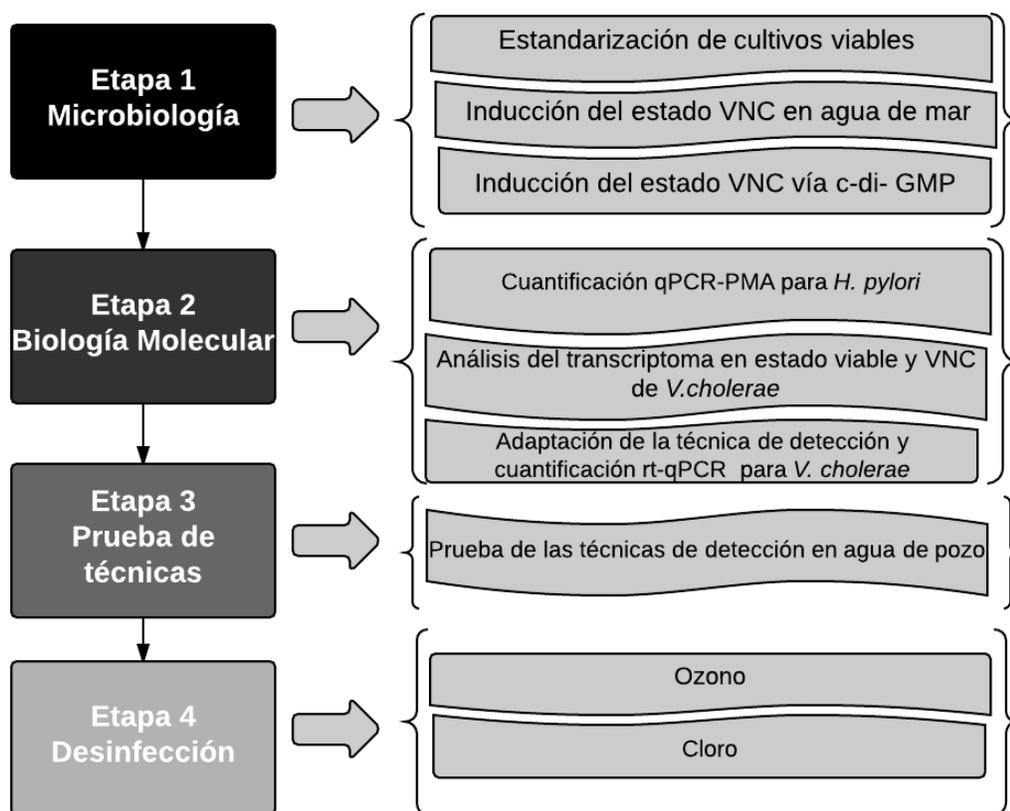
##### 4.4.2.1 Pruebas de desinfección

Para llevar a cabo las pruebas de desinfección se tomó 900 µL de la solución stock de cloro y 100 µL de la solución bacteriana.

El experimento se realizo de 2 formas, en la primera, las muestras se dejaron por un periodo de tiempo correspondiente para crear un CT (concentración\* tiempo) específico para cada experimento, y en la segunda se modificó el CT aumentando la concentración, pero dejando las muestras durante 1 minuto.

## 5 resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación serán presentados de acuerdo a las etapas en las que se dividió el proyecto y las cuales se muestran a continuación:



**5.1 Etapa 1, Microbiología *Helicobacter pylori***

A continuación se muestran los resultados obtenidos del cultivo e inducción de *H. pylori*:

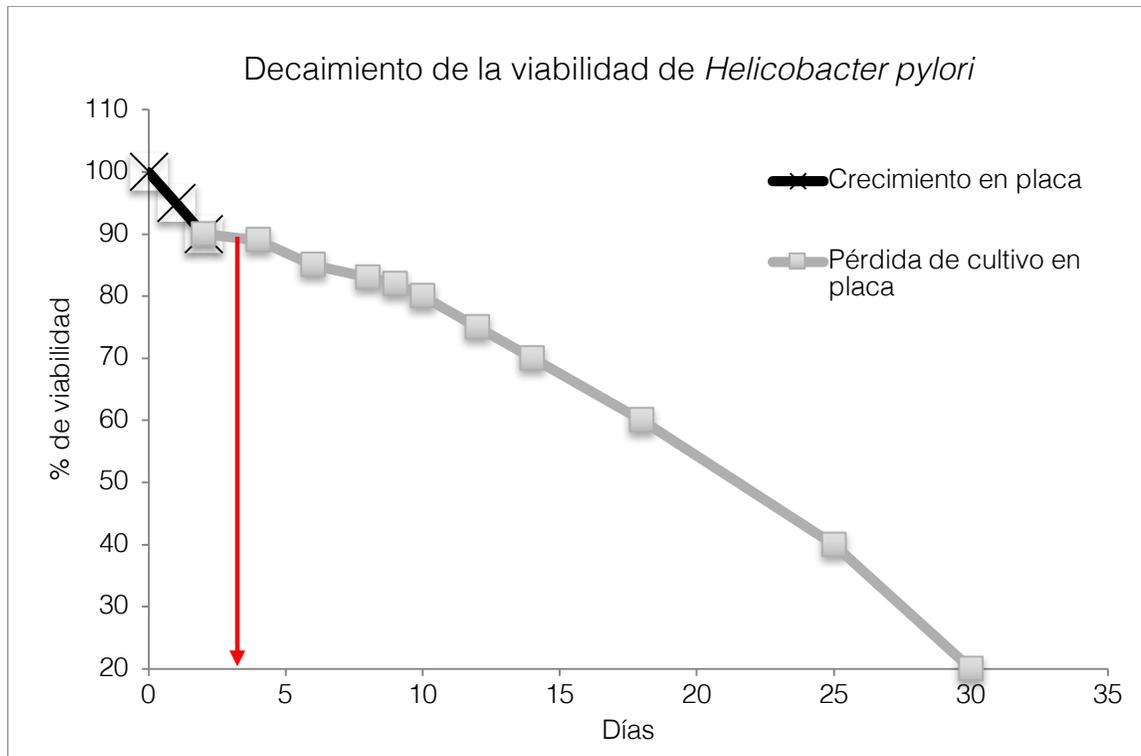
Resultados	
Cultivo	48-72 h
Medio	BHI con sangre de carnero
Inducción al estado VNC (Medio)	Solución Salina Isotónica
Inducción al estado VNC (Condiciones)	Temperatura ambiente
Inducción al estado VNC (Tiempo)	2 días de cultivo en placa
Condiciones óptimas para trabajar el VNC	4-5 día
Mantenimiento de viabilidad	30 días de viabilidad

En la (**Figura 5.1**) se muestran imágenes de las colonias de *H. pylori* en forma bacilar, estas colonias fueron recogidas y suspendidas en solución salina isotónica e inducidas a la forma cocoide a temperatura ambiente.

Para asegurarnos de trabajar con más del 80% de las bacterias en forma cocoide se realizaron frotis por medio de tinciones de tipo Gram para monitorear la morfología de la suspensión. También se midió la viabilidad mediante la intensidad de la fluorescencia usando el colorante LIVE/DEAD, los resultados se muestran en la (**Gráfica 5.1**).

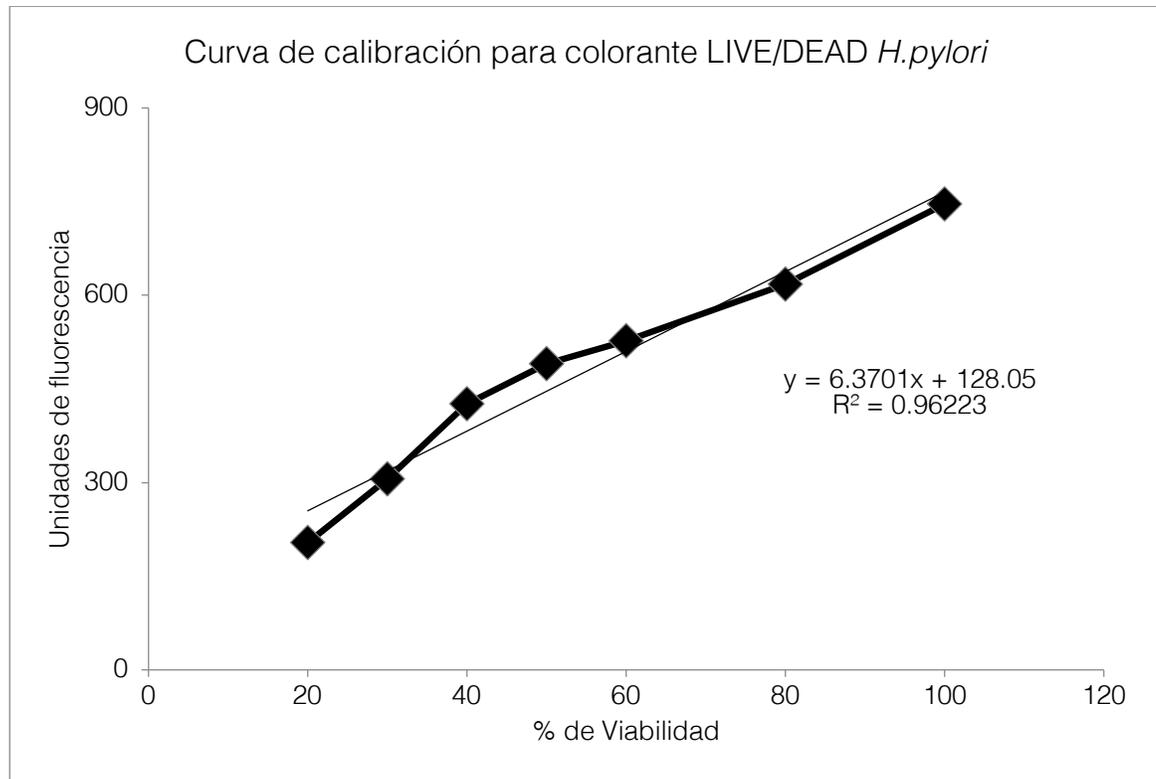


**Figura 5.1.** Imágenes de siembra en placa de *H. pylori*.



**Gráfica 5.1** Viabilidad de *H.pylori* y momento óptimo para trabajar con el estado VNC

*H.pylori* es una bacteria de difícil crecimiento por sus requerimientos de crecimiento como un ambiente microaerófilico y la necesidad de trabajar en agar sangre de carnero. La inducción al estado VNC mostró que el mejor día para trabajar con la bacteria es entre el 3<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> día de la inducción como se muestra en el (gráfica 1). Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron dos suspensiones una completamente viable y una inactivada con etanol puro y se construyeron 7 combinaciones de concentraciones, los resultados se observan en la (**Gráfica 5.2**).



**Gráfica 5.2** Curva de calibración para *H.pylori*

### 5.1.1 Estandarización de cultivos viables e inducción del estado VNC de *H. pylori*

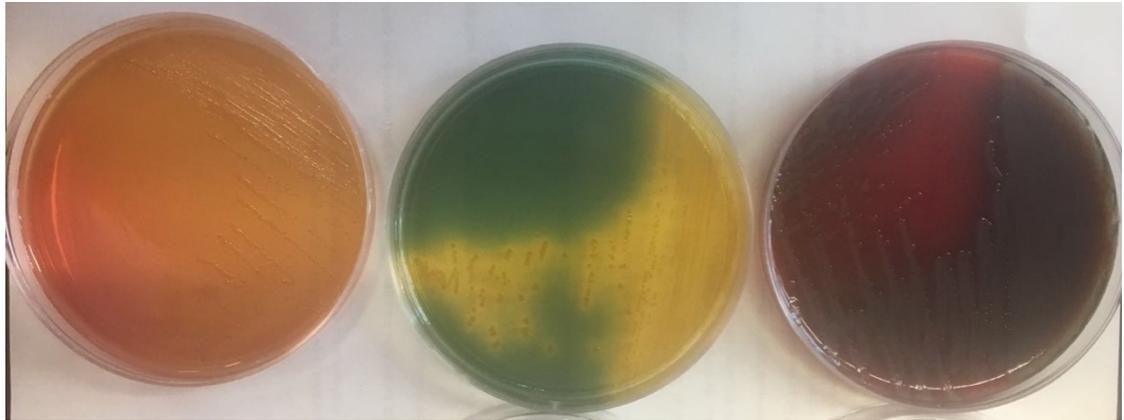
- Se obtuvo el cultivo de *H.pylori* en 48 horas
- La inducción al estado VNC se alcanzó a los 3 días, siendo el 5 día el mejor para trabajar con la bacteria en dicho estado
- La bacteria permanece viable en una suspensión salina isotónica por 30 días
- Es una bacteria de difícil crecimiento con condiciones muy específicas lo cual dificulta su manipulación.
- Bacteria con alto potencial de transmisión acuática, debido a la contaminación de fuentes de agua por materia fecal
- El kit LIVE/DEAD es un eficaz colorante para seguir la viabilidad por fluorescencia

### 5.2 Etapa 1, Microbiología *Vibrio cholerae*

A continuación se muestran los resultados obtenidos del cultivo e inducción de *V. cholerae*:

Resultados	
Cultivo	24 h
Medio	LB
Inducción al estado VNC (Medio)	ASW
Inducción al estado VNC (Temperatura)	4°C
Inducción al estado VNC (Tiempo)	15-25 días
Condiciones óptimas para trabajar en el VNC	20 días
Mantenimiento de viabilidad	60 días de viabilidad

El crecimiento de *V. cholerae* se realizó en distintos medios para asegurar que no existiera contaminación en la suspensión. El crecimiento en medio TCBS ayudó a confirmar el trabajo con *V. cholerae*, el medio de sangre de carnero se utilizó para el crecimiento y el medio Mcconkey nos mostró colonias uniformes confirmando trabajar con una sola cepa bacteriana. En la (**Figura 5.2**) se muestran los medios de cultivo utilizados.

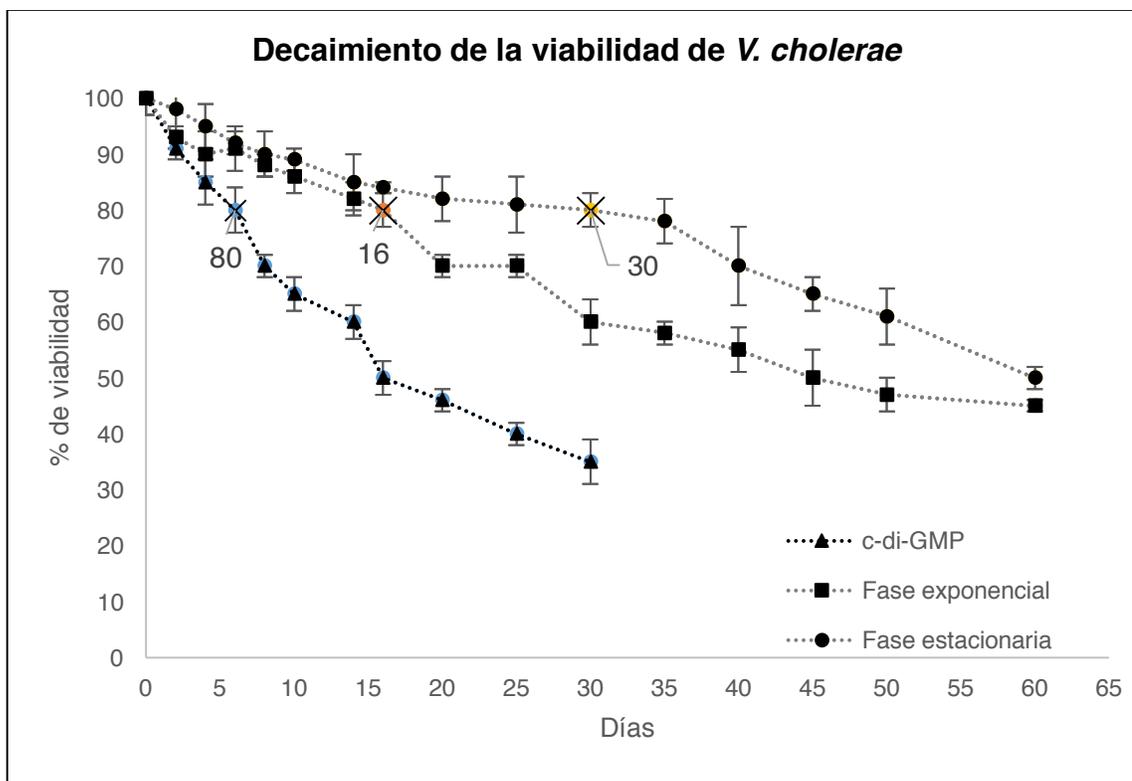


**Figura 5.2.** Cultivo de *V.cholerae* en 3 medios: Macconkey, TCBS, Sangre Carnero

El crecimiento de *V.cholerae* es fácil debido a que no requiere de condiciones especiales de temperatura o de ambiente.

Se probó la inducción con dos formulaciones de agua de mar, sin embargo la reportada por (Moore et al., 2007) dio los mejores resultados.

La inducción se llevó a cabo a partir de una suspensión de *V.cholerae* (fase exp.), (fase estacionaria) y por medio de inductor de biopelícula c-di-GMP. A continuación se muestran los tiempos de inducción obtenidos en la (Gráfica 5.3).



**Gráfica 5.3** Viabilidad de *V. cholerae* en la inducción al estado VNC por 3 métodos

Para los análisis de la viabilidad de las formas VNC de *V. cholerae* se cambió la metodología de trabajo. Se probaron cultivos de distintas etapas metabólicas de la bacteria antes de la inducción. Los resultados muestran que al tomar la bacteria en la fase logarítmica, la inducción del estado VNC se da entre 8-15 días (10 días en promedio) a comparación con el uso de una suspensión en fase estacionaria la cual tarda entre 20 y hasta 60 días (30 días promedio) en perder la capacidad de cultivo. Cuando se utilizó el inductor de biopelícula c-di-GMP se redujo a 5 días la inducción pero la viabilidad decayó de manera abrupta al día 30.

Estos resultados son de gran importancia debido a que aportan información para la inducción de la bacteria al estado VNC, por lo tanto, los ensayos pueden ser planeados y aseguran el estar trabajando con suspensiones inducidas.

### 5.2.1 Estandarización de cultivos viables e inducción de *V. cholerae* VNC

- Se obtuvo el cultivo de *V. cholerae* en 24 horas
- La inducción al estado VNC se alcanzó entre 6 y 30 días el estado metabólico (dependiendo de la fase de partida), siendo el día 10 el mejor para trabajar con la bacteria y partiendo de una suspensión en la fase logarítmica
- El cambio en la composición del agua de mar no afectó las inducciones por lo que se utilizó la que presentaba menos componentes.
- La bacteria permanece viable en una suspensión de agua de mar artificial hasta por 60 días
- El trabajo con sistemas biológicos es complejo y los resultados deben estar sustentados en al menos 3 replicas

### 5.3 Etapa 2, Biología molecular, Cuantificación qPCR-PMA

#### ***H.pylori***

La detección y cuantificación de *H. pylori* se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR-PMA. Para conocer la desviación entre el uso del qPCR y del qPCR-PMA se utilizaron las suspensiones iniciales de los experimentos de desinfección y se midieron con y sin el colorante de viabilidad PMA.

Las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación fueron las siguientes:

(Tomando en cuenta una pendiente de -3.32 como 100 de eficiencia)

Cloro:  $y = -3.83x + 42.9$ ,  $r^2 = 0.996$ , Eficiencia 82.43 %

Ozono:  $y = -3.88x + 42.28$ ,  $r^2 = 0.992$ , Eficiencia 81.02 %

Experimentos control:  $y = -3.72x + 43$ ,  $r^2 = 0.9934$ . Eficiencia 85.7 %

Los ciclos (Ct) variaron de 15-32.

***V.cholerae***

Para la detección y cuantificación de *V. cholerae* se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR-PMA y rt-qPCR.

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación por qPCR-PMA

Las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación fueron las siguientes:

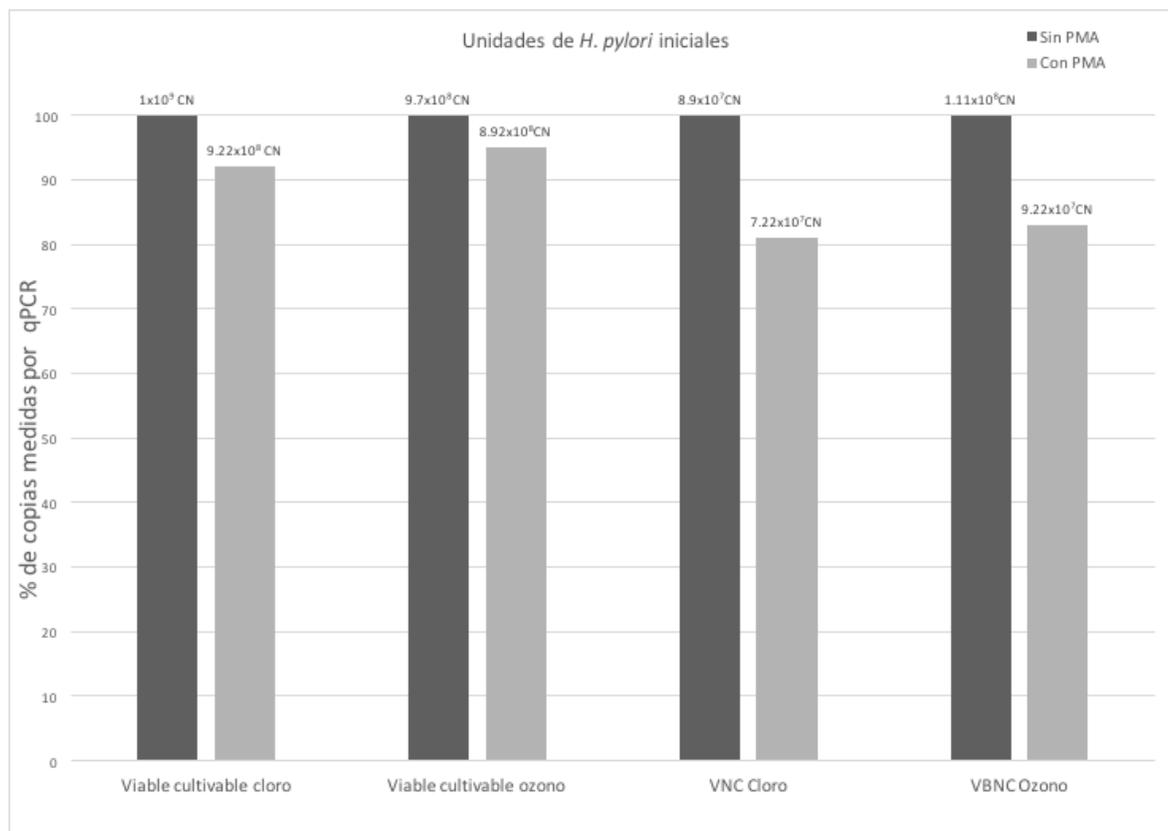
(Tomando en cuenta una pendiente de -3.32 como 100 de eficiencia)

Cloro:  $y = -3.40x + 41.02$ ,  $r^2 = 0.999$ , Eficiencia 96.84 %

Ozono:  $y = -3.39x + 40.78$ ,  $r^2 = 0.999$ , Eficiencia 97.24%

Los ciclos (Ct) variaron de 18-32.

En la (**Gráfica 5.4**) se muestran los resultados del uso del colorante de viabilidad PMA:



**Gráfica 5.4** Comparación entre el uso del colorante de viabilidad PMA y los resultados de qPCR

En la (**Tabla 5.1**) se muestran los resultados del uso de qPCR y qPCR-PMA, los cuales tuvieron eficiencias altas y fue posible detectar y cuantificar *H.pylori* antes y después del proceso de desinfección. Los resultados en la comparación con y sin el colorante mostraron una tendencia esperada ya que la técnica de qPCR detecta genomas sin importar la viabilidad de la bacteria, por lo que sin el uso del colorante se obtienen más lecturas. Estas lecturas son consideradas falsos positivos y llegan a contabilizar hasta un 23% de las lecturas.

**Tabla 5.1.** Unidades bacterianas iniciales medidas por medio de qPCR con y sin colorante PMA

	<b>Viable cultivable Cloro (UFC/mL)</b>	<b>Desv std %</b>	<b>Viable Cultivable Ozono (UFC/mL)</b>	<b>Desv std %</b>	<b>VNC* Cloro (Cel/mL)</b>	<b>Desv std %</b>	<b>VNC* Ozono (Cel/mL)</b>	<b>Desv std %</b>
qPCR	9.22x10 <sup>8</sup>	4	8.92x10 <sup>8</sup>	2	7.22x10 <sup>7</sup>	1	9.22x10 <sup>7</sup>	2
qPCR- PMA	8.01x10 <sup>7</sup>	3	7.82x10 <sup>7</sup>	3	1.69x10 <sup>7</sup>	2	1.89x10 <sup>7</sup>	2
% Falsos positivos	8.7		8.8		23.4		20.5	

\*En el caso de las bacterias VNC, éstas se cuentan como células

### 5.3.1 Etapa 2, Biología molecular, Cuantificación qPCR-PMA

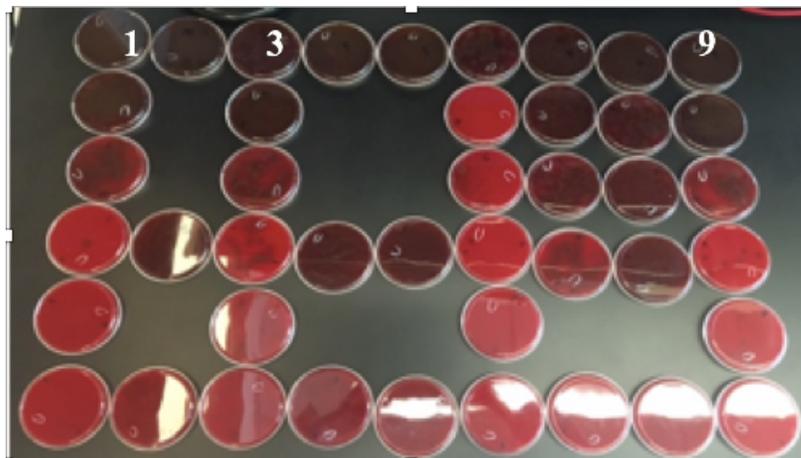
- La técnica de qPCR-PMA en comparación con qPCR es más exacta en la medición de genomas de bacterias viables (hasta 23% de diferencia en el conteo), por lo que se deberá utilizar la técnica de qPCR en combinación con un colorante de viabilidad.
- El análisis transcriptómico es un estudio de alta especificidad el cual debe tener controles estrictos de calidad de las muestras (Eliminación de DNA, purificación de RNA mensajero y réplicas biológicas).
- Solo entre el 6-24 de la muestra fue correspondiente a RNA mensajero
- Es posible utilizar el análisis transcriptómico para encontrar genes que se expresen en un estado metabólico en particular. En este estudio se encontró un gen de “aminoimidazole riboside kinase” como gen único para el estado VNC.

### 5.4 Etapa 2, Obtención de Transcriptoma de *V.cholerae*

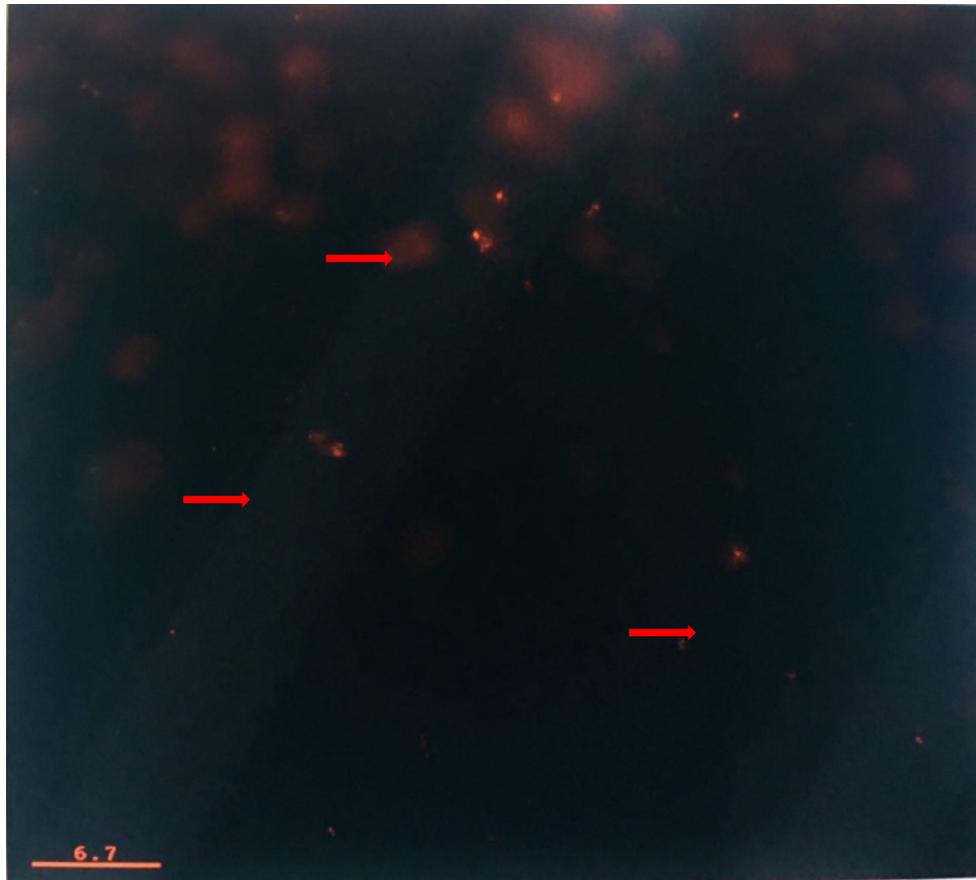
Para llevar a cabo la obtención del transcriptoma se realizaron 3 réplicas biológicas de cada condición. Las condiciones examinadas fueron: bacteria en fase mid-log, suspensión bacteriana VNC por medio de agua de mar artificial y suspensión VNC por medio de un inductor de biopelícula. Para la obtención de estas réplicas se

indujeron 9 suspensiones bacterianas y se seleccionaron las 3 suspensiones que alcanzaron condiciones de inducción similares.

En la **Figura 5.3** podemos observar como de 9 réplicas sólo 3 se comportaron de manera similar, por lo que se escogió la réplica 1,2,9. Esto no indica que los sistemas biológicos difieren de manera muy significativa aun trabajando con las mismas condiciones por lo que se justifica el uso de 3 réplicas para la obtención de transcriptomas. También se utilizó el colorante CTC que mide respiración celular para estar seguros que la suspensión bacteriana estuviera viable no solo por integridad de membrana (Live/Dead) si no también por respiración celular. En la **Figura 5.4** se observa una imagen del microscopio confocal donde se observa en rojo las bacterias viables de las suspensiones inducidas.

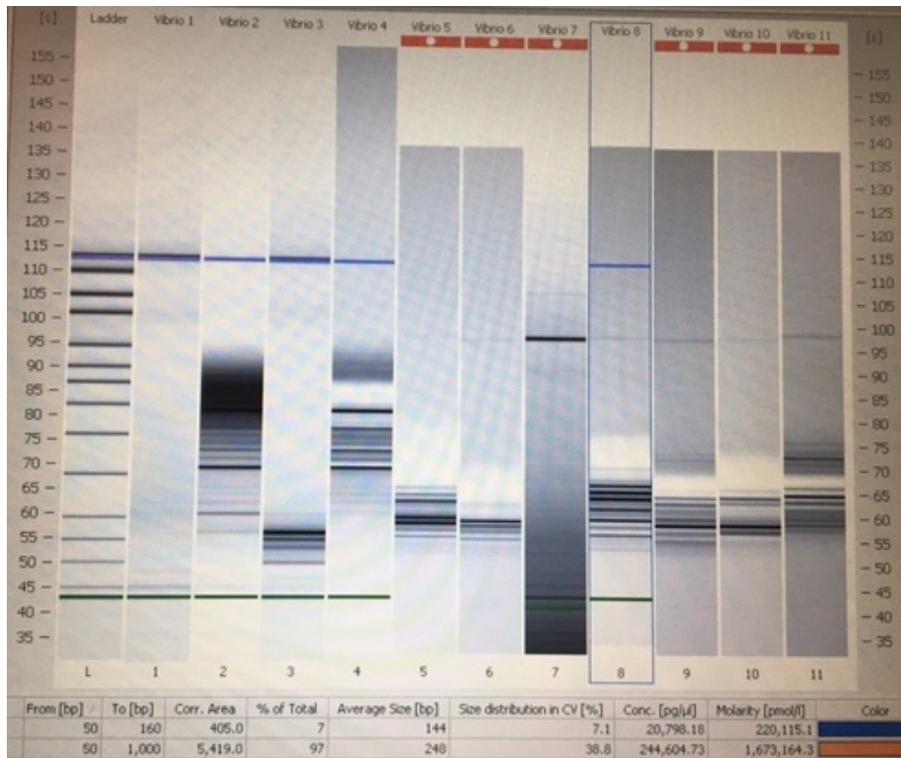


**Figura 5.3.** Imagen de los cultivos de las replicas para la obtención de 3 muestras inducidas con características similares



**Figura 5.4.** Bacterias viables teñidas con CTC

El siguiente paso fue extraer el ARN total y posteriormente la limpieza de los rARN ribosomales. De estas extracciones se generaron las librerías en las cuales se realizaron los cortes específicos para dejar las secuencias cercanas a 200pb más los adaptadores que miden aproximadamente de 100-150 bp por lo que es necesario conocer la concentración de las librerías y el tamaño de éstas. Esto se realizó en un equipo Agilent Bioanalyzer y en la (**Figura 5.5**) se muestran las bandas con los fragmentos de cada muestra y su concentración para poder generar el “pool” necesario para la secuenciación y dejar todas las muestras en la misma concentración.



**Figura 5.5.** Bandas de cortes en las librerías y concentración de las muestras

A partir de estas librerías se cargó el chip con las secuencias y se realizó la secuenciación.

En la figura **Figura 5.6** se muestra el reporte de la secuenciación realizada por medio del equipo ion-proton.

Run Summary



Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	136,007,665	85,357,695	1,366,038	100 bp
IonXpressRNA_001	CD1	350,784,693	277,703,385	3,309,497	106 bp
IonXpressRNA_002	CD2	461,019,014	349,719,902	4,105,510	112 bp
IonXpressRNA_003	CD3	254,467,310	216,002,989	4,000,870	64 bp
IonXpressRNA_004	V1	464,178,237	329,505,658	3,672,915	126 bp
IonXpressRNA_005	V2	1,192,007,959	889,180,991	9,567,377	125 bp
IonXpressRNA_006	V3	714,401,589	544,721,518	5,803,906	123 bp
IonXpressRNA_007	ASWL	9,693,303	7,522,053	88,810	109 bp
IonXpressRNA_008	ASWH	51,900,719	38,213,013	411,928	126 bp
IonXpressRNA_009	VNC1	921,197,904	674,299,237	7,533,045	122 bp
IonXpressRNA_010	VNC2	547,316,985	402,640,616	4,329,962	126 bp
IonXpressRNA_011	VNC3	572,580,763	386,204,787	4,492,519	127 bp

Figura 5.6. Reporte de la secuenciación del equipo ION proton

Se puede observar que el cargado del chip no fue muy eficiente (zona azul), sin embargo la sección que sí logró ser cargada con las librerías presentó muy buena eficiencia por lo que se obtuvo un 61% de cobertura. El tamaño de las librerías estuvo entre 100 y 150 pb (120 pb es lo adecuado).

Los resultados de las lecturas utilizadas para hacer el análisis de expresión diferencial se muestran en la (**Tabla 5.2**).

**Tabla 5.2.** Lecturas obtenidas, filtradas (sin ribosomales) y porcentaje final de lecturas usadas

Muestra	Lecturas Totales	Lecturas Filtradas	Porcentaje
1	3309497	802828	24.258
2	4105510	515668	12.560
3	4000870	446075	11.149
4	3672915	541130	14.733
5	9567377	1023819	10.701
6	5803906	693543	11.950
7	7533045	680219	9.030
8	4329962	299180	6.910
9	4492519	361427	8.045

Se puede observar que los porcentajes de lecturas utilizadas van del 6 al 24%, por lo general sólo del 2-5% de las lecturas corresponden a RNA mensajero, por lo que las eficiencias obtenidas en la secuenciación son altas. Estos datos fueron utilizados para el análisis bioinformático por medio del software NOISeq. Se realizó una comparación de expresión diferencial para encontrar los genes que se sobre expresaran a partir de la condición inicial. En la (**Tabla 5.3** y **Tabla 5.4**) se muestran los genes sobre regulados para ambas condiciones estudiadas.

**Tabla 5.3.** Comparación entre la expresión de la bacteria Inducida por medio agua de mar artificial a 4°C y el experimento control (bacteria en fase exponencial)

Gen id	"B_mean"	"C_mean"	"log2FC"
g184	1.99	1.26	2.4
g408	2.05	1.71	1.1
g2023	2.07	1.42	2.1
g703	2.09	1.60	1.6
p571	2.13	0.62	5
p648	2.21	1.61	2
p699	2.27	1.78	1.6
g756	2.27	1.41	2.8
g2248	2.51	2.18	1.1
g939	2.55	1.93	2
g588	2.61	2.27	1.1
g2197	2.67	2.49	0.5
g478	2.69	2.34	1.1
g2359	2.84	2.33	1.6
g589	3.02	2.63	1.2
g1997	3.02	2.60	1.4
g258	3.97	3.34	2

**Tabla 5.4.** Comparación entre la expresión de la bacteria Inducida por medio del inductor de biopelícula C-di-GMP y el experimento control (bacteria en fase exponencial)

Gen ID	A_mean	C_mean	log2FC
g1785	1.78	0.46	4.30
g956	1.82	0.84	3.20
g1556	1.84	0.94	2.90
p635	1.94	0.83	3.60
g157	2.06	1.19	2.80
g682	2.15	1.03	3.70
p803	2.18	1.21	3.20
g148	2.24	1.29	3.10
g1816	2.29	1.48	2.60
g2258	2.29	1.53	2.50
g2283	2.37	1.35	3.30
g2014	2.45	1.67	2.50
g684	2.47	1.54	3.00
g1226	2.49	0.32	7.10
g1893	2.50	1.93	1.90
g1711	2.57	0.72	6.10
g683	2.57	1.90	2.20
g1945	2.68	1.87	2.60
g1952	2.69	1.84	2.80
g2005	2.98	2.35	2.00
g1997	3.25	2.68	1.80
g653	3.38	2.95	1.40

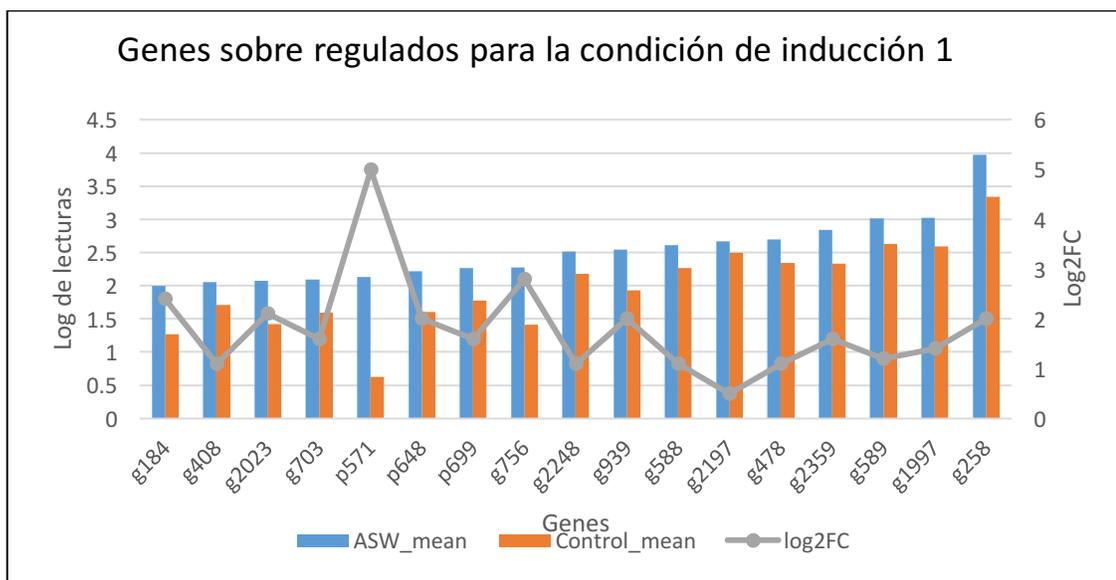
El análisis del transcriptomas mostró que existe un gen que se sobre expresa en ambas condiciones de inducción (g1997) el cual tiene un “fold change” de 1.4 y 1.88 para ambas condiciones. A continuación en la (Tabla 5.5) se resumen los genes sobre-regulados de mayor relevancia para ambas condiciones:

**Tabla 5.5.** Genes sobre-regulados de mayor importancia

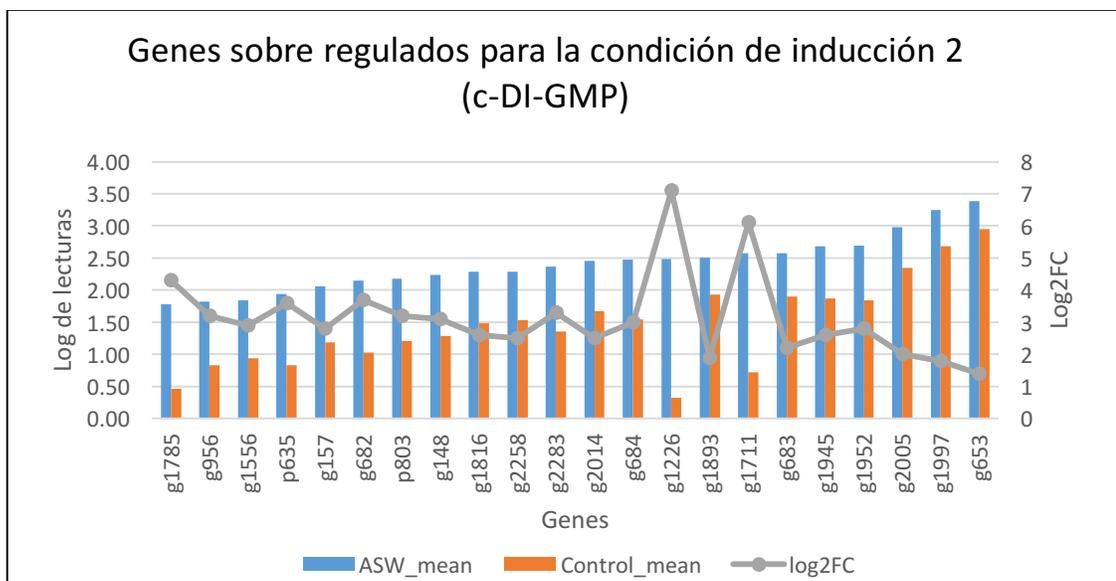
#ID	# Acceso	# Acceso	Gen
g1997	NP_231818.1	WP_000290380.1	flagellin
g1226	NP_230983.1	WP_001006394.1	hypothetical protein
<b>p571</b>	<b>NP_233045.1</b>	<b>WP_001882506.1</b>	<b>aminoimidazole riboside kinase</b>

Debido a que el cambio en la expresión más alto se dio para el gen de “Aminoimidazol ribosida kinasa”, éste fue el que se selección para sintetizar los primers.

En la (Gráfica 5.5 y Gráfica 5.6) se muestran los valores de lecturas sobre expresadas así como los valores de Log2FC necesarios para realizar la evaluación de la región con mayor delta de cambio.



**Gráfica 5.5** Comparación gráfica de los resultados del transcriptoma para la condición de inducción en agua de mar artificial y 4°C.

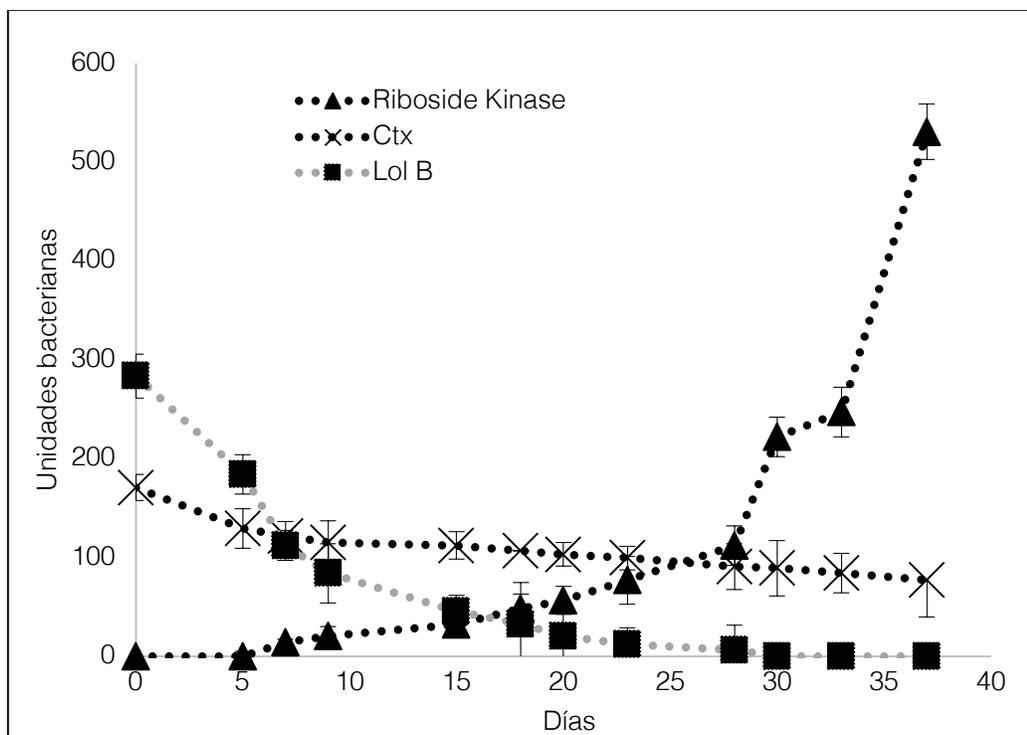


**Gráfica 5.6** Comparación gráfica de los resultados del transcriptoma para la condición de inducción en agua de mar artificial a 4°C y la adición de c-DI-GMP

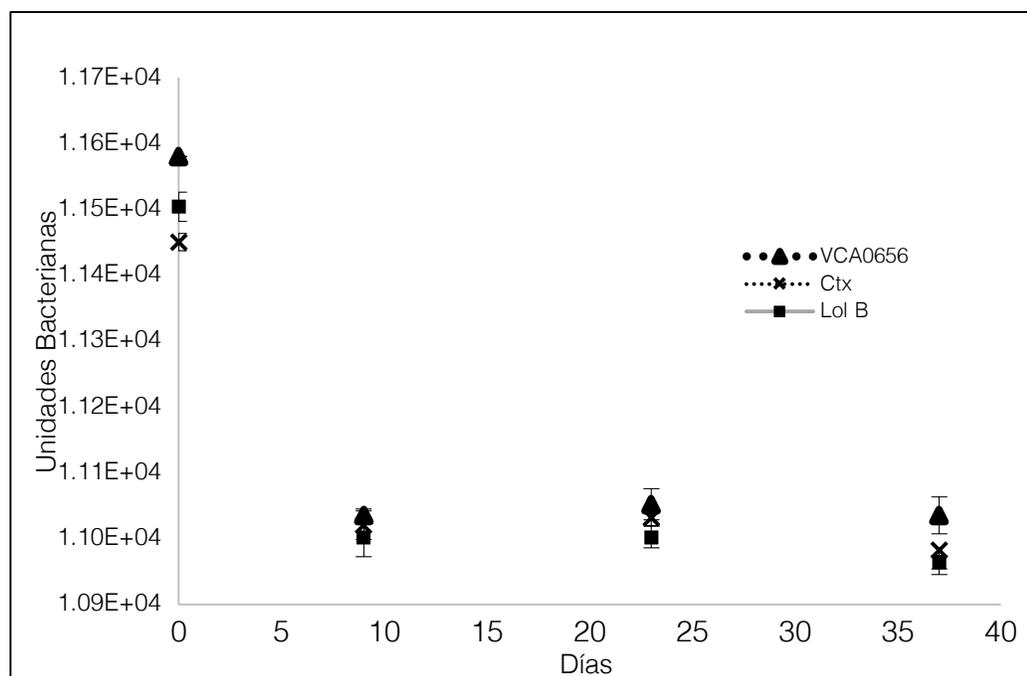
En la **Gráfica 5.5** y **Gráfica 5.6** es posible visualizar las regiones con mayor delta de diferencia de expresión y las lecturas obtenidas para estas regiones. Se puede observar en la (**Gráfica 5.7**) como la región p571 para la condición de inducción 1, presenta el valor log2FC más alto, por lo cual ese fue el que se seleccionó para llevar a cabo los estudios de detección de la forma VNC.

Para la comprobación de los resultados del transcriptoma se llevo a cabo el seguimiento de la inducción de la bacteria al estado VNC y se probaron los primers en cada punto por medio de la técnica de rt-qPCR y qPCR-PMA.

En la (gráfica 9) se observa el número de unidades bacterianas detectadas usando los primers diseñados y los primers que fueron reportados por (Chua et al., 2011), los cuales tienen la capacidad de distinguir entre cepas de *V.cholerae* toxigénicas y no toxigénicas mediante rt-qPCR. En la (**Gráfica 5.8**) se observa el mismo seguimiento pero utilizando qPCR-PMA.



**Gráfica 5.7** Comparación de los primers diseñados como marcadores para detectar el estado VNC de *V.cholerae* usando rt-qPCR



**Gráfica 5.8** Comparación de los primers diseñados como marcadores para detectar el estado VNC de *V.cholerae* usando qPCR-PMA

Se puede observar que el uso de los primers diseñados a partir del ranscriptoma muestran que la región seleccionada puede servir como un marcador de viabilidad ya que a partir del día 25 la detección de unidades bacterianas incrementa, sin embargo, cuando sólo se usa qPCR-PMA la señal es constante y no puede observarse ninguna diferencia. Con estos resultados se comprobaron los resultados obtenidos del transcriptoma y es posible utilizar esta región como un marcador del estado VNC.

### 5.5 Etapa 3, Prueba en agua de pozo

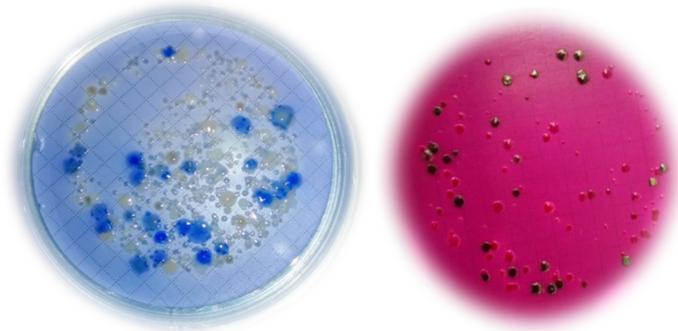
Se llevaron a cabo dos muestreos de agua, el primero de un pozo de agua ubicado en la ciudad Huejutla, Hidalgo y el segundo en el pozo la caldera en Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México.

#### 5.5.1 Muestreo Huejutla Hidalgo

Los resultados del análisis físico-químico fueron los siguientes:

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO	NOM-127-SSA-1994
Cloro residual	mg/L	0	0.2 – 1.5
Nitritos	mg/L	0.002	0.5
Nitratos	mg/L	1	10
Turbiedad	UTN	4	5
COT	mg/L	6	-----
pH		7	6.5 – 8.5
Temp	°C	24.2	-----
SDT	mg/L	0.39	1000
Coliformes fecales/ 100ml	colonias	18	0
Coliformes totales /100ml	colonias	24	0

En la **Figura 5.7** se muestra una fotografía de los filtros de membranas usados, en donde se observa la alta contaminación biológica y en la **Figura 5.8** se muestran las condiciones del pozo de agua muestreado.



**Figura 5.7.** Membranas de coliformes usadas en el muestreo



**Figura 5.8.** Niños de la población de Huejutla e imágenes del pozo de agua potable

Los resultados indicaron que existe una fuerte contaminación de tipo biológica la cual se observa en los altos valores de coliformes Fecales y Totales (18 y 24 colonias cuando la norma indica ausencia). Las condiciones socioeconómicas de la zona muestran la facilidad con la que se pudo diseminar la bacteria de cólera en el brote ocurrido en esa población en 2013. Sin embargo la prueba de detección para *V.cholerae* y *H. pylori* por medio de qPCR-PMA no mostraron interferencias.

5.5.2 Muestreo pozo la Caldera

Se llevó a cabo el muestreo de agua del influente de la planta de tratamiento La caldera. Los resultados del análisis fisicoquímico se muestran a continuación:

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO	NOM-127-SSA-1994
Cloro residual	mg/L	0	0.2 – 1.5
Nitritos	mg/L	0.001	0.5
Nitratos	mg/L	1.1	10
Turbiedad	UTN	4	5
COT	mg/L	4	-----
pH		7	6.5 – 8.5
Temp	°C	22	-----
Coliformes fecales/ 100ml	colonias	2	0
Coliformes totales /100ml	colonias	5	0



Figura 5.9. Imágenes de la planta de tratamiento “La caldera”

El análisis de agua del influente de la planta potabilizadora de la caldera mostró agua con condiciones de color amarillento y una concentración de COT de 4 mg/L, por lo que se considera como alto. Los valores normales de COT varían entre 2-4 mg/L pero la EPA recomienda para agua potable un valor de COT <2 mg/L.

Resultados de detección por qPCR para *V.cholerae*:

Se inoculó 1 L de agua con (1, 5, 10  $\mu$ L) de una suspensión ajustada a  $3 \times 10^4$  UFC/mL y en todos los casos la señal fue positiva.

Resultados de qPCR para *H.pylori*:

Se inoculó 1L de agua con (1, 5, 10  $\mu$ L) de una suspensión ajustada a  $3 \times 10^4$  UFC/mL y en todos los casos la señal fue positiva.

De acuerdo a los resultados positivos se pudo observar como las señales para la detección tanto de *H.pylori* como de *V. cholerae* se llevaron a cabo sin ningún problema y la técnica es capaz de detectar desde 30 bacterias en un litro de agua de pozo sin tener interferencias. De acuerdo a los valores obtenidos del análisis fisicoquímico del agua del influente notamos que el valor del COT es alto y es el único que podría interferir en la técnica de qPCR, sin embargo, valores más altos de 4 mg/L de COT tendrían que estar presentes para que se pudiera dar una interferencia.

### **5.6 Etapa 4, Desinfección**

A continuación se describen los resultados de las técnicas de desinfección con cloro y ozono.

#### **5.6.1 Condiciones de desinfección con ozono**

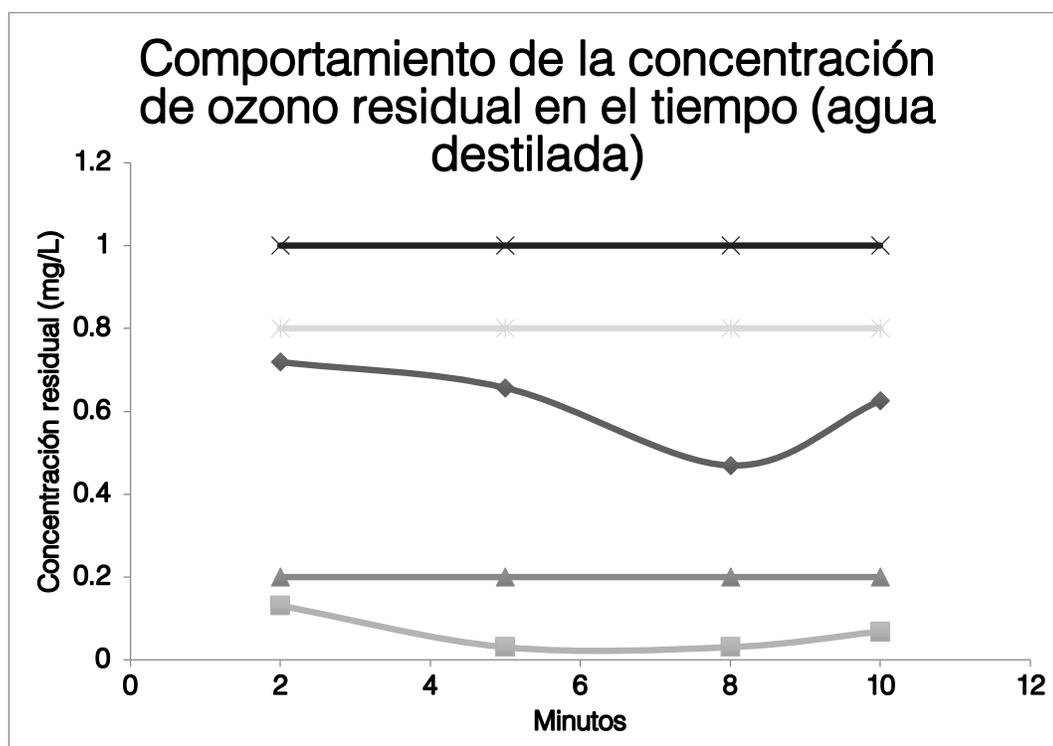
Se llevó a cabo la desinfección con ozono por medio de una solución saturada de ozono a la cual se le hicieron las siguientes pruebas:

- I. Concentración de ozono residual inicial y su decaimiento en el tiempo en agua destilada

- II. Demanda inicial de ozono y decaimiento de la concentración de ozono residual en el tiempo con la suspensión bacteriana (*H.pylori* y *V. cholerae*)

Se llevó a cabo la saturación del agua destilada en la columna de vidrio y se trabajó con distintas condiciones de operación. Se dejó un periodo de 25 minutos para estabilizar el quipo y mantener una generación de de ozono constante.

A continuación en la (**Gráfica 5.9**) se muestran los resultados de 6 concentraciones residuales de ozono dentro los reactores (Tubos Corning 50 mL) durante 25 minutos.

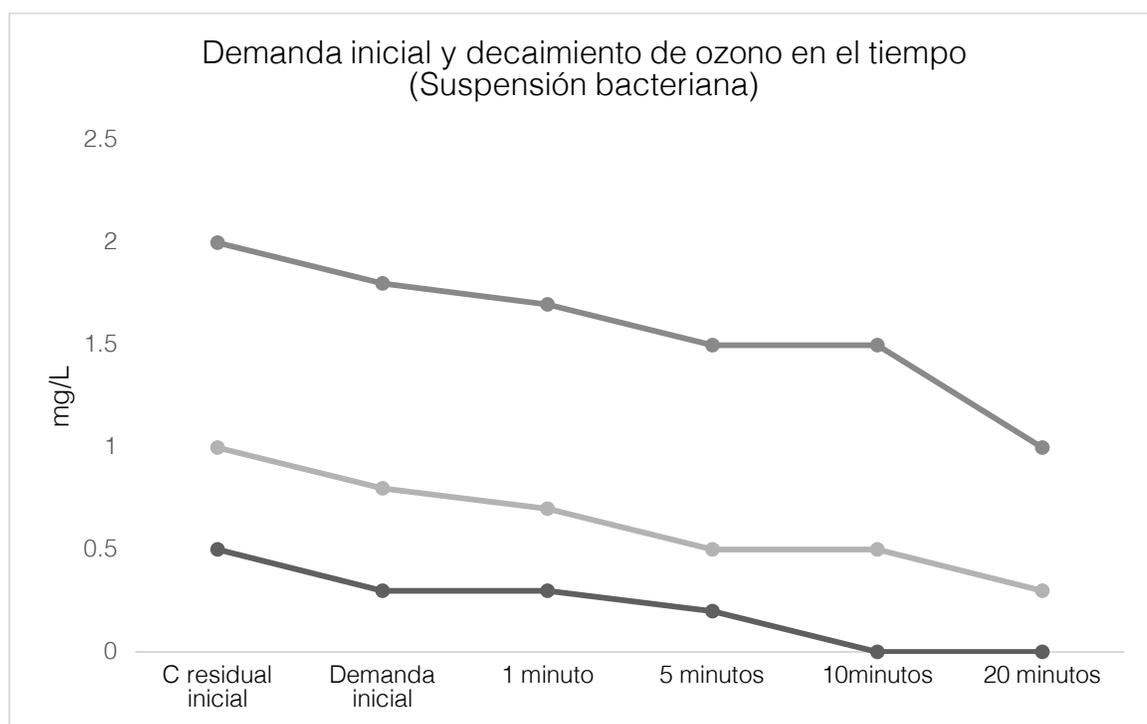


**Gráfica 5.9** Concentración de ozono residual en el tiempo en agua destilada

Se puede observar que por debajo de 0.8 mg/L las concentraciones de ozono residual se mantienen inestables en el tiempo, por esta razón se deberán utilizar concentraciones por arriba de este valor para garantizar que no existe decaimiento de ozono.

Se llevó a cabo un análisis de las demandas iniciales de ozono en contacto con las suspensiones bacteriana.

En la (**Gráfica 5.10** y **Tabla 5.6**) se muestra la demanda inicial ozono partiendo de una concentración residual de (0.5, 1, 2 mg/L) y utilizando 1 mL de suspensión bacteriana ajustada a 3 de McFarland en estado viable cultivable y un volumen de reacción de 40 mL. Estos ensayos se realizaron por triplicado.



**Gráfica 5.10** Valores de demandas iniciales y decaimiento de la concentración de ozono residual en el tiempo

**Tabla 5.6.** Promedio de valores de demandas de ozono

Ozono residual Inicial (mg/L)	Demanda inicial (mg/L)	1 min	5 min (mg/L)	10 min	20 min
0.5	0.3	0.3	0.2	0	0
1	0.8	0.7	0.5	0.5	0.3
2	1.8	1.7	1.5	1.5	1

De acuerdo al análisis de la demanda inmediata que presentó el ozono con la suspensión bacteriana, podemos observar que la disminución es aproximadamente de 0.2 mg/L, y ésta decae con respecto al tiempo.

De acuerdo a estos resultados se decidió trabajar con una solución stock con una concentración de ozono residual de arriba de 1 mg/L para evitar que se agotara la concentración de ozono residual con la suspensión bacteriana a lo largo de del ensayo de desinfección.

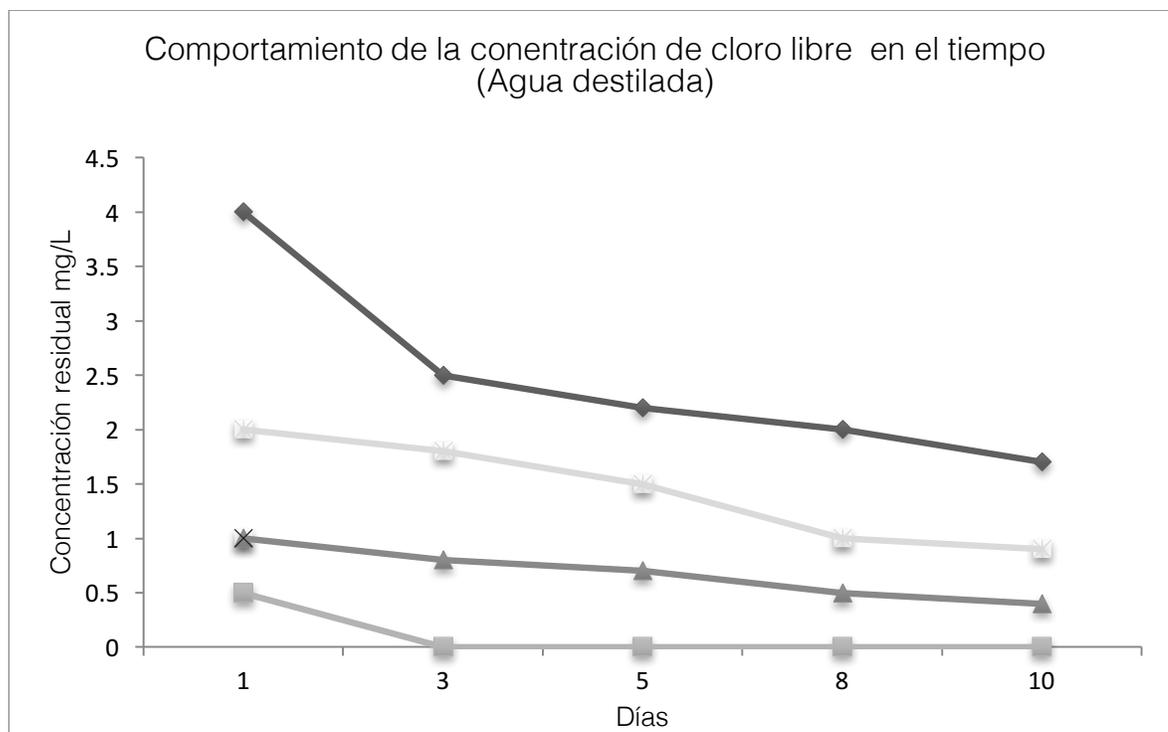
### **5.6.2 Condiciones de desinfección con cloro**

Se llevó a cabo la desinfección con cloro por medio de una solución saturada de cloro a la cual se le hicieron las siguientes pruebas:

- I. Decaimiento de cloro libre en el tiempo en agua destilada
- II. Demanda inicial de cloro y decaimiento de la concentración de cloro libre en el tiempo con la suspensión bacteriana (*H.pylori* y *V. cholerae*)

Se prepararon 4 soluciones de cloro libre con diferentes concentraciones y se midieron a lo largo del tiempo para observar la estabilidad de las soluciones.

A continuación se muestran los resultados de 4 concentraciones de cloro libre dentro los reactores (Tubos Corning 50 mL) durante 10 días. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y en la (**Gráfica 5.11**) se muestran los valores promedio.

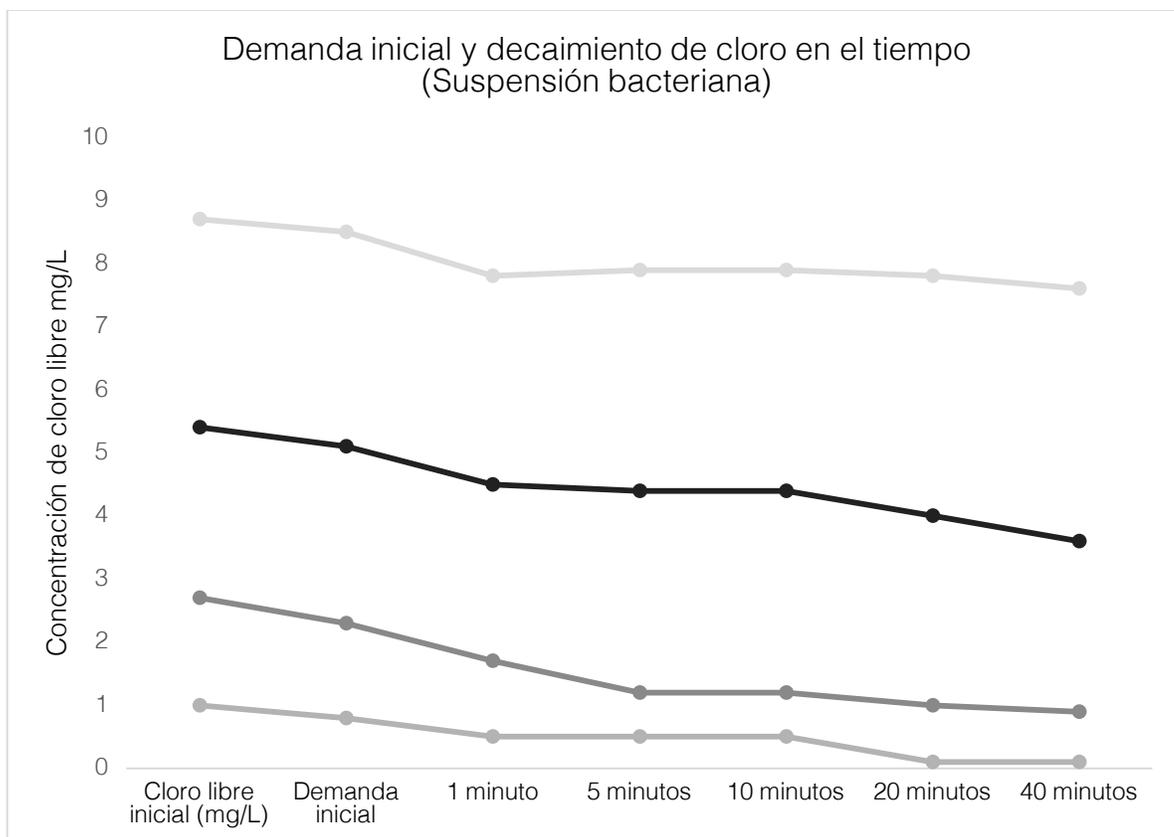


**Gráfica 5.11** Decaimiento de la concentración de cloro libre en el tiempo en agua destilada

Se observa que las soluciones de cloro son muy estables en el tiempo, sin embargo por arriba de 3 mg/L la concentración de cloro residual cae de manera pronunciada en los primeros días y por debajo de 1 mg/L la concentración de cloro libre también decae hasta llegar a cero, por lo tanto, se seleccionó trabajar con una solución de cloro libre arriba de 1 mg/L.

Se llevó a cabo un análisis de las demandas iniciales de cloro en contacto con las suspensiones bacterianas.

En la (**Gráfica 5.12**) se muestra la demanda inicial de cloro partiendo de una concentración de cloro libre de (1, 3, 5, 9 mg/L) y utilizando 1 mL de suspensión bacteriana ajustada a 3 de McFarland en estado viable cultivable y un volumen de reacción de 40 mL. Estos ensayos se realizaron por triplicado.



**Gráfica 5.12** Valores de demandas iniciales y decaimiento de la concentración de cloro libre en el tiempo

**Tabla 5.7.** Promedio de valores de demandas de cloro

Cloro libre inicial (mg/L)	Demanda inicial (mg/L)	1 min	5 min	10 min (mg/L)	20 min	40 min
1	0.8	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1
2.7	2.3	1.7	1.2	1.2	1	0.9
5.4	5.1	4.5	4.4	4.4	4	3.6
8.7	8.5	7.8	7.9	7.9	7.8	7.6

De acuerdo al análisis de la demanda inmediata que presenta el agua incluyendo la suspensión bacteriana, podemos observar que la disminución de la concentración de cloro libre es de aproximadamente de 0.3 mg/L, y esta decae con respecto al tiempo. Con estos resultados se decidió trabajar con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) con una concentración de cloro residual superior a 1 mg/L.

**5.6.3 Ensayo de desinfección con ozono y cloro de *H.pylori***

Se llevó a cabo un análisis inicial de las condiciones de desinfección con ozono y cloro en un amplio rango de concentraciones, tomando en cuenta los valores de CT de resistencia reportados para *H.pylori* y organismos similares. Se diseñó un experimento inicial con un amplio rango de concentraciones basándose en las concentraciones que son usadas comúnmente en la desinfección de agua con cloro y ozono.

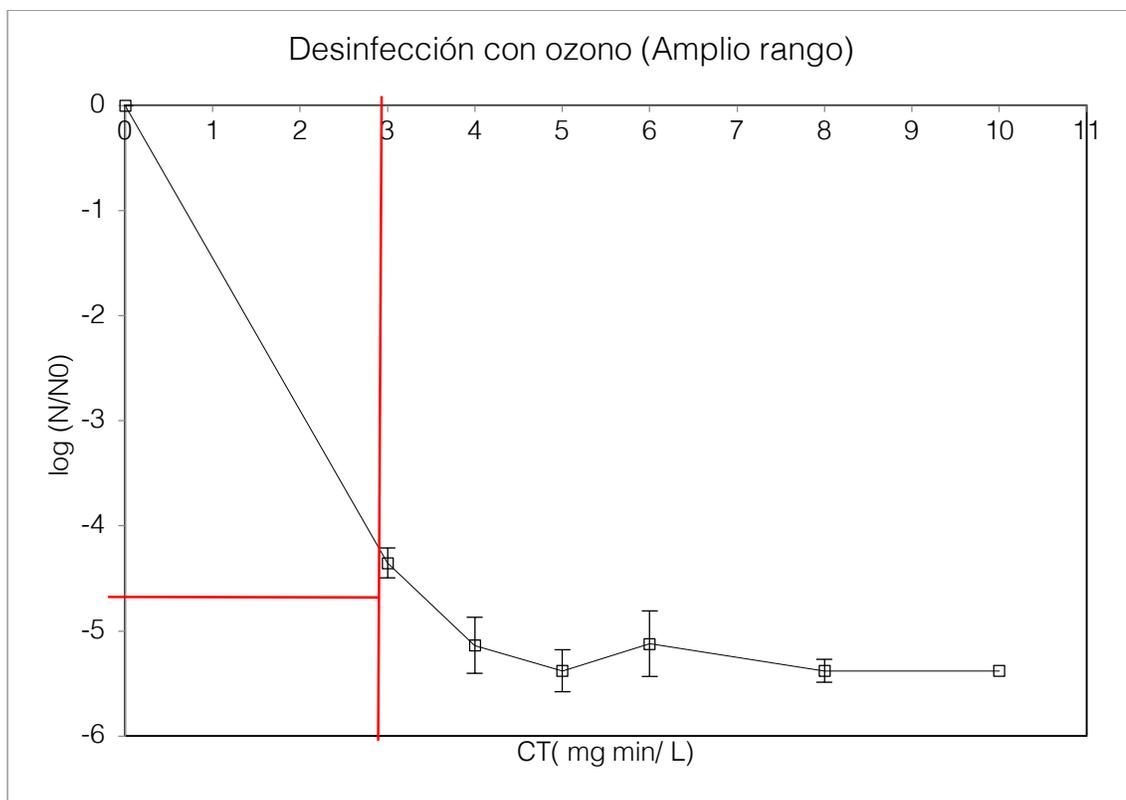
**5.6.3.1 Ozono**

Se seleccionaron 2 tiempos de contacto (5 y 10 min) y 3 concentraciones de ozono residual (0.6, 0.8, 1). Considerando que el estándar de desinfección con ozono es alrededor de 0.4 por 10 min (Norma Europea). Los resultados se muestran en la **(Tabla 5.8)**.

	0.6	0.8	1
	(mg/L)		
5 min	3	4	5
10 min	6	8	10

**Tabla 5.8.** Resultados de la desinfección con ozono en el experimento de amplio rango

CT (mg min/ L)	Unidades Bacterianas	Coefficientes de variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	9.00E+08	0	0.00	0
3	3.99E+04	3.72	-4.35	99.9956
4	6.58E+03	2.13	-5.14	99.9993
5	3.77E+03	1.07	-5.38	99.9996
6	6820	1.7	-5.12	99.9992
8	3770	4.57	-5.38	99.9996
10	3750	1.34	-5.38	99.9996



**Gráfica 5.13** Desinfección con ozono y la forma viable cultivable Exp. Exploratorio

Debido a que los cambios más significativos se dieron en los valores por debajo de CT 3, se repitió el ensayo con valores bajos y ambas formas metabólicas de la bacteria en agua embotellada de la marca Bonafont. Las pruebas fisicoquímicas del agua embotellada se muestran en la tabla **Tabla 5.9**.

**Tabla 5.9** Parámetros fisicoquímicos del agua embotellada

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO
Cloro residual	mg/L	0
Nitritos	mg/L	0.001
Nitratos	mg/L	1.1
Solidos disueltos	mg/L	100
Turbiedad	UTN	0.233
pH		7
Temp	°C	22
Coliformes fecales/ 100ml	colonias	0
Coliformes totales /100ml	colonias	0

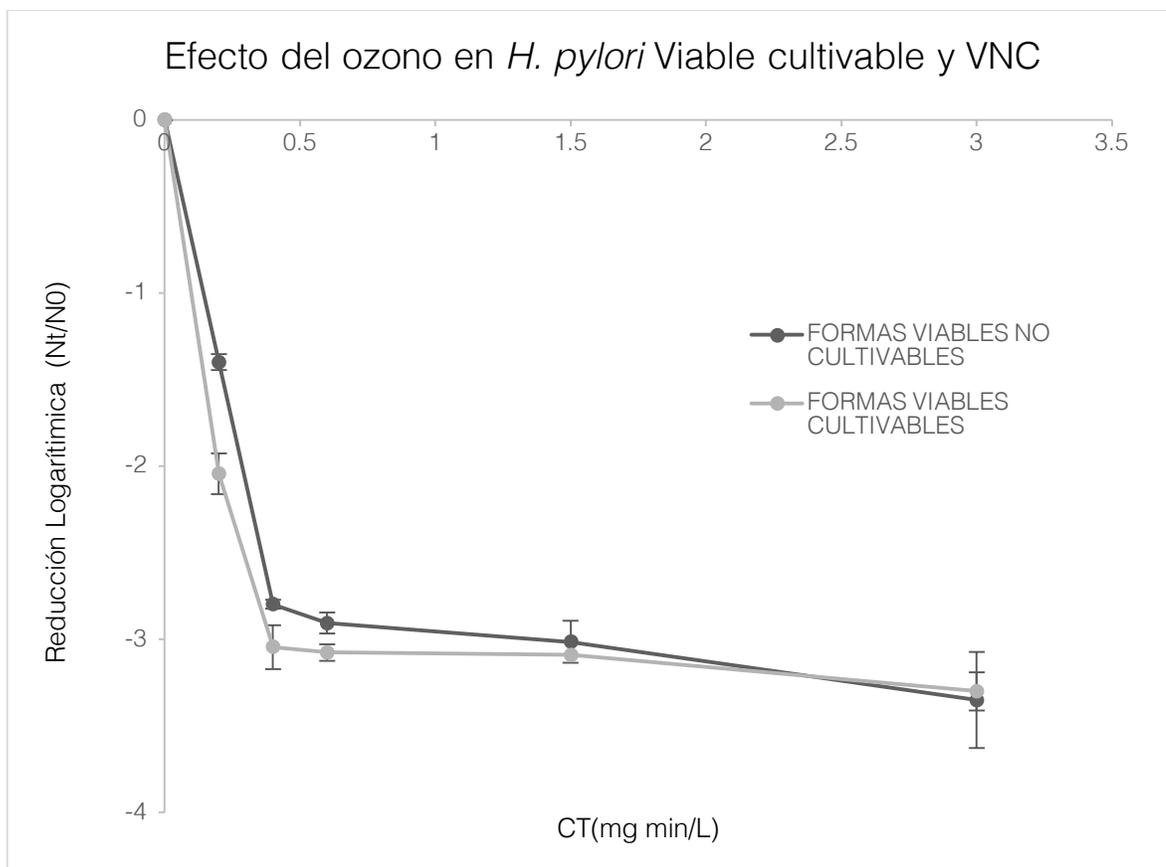
En la (**Tabla 5.10** y **Tabla 5.11**) se muestran los resultados obtenidos y en la (gráfica 11) podemos observar de manera gráfica las diferencias entre ambas formas metabólicas.

**Tabla 5.10.** Ensayo de desinfección con ozono de *H. pylori* en su forma VNC

FORMAS VIABLES NO CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes de variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	1.89x107	5.6	0	0.0000
0.2	3.67E+06	3.26	-1.40	96.02
0.4	1.47E+05	0.92	-2.80	99.84
0.6	1.15E+05	2.10	-2.91	99.87
1.5	8.90E+04	4.0	-3.02	99.90
3	4.11E+04	8.3	-3.35	99.95

**Tabla 5.11.** Ensayo de desinfección con ozono de *H. pylori* en su forma viable cultivable

FORMAS VIABLES CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes de variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	7.82x107	5.60	0.00	0.00
0.2	8.05E+06	5.78	-2.04	99.10
0.4	8.03E+05	4.19	-3.05	99.91
0.6	749520	1.57	-3.08	99.92
1.5	724520	4.30	-3.09	99.92
3	674520	5.20	-3.30	99.92



**Gráfica 5.14** Efecto del ozono sobre ambos estados bacterianos de *H.pylori* en agua embotellada a 21°C y Ph

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una prueba ANOVA para analizar la varianza entre los datos obtenidos. El análisis se realizó con el paquete SPSS (IBM) y los resultados y el nivel de significancia se muestran en la **Tabla 5.12**. Resultado del análisis estadístico.

**Tabla 5.12.** Resultado del análisis estadístico

Muestra	grupo_Ozono	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Significancia p
N_0.2	VNC_ozono	6	-1.6697	0.01830	.00747	0.001
N_0.4	viabiles_ozono	6	-2.4729	0.03265	.01333	0.001
N_0.6	VNC_ozono	6	-1.6635	0.02789	.01139	0.001
N_1.5	viabiles_ozono	6	-2.6372	0.01648	.00673	0.001
N_3	VNC_ozono	6	-1.8012	0.00918	.00375	0.001
N_3	viabiles_ozono	6	-2.6297	0.00606	.00247	0.001

El análisis del ensayo de desinfección de *H.pylori* con ozono nos muestra que existen diferencias significativas en todos los puntos, sin embargo en los valores bajos de CT es en los que se observa una diferencia amplia entre el estado viable cultivable y el estado VNC.

A un CT de 0.2 la diferencia en CT entre ambas formas es 0.64 log, lo cual demuestra que la forma VNC de *H.pylori* adquiere cambios morfológicos relacionados con la formación de biopelícula que pueden intervenir en la acción del ozono sobre la bacteria. El ozono debe entonces actuar sobre bacterias más pequeñas (aumento del área de contacto) y sobre componentes que se forman en la pared celular. Los valores de inactivación 2-log de *H.pylori* son cercanos a 0.2 y éstos han sido obtenidos por métodos de cultivo por lo que se subestima la resistencia de bacterias en estado VNC.

A valores de CT por arriba de 0.4 se observa que el comportamiento se vuelve similar para ambas formas metabólicas por lo que se comprueba que el poder oxidante del ozono puede inactivar las bacterias independientemente de los cambios morfológicos que la bacteria pueda adquirir.

Para la desinfección con ozono, nuestros resultados indican que se debe aplicar un valor CT de 0,6 mg min/L para garantizar una inactivación de 3 log. Baker et al. (Baker et al., 2002), sugieren un valor  $CT_{99.9}$  de 0.125 mg min/l para *H. pylori* en el estado viable cultivable. La Regla de Tratamiento de Agua de Superficie (SWTR, por sus siglas en inglés) recomienda un  $CT_{99.9}$  de 0.72 mg min/L a 20°C para los quistes de Giardia, un organismo complejo para inactivar. Estos valores de CT son inferiores a los nuestros, y subestiman aproximadamente 1 log de inactivación entre ambos estados metabólicos.

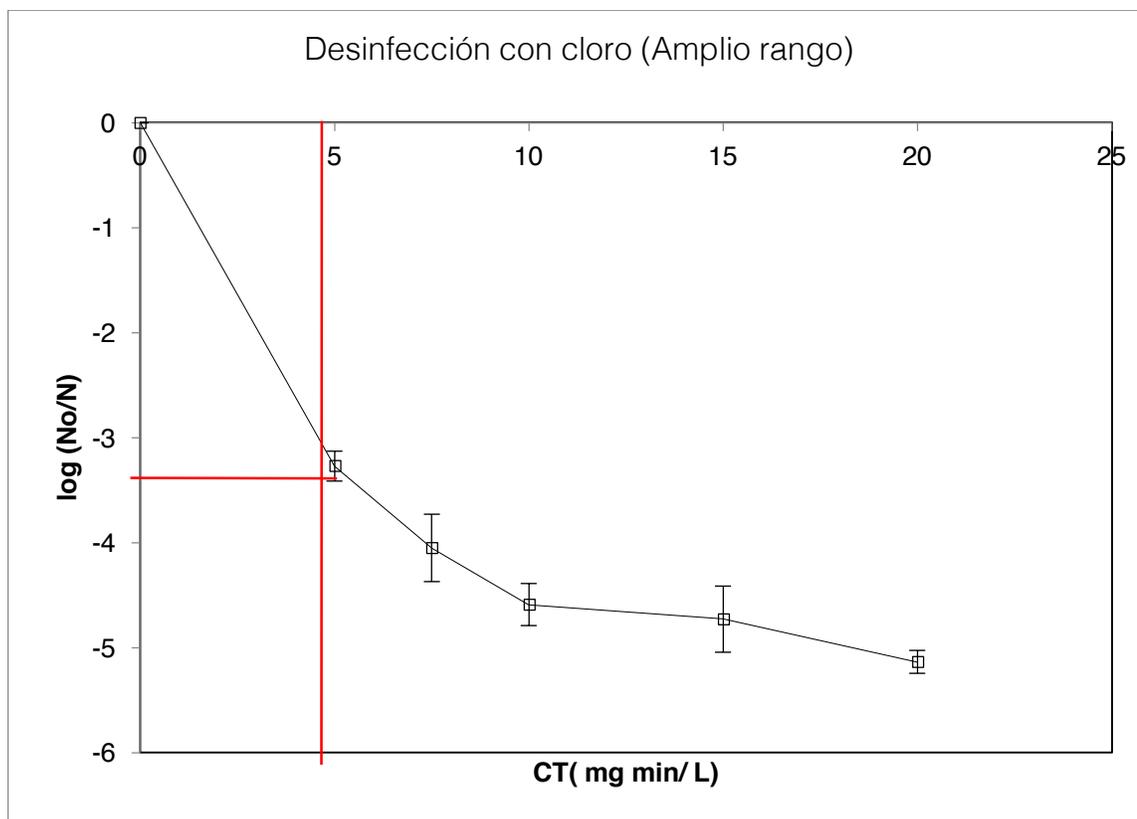
5.6.3.2 Cloro

Se seleccionaron 2 tiempos de contacto (5 y 10 min) y 3 concentraciones de cloro libre (1, 1.5, 2). Considerando que el estándar de desinfección con cloro es alrededor de 0.5 por 30 min (USEPA). Los resultados se muestran en la (Tabla 5.13).

Min	1	1.5	2
	(mg/L)		
5	5	7.5	10
10	10	15	20

Tabla 5.13. Resultados de la desinfección con cloro del experimento exploratorio

CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes De variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	9.00E+08	0.0	0.00	0.0000
5	4.83E+05	4.36	-3.27	99.94
7.5	8.00E+04	7.90	-4.05	99.9911
10	23100	4.33	-4.59	99.9974
15	16800	6.65	-4.73	99.9981
20	6580	2.15	-5.14	99.9993



**Gráfica 1.** Desinfección con cloro y la forma viable cultivable Exp. Exploratorio

Debido a que los cambios más significativos se dieron en los valores por debajo de CT 10, se repitió el ensayo con valores bajos y ambas formas metabólicas de la bacteria. El experimento se llevó a cabo en agua embotellada de la marca Bonafont y las pruebas fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 5.9**.

En la (**Tabla 5.14** y

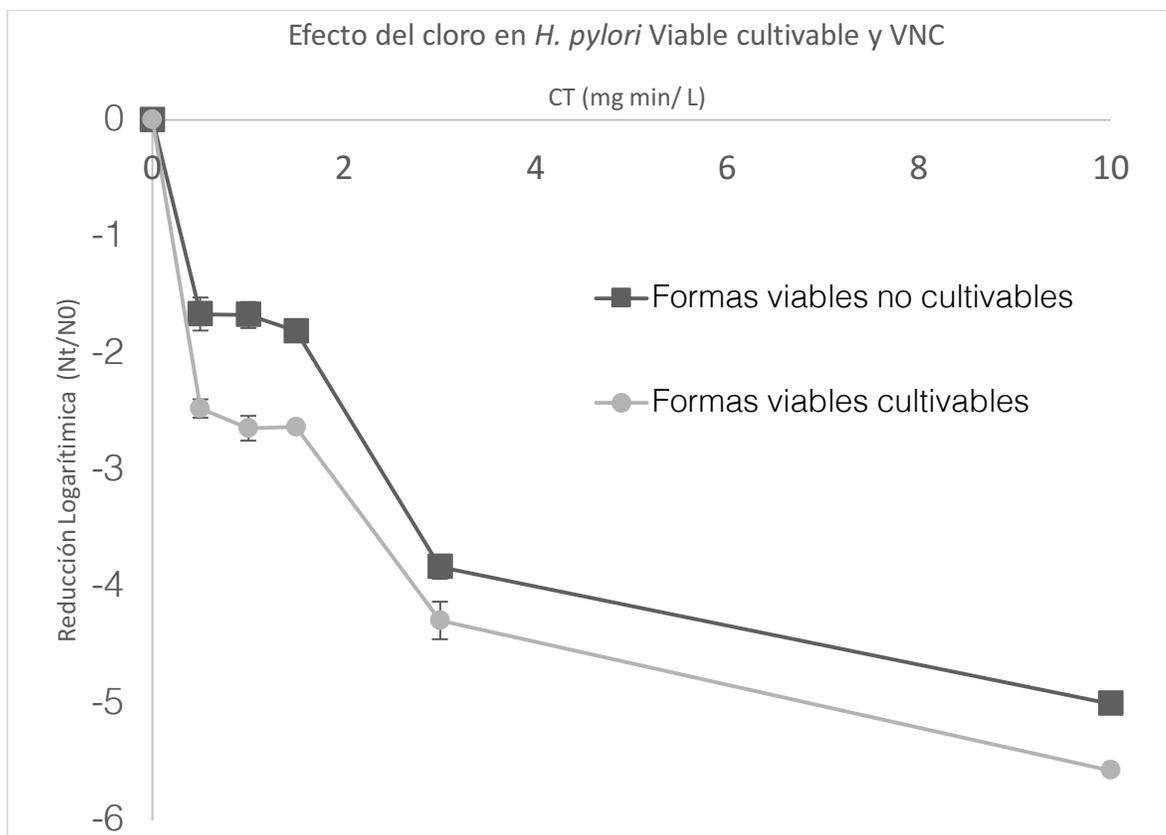
**Tabla 5.15**) se muestran los resultados obtenidos y en la **Gráfica 5.13** podemos observar de manera gráfica las diferencias entre ambas formas metabólicas.

**Tabla 5.14.** Ensayo de desinfección con cloro de *H. pylori* en su forma VNC

FORMAS VIABLES NO CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes De variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	1.69x10 <sup>7</sup>	1.52E+00	0.00	0.0000
0.5	1.57E+06	1.51E+01	-1.66	97.82
1	1.55E+06	1.45E+01	-1.67	97.85
1.5	1.13E+06	1.67E+01	-1.81	98.43
3	1.07E+04	3.38E+00	-3.83	99.98
10	7.20E+02	5.50E+00	-5.00	99.999

**Tabla 5.15.** Ensayo de desinfección con cloro de *H. pylori* en su forma viable cultivable

FORMAS VIABLES CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes De variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	8.01x10 <sup>7</sup>	2.55	0.00	0.0000
0.5	3.11E+06	6.36	-2.47	99.6623
1	2.11E+06	2.39	-2.64	99.7714
1.5	2.16E+06	1.38	-2.63	99.7657
3	4.75E+04	3.89	-4.29	99.9949
10	2.47E+03	4.5	-5.57	99.9997



**Gráfica 5.15** . Efecto del cloro sobre ambos estados bacterianos de *H.pylori* en agua embotellada a 21°C y Ph

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una prueba ANOVA para analizar la varianza entre los datos obtenidos. El análisis se realizó con el paquete SPSS (IBM) y los resultados y el nivel de significancia se muestran en la (**Tabla 5.16**).

**Tabla 5.16.** Resultado del análisis estadístico

		Estadísticos de grupo				
	grupo_Cloro	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Significancia p
N_0.5	VNC_cloro	6	-2.8984	.00204	.00083	0.005
N_1	viabes_cloro	6	-3.0303	.01186	.00484	0.005
N_1.5	VNC_cloro	6	-2.7999	.00347	.00142	0.005
N_3	viabes_cloro	6	-3.0454	.00922	.00376	0.005
	VNC_cloro	6	-2.9054	.00855	.00349	0.005
N_10	viabes_cloro	6	-3.0754	.01105	.00451	0.005

El análisis del ensayo de desinfección de *H.pylori* con cloro nos muestra que existen diferencias significativas en todos los puntos, sin embargo en los valores por debajo de un CT de 2 se observa una diferencia amplia entre el estado viable cultivable y el VNC.

En los CT's bajos (0.5, 1, 1.5) la diferencia es de casi 1-log lo cual demuestra que la forma VNC de *H.pylori* es más resistente a la desinfección con cloro.

Al Comparar los valores obtenidos de CT con los reportados en la literatura, por ejemplo, Johnson et al (Johnson et al., 1997) reportaron un valor  $CT_{99.9}$  de 0.12 mg min/L y un valor  $CT_{99}$  de 0.35 mg min/L reportado por Baker Et al. (Baker et al., 2002), se observa que estos valores son más bajos que los de ambos estados metabólicos. Esto implica que los valores de CT publicados subestiman la resistencia del estado VNC, haciendo que los valores de CT no deban ser usados con precaución como parámetro para diseñar una unidad de desinfección.

#### ***5.6.4 Ensayo de desinfección con ozono y cloro de V.cholerae***

Se llevó a cabo la cuantificación de las bacterias de *V.cholerae* por medio de dos metodologías, la primera fue utilizando qPCR-PMA y la segunda utilizando los primers obtenidos del análisis transcriptómico y utilizando rt-qPCR.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la técnica qPCR-PMA.

##### ***5.6.4.1 Ozono***

Se seleccionaron 6 tiempos de contacto considerando que el estándar de desinfección con ozono es alrededor de 0.4 por 10 min (Norma Europea CT 4) y de acuerdo a los datos obtenidos con *H.pylori*. Se trabajó con la bacteria en su forma viable cultivable y viable no cultivable.

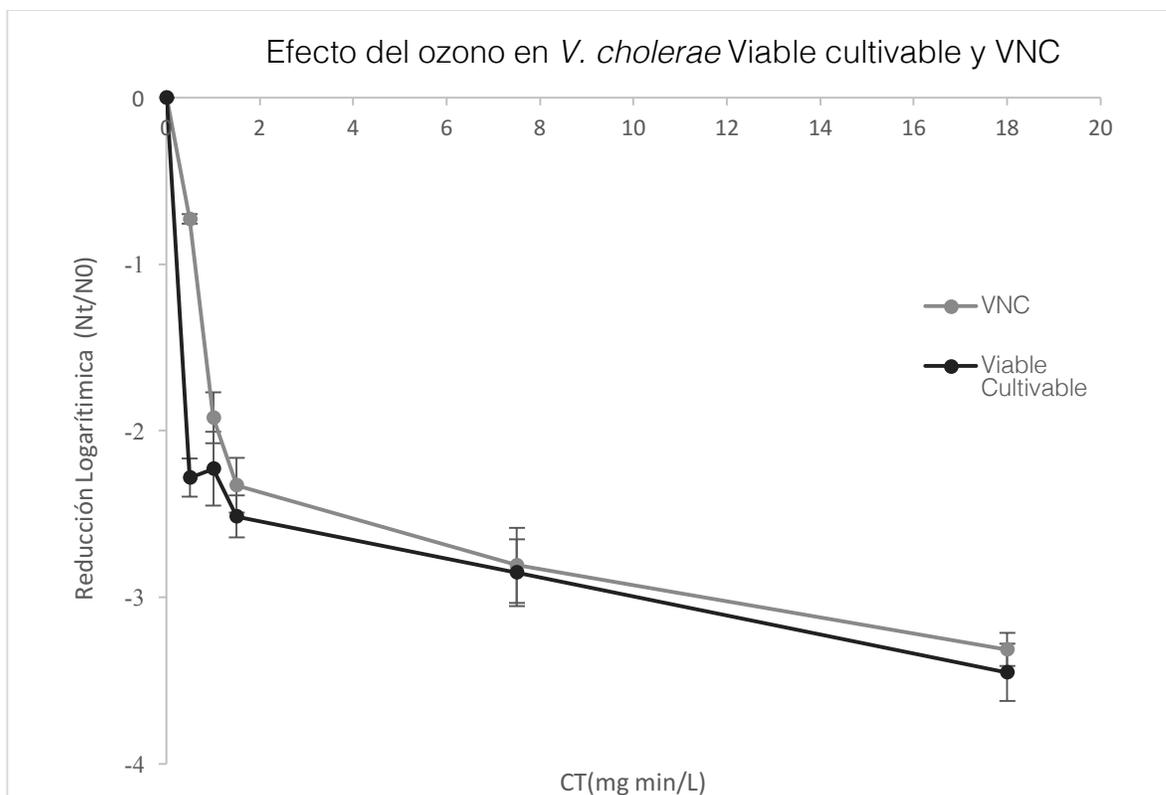
Los resultados se muestran en la (**Tabla 5.17** y **Tabla 5.18**).

**Tabla 5.17.** Ensayo de desinfección con ozono de *V. cholerae* en su forma VNC

FORMAS VIABLES NO CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes de variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	7.35E+04	0.06	0.00	0.00
0.5	1.37E+04	1.00	-0.73	81.36
1	978	15.32	-1.88	98.67
1.5	345	15.92	-2.33	99.53
7.5	114	15.78	-2.81	99.84
18	10	7.35	-3.87	99.99

**Tabla 5.18.** Ensayo de desinfección con ozono de *V. cholerae* en su forma viable cultivable

FORMAS VIABLES CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes de variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	7.14E+04	0.23	0.00	0.00
0.5	372	21.47	-2.28	99.48
1	322	6.21	-2.35	99.55
1.5	217	6.89	-2.52	99.70
7.5	100	9.97	-2.85	99.86
18	10	20.00	-3.85	99.99



**Gráfica 5.16** . Efecto del ozono sobre ambos estados bacterianos de *V. cholerae* en agua embotellada a 21°C y Ph

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una prueba ANOVA para analizar la varianza entre los datos obtenidos. El análisis se realizó con el paquete SPSS (IBM) y los resultados y el nivel de significancia se muestran en la (**Tabla 5.19**).

**Tabla 5.19.** Resultado del análisis estadístico *Vibrio cholerae*  
Estadísticos de grupo

grupo_Ozono	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Significancia p
N_0.0 VNC_ozono	6	-1.3697	.01830	.00747	0.001
N_0.5 viables_ozono	6	-2.5729	.03265	.01333	0.001
N_1 VNC_ozono	6	-1.2635	.02789	.01139	0.001
N_1.5 viables_ozono	6	-2.1372	.01648	.00673	0.001
N_7.5 VNC_ozono	6	-1.9012	.00918	.00375	0.001
N_18 viables_ozono	6	-1.6297	.00606	.00247	0.001

El análisis del ensayo de desinfección de *V. cholerae* con ozono nos muestra que existen diferencias significativas en todos los puntos, sin embargo en los valores bajos de CT es en los que se observa una diferencia amplia entre el estado viable cultivable y VNC, siguiendo la misma tendencia de *H.ylori*.

A un CT de 0.5 la diferencia en CT entre ambas formas es de 1.56 log, lo cual demuestra que la forma VNC de *V. cholerae* adquiere cambios morfológicos que pueden estar relacionados con la formación de biopelícula. Estas adaptaciones han sido ampliamente estudiadas en *V. cholerae* pero por primera vez se midió su resistencia a la desinfección. Como ya se expuso con *H.pylori*, los cambios en la pared celular, el aumento del área de contacto por la transformación a la forma cocoide impiden la acción del ozono sobre la bacteria, sin embargo, el ozono es un oxidante fuerte que al incrementar el tiempo de contacto logra inactivar la bacteria sin importar las diferencias que puedan existir entre ambos estados metabólicos.

Los valores de CT reportados por la CDC (Centro de control de enfermedades de los Estados Unidos De América) reportan para *V.cholerae* un valor CT<sub>99</sub> de 0.2 usando la forma viable cultivable. Nuestros resultados muestran que a valores similares de inactivación de la forma VNC, ésta de inactiva menos de 1-log, esto implica una subestimación de casi 2 logaritmos. En los niveles de CT bajos es en donde las diferencias son más significativas.

A valores de CT por arriba de 1 se observa que el comportamiento se vuelve similar para ambas formas metabólicas por lo que se comprueba que el poder oxidante del ozono puede inactivar las bacterias independientemente de los cambios morfológicos que la bacteria pueda adquirir.

Para la desinfección del ozono, nuestros resultados indican que se debe aplicar un valor CT de 1 mg min/L para garantizar una inactivación de 2 log.

5.6.4.2 Cloro

Se seleccionaron 6 tiempos de contacto considerando que el estándar de desinfección con cloro es alrededor de 0.5 por 30 min (USEPA) y los datos obtenidos con *H. pylori*. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.20** y **Tabla 5.21**.

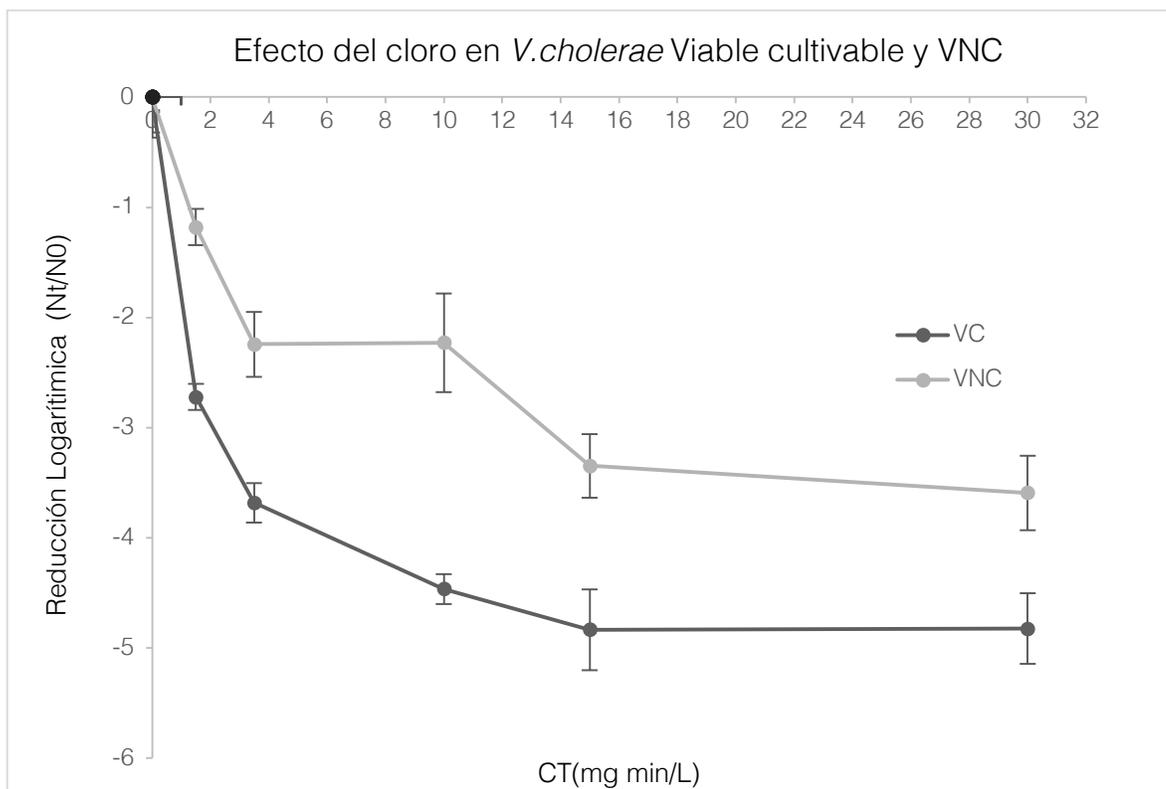
**Tabla 5.20.** Ensayo de desinfección con cloro de *V.cholerae* en su forma VNC

FORMAS VIABLES NO CULTIVABLES				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes De variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	1.09E+05	2.56	0.00	0.00
2	7.22E+03	10	-1.18	93.40
4	6.27E+02	8	-2.24	99.43
10	6.45E+02	6	-2.23	99.41
15	4.92E+01	11	-3.35	99.96
30	2.81E+01	9.00	-3.59	99.97

**Tabla 5.21.** Ensayo de desinfección con cloro de *V.cholerae* en su forma viable cultivable

FORMA VIABLES CULTIVABLE				
CT (mg min L-1)	Unidades Bacterianas (N)	Coefficientes De variación %CV	log(N/No)	Porcentaje de inactivación %
0	5.39E+06	3	0.00	0.00
2	1.02E+04	6	-2.72	99.81
4	1.12E+03	8	-3.68	99.98
10	1.85E+02	10	-4.46	100.00
15	7.90E+01	6	-4.83	100.00
30	8.10E+01	7	-4.82	100.00

De forma gráfica los resultados anteriores se muestran en la (**Gráfica 5.18**)



Gráfica 5.17

**Gráfica 5.18** . Efecto del cloro sobre ambos estados bacterianos de *V.cholerae* en agua embotellada a 21°C y Ph

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una prueba ANOVA para analizar la varianza entre los datos obtenidos. El análisis se realizó con el paquete SPSS (IBM) y los resultados y el nivel de significancia se muestran en la (**Tabla 5.22**).

**Tabla 5.22.** Resultado del análisis estadístico

Muestra	grupo_Cloro	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Significancia p
N_0.2	VNC_cloro	6	-1.8984	.00204	.00083	0.002
N_2	viabes_cloro	6	-2.0303	.01186	.00484	0.002
N_10	VNC_cloro	6	-1.799	.00347	.00142	0.002
N_15	viabes_cloro	6	-1.04	.00922	.00376	0.002
N_30	VNC_cloro	6	-1.90	.00855	.00349	0.002
	viabes_cloro	6	-1.075	.01105	.00451	0.0052

El análisis estadístico del ensayo de desinfección de *V.cholerae* con cloro nos muestra que existen diferencias significativas en todos los puntos. Las diferencias son por arriba de 1-log en todos los puntos.

Los valores de CT reportados para desinfección de *V.cholerae* con cloro son cercanos a 0.5 mg min/L para alcanzar una inactivación de 99.9%. Nuestros valores muestran que en ese valor de CT la diferencia entre ambas formas metabólicas de 1.53 log. Estos resultados indican que la diferencia en la resistencia es amplia y que los valores que se encuentran reportados en la literatura están muy por debajo de lo que se requiere para inactivar a las formar VNC. Una vez más se comprueba que las adaptaciones morfológicas consumen el cloro libre y no logran inactivar a todas las bacterias de *V.cholerae*.

### 5.7 Etapa 4, Cinéticas de desinfección de cloro y ozono de *H. pylori*.

#### 5.7.1 Cinética de Ozono

Se llevó a cabo el análisis cinético de los resultados de la desinfección con cloro y ozono aplicando dos modelos cinéticos. El primero el de Chick-Watson el cual es un modelo de primero orden lineal en el que se considera que la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto impactan sobre la inactivación de manera similar. El segundo, es el modelo de Hom el cual se aplica con frecuencia a los datos experimentales que se apartan de la ley de inactivación de Chick. El modelo de Hom introduce un coeficiente empírico en el modelo de Chick-Watson. Los valores utilizados para este análisis se muestran en la (Tabla 5.23).

Ozono

**Tabla 5.23.** Valores para el cálculo de la cinética de Chick-Watson y Hom (*ozono, H. pylori*)

Ozono				
t (min)	log(N/No) VNC	log(N/No) VC	log(N/No) ESTIMADO	ERROR HOM
0.2	-1.40	-1.59	-2.04	0.02
0.4	-2.80	-1.96	-3.05	0.09
0.6	-2.91	-2.21	-3.08	0.06
1.5	-3.02	-2.92	-3.09	0.00
3	-3.35	-3.59	-3.30	0.01
		-12.27		0.17
		R^2		0.83

Valores de las constantes de Hom obtenidas mediante una regresión no lineal

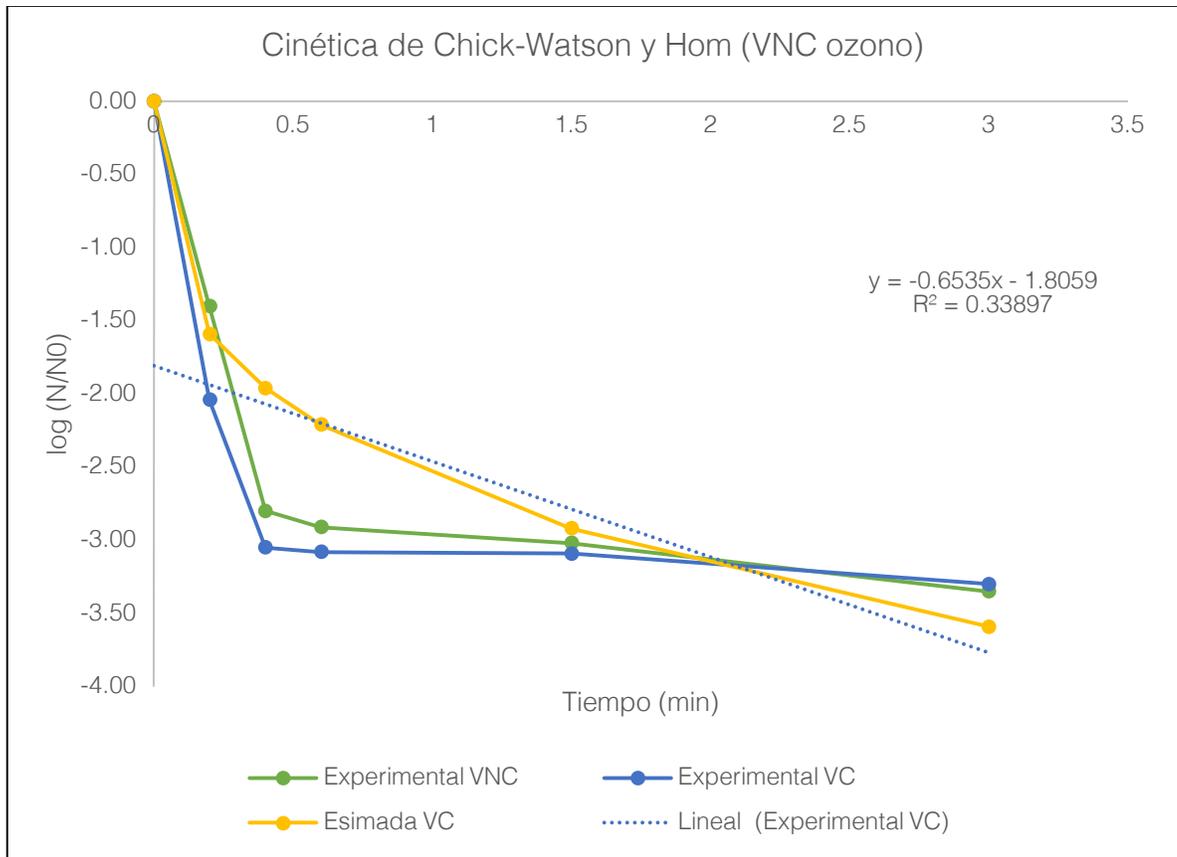
k	2
n	1.4
m	0.3
C	1.2

$$\ln \frac{N}{N_0} = -KC^n t^m \dots \dots \dots (\text{Ecuación de Hom})$$

Valores de las constantes de Chick-Watson obtenidas mediante una regresión lineal

k	-1.8
n	1
m	-0.6
C	1.2

$$\ln \frac{N}{N_0} = -KCt \dots \dots \dots (\text{Chick-Watson})$$



**Gráfica 5.19** . Resultados de la cinética de desinfección para ozono

En la (gráfica 16) se observa que el mejor ajuste a los datos se da con la ecuación de Hom, la cual tiene un ajuste con una  $R^2=0.83$  en comparación con el modelo lineal de Chick-Watson que tiene un ajuste con una  $R^2=0.33$ . En el caso del ajuste de Hom, el valor de  $n$  es mayor a 1, por lo tanto la concentración es más importante que el tiempo. Estos resultados eran esperados ya que los valores obtenidos experimentalmente tienen un comportamiento de tipo dicotómico con múltiples cinéticas, con una fase rápida inicial y una fase lenta al final lo que crea curvas con colas “tails” al final.

5.7.2 Cinética de cloro

**Tabla 5.24.** Valores para el cálculo de la cinética de Chick-Watson y Hom (cloro, *H. pylori*)

Cloro				
t (min)	log(N/No) VNC	log(N/No) VC	log(N/No) ESTIMADO	ERROR HOM
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.50	-1.66	-2.47	-2.00	0.04
1.00	-1.67	-2.64	-2.47	0.00
1.50	-1.81	-2.63	-2.79	0.00
3.00	-3.83	-4.29	-3.43	0.04
10.00	-5.00	-5.57	-4.92	0.01
				0.10
			R^2	0.90

Valores de las constantes de Hom obtenidas mediante una regresión no lineal

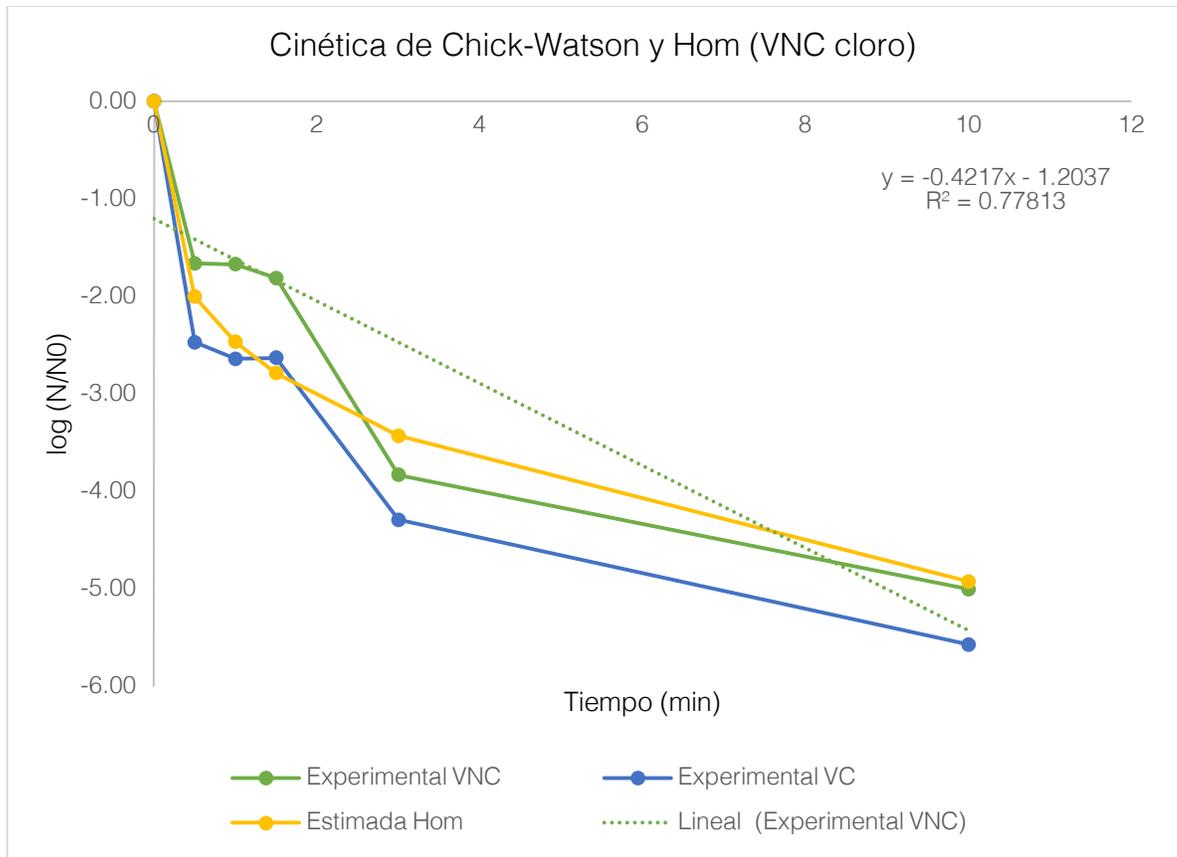
k	2
n	0.8
m	0.3
C	1.3

$$\ln \frac{N}{N_0} = -KC^n t^m \dots\dots\dots(\text{Ecuación de Hom})$$

Valores de las constantes de Chick-Watson obtenidas mediante una regresión lineal

k	-1.2
n	1
m	-0.4
C	1.3

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K Ct \dots\dots\dots(\text{Chick-Watson})$$



**Gráfica 5.20** . Resultados del la cinética de desinfección para cloro

En la (**Gráfica 5.20**) se observa que el mejor ajuste a los datos se da con la ecuación de Hom, la cual tiene un ajuste con una  $R^2=0.90$  en comparación con el modelo lineal de Chick-Watson que tiene un ajuste con una  $R^2=0.77$ . En el caso del ajuste de Hom, el valor de  $n$  es menor a 1, por lo tanto la concentración es igual de importante que el tiempo. Estos resultados eran esperados ya que los valores obtenidos experimentalmente tienen un comportamiento de tipo dicotómico con múltiples cinéticas, con una fase rápida inicial y una fase lenta al final lo que crea curvas con colas al final “tails”.

**5.8 Etapa 4, Cinéticas de desinfección de cloro y ozono de *V.cholerae***

Se llevó a cabo el análisis cinético de los resultados de la desinfección con cloro y ozono aplicando dos modelos cinéticos. El primero el de Chick-Watson el cual es un modelo de primero orden lineal, y el segundo, es el modelo de Hom el cual se aplica con frecuencia a los datos experimentales que se apartan de la ley de inactivación de Chick. Los valores utilizados para este análisis se muestran en la **(Tabla 5.25)**.

**5.8.1 Cinética de Ozono**

**Tabla 5.25.** Valores para el cálculo de la cinética de Chick-Watson y Hom (ozono, *V. cholerae*)

ozono				
t (min)	log(N/No) VNC	log(N/No) VC	log(N/No) ESTIMADO	ERROR HOM
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.50	-0.73	-2.28	-1.39	0.15
1.00	-1.88	-2.35	-1.71	0.07
1.50	-2.33	-2.52	-1.93	0.05
7.50	-2.81	-2.85	-3.13	0.01
18.00	-3.87	-3.85	-4.07	0.00
			R^2	0.94

Valores de las constantes de Hom obtenidas mediante una regresión no lineal

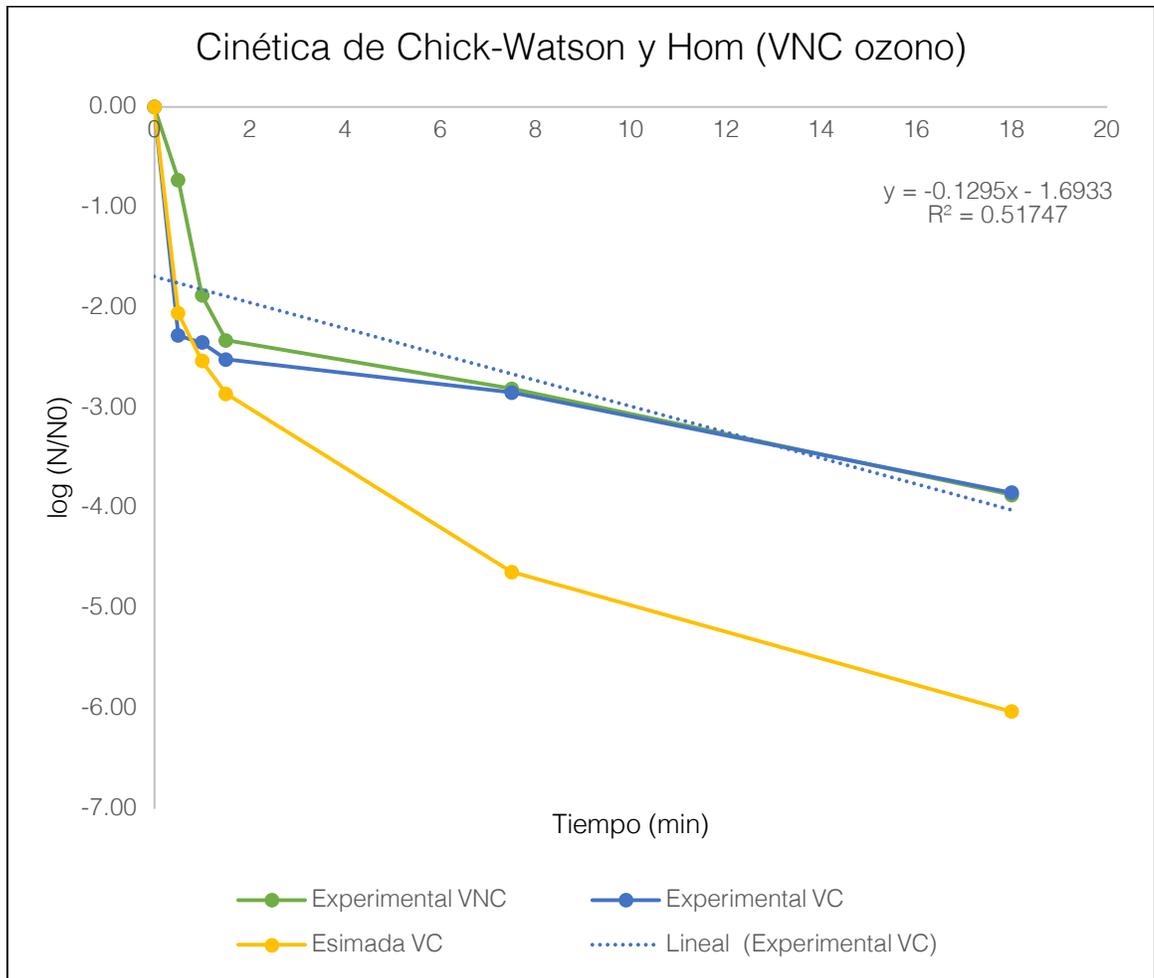
k	1.5
n	0.5
m	0.3
C	1.3

$$\ln \frac{N}{N_0} = -KC^n t^m \dots\dots\dots(\text{Ecuación de Hom})$$

Valores de las constantes de Chick-Watson obtenidas mediante una regresión lineal

k	-1.69
n	1
m	-0.12
C	1.2

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K C t \dots\dots\dots(\text{Chick-Watson})$$



**Gráfica 5.21** Resultados del la cinética de desinfección para ozono

En la (Gráfica 18) se observa que el mejor ajuste a los datos se da con la ecuación de Hom, la cual tiene un ajuste con una  $R^2=0.94$  en comparación con el modelo lineal de Chick-Watson que tiene un ajuste con una  $R^2=0.51$ . En el caso del ajuste de Hom, el valor de n es menor a 1, por lo tanto la concentración es igual de importante que el tiempo. Estos resultados eran esperados ya que los valores obtenidos experimentalmente tienen un comportamiento de tipo dicotómico con múltiples cinéticas, con una fase rápida inicial y una fase lenta al final lo que crea curvas con colas al final “tails”.

5.8.2 Cinética de cloro

Tabla 5.26. Valores para el cálculo de la cinética de Chick-Watson y Hom (cloro, *V. cholerae*)

Cloro				
t (min)	log(N/No) VNC	log(N/No) VC	log(N/No) ESTIMADO	ERROR HOM
0	0	0	0.00	0.00
0.5	-1.18	-2.72	-2.06	0.06
1	-2.24	-3.68	-2.54	0.10
1.5	-2.23	-4.46	-2.86	0.13
7.5	-3.35	-4.83	-4.64	0.00
18	-3.59	-4.82	-6.03	0.06
				0.35
			R <sup>2</sup>	0.65

Valores de las constantes de Hom obtenidas mediante una regresión no lineal

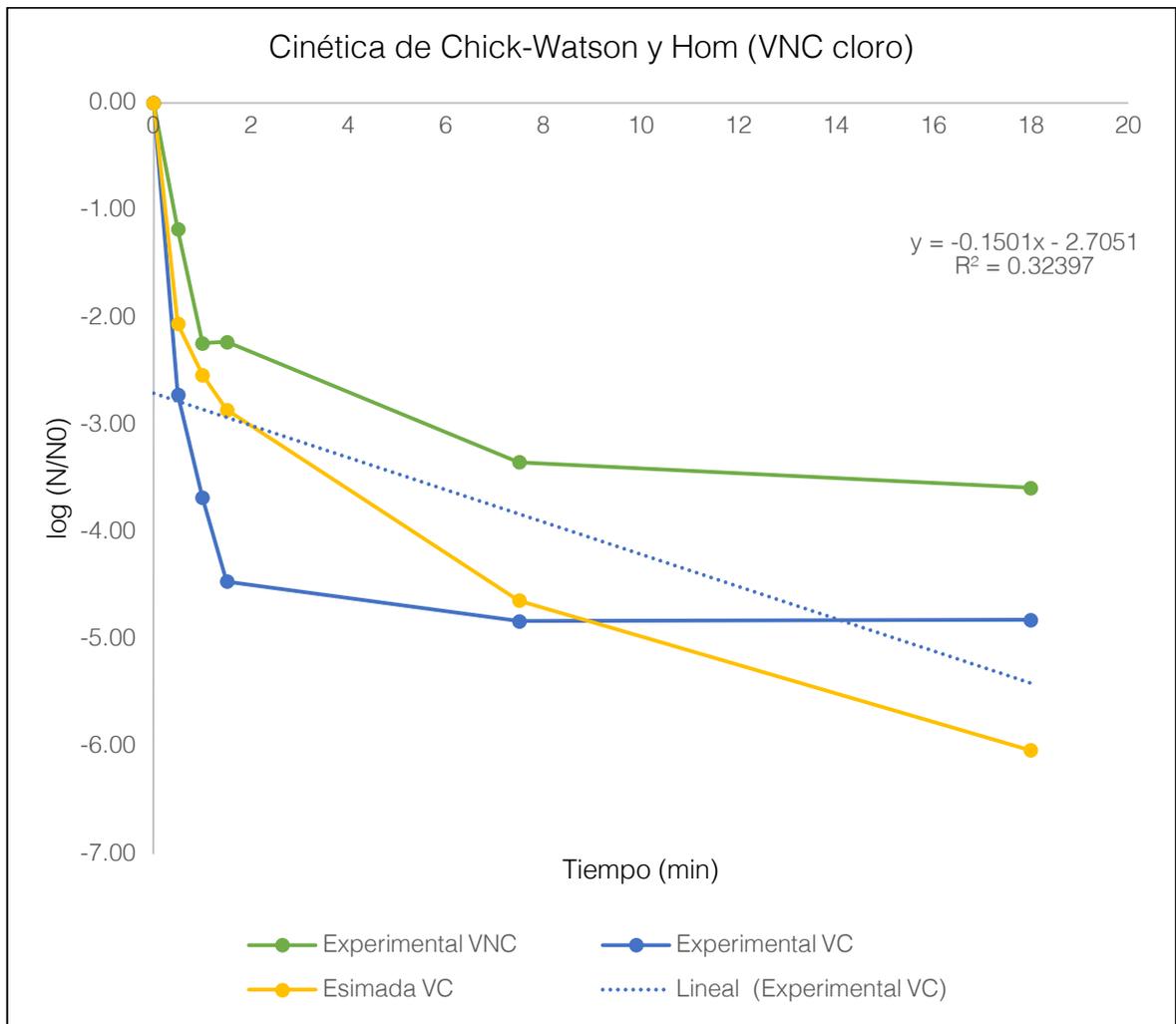
k	1.5
n	2
m	0.3
C	1.3

$$\ln \frac{N}{N_0} = -KC^n t^m \dots\dots\dots(\text{Ecuación de Hom})$$

Valores de las constantes de Chick-Watson obtenidas mediante una regresión lineal

k	-2.70
n	1
m	-0.15
C	1.3

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K C t \dots\dots\dots(\text{Chick-Watson})$$



**Gráfica 5.22** Resultados de la cinética de desinfección para cloro

En la (**Gráfica 5.22**) se observa que el mejor ajuste a los datos se da con la ecuación de Hom, la cual tiene un ajuste con una  $R^2=0.65$  en comparación con el modelo lineal de Chick-Watson que tiene un ajuste con una  $R^2=0.32$ . En el caso del ajuste de Hom, el valor de  $n$  es mayor a 1, por lo tanto la concentración es más importante que el tiempo. Estos resultados eran esperados ya que los valores obtenidos experimentalmente tienen un comportamiento de tipo dicotómico con múltiples cinéticas, con una fase rápida inicial y una fase lenta al final lo que crea curvas con colas al final “tails”. Estos resultados son los que tienen el ajuste más bajo ya que se detectó una amplia desviación de lo calculado por la ecuación de Hom.

## 6 Resumen de resultados

### Etapa 1 Microbiología

### Etapa 2, Biología molecular, Cuantificación qPCR-PMA

- La técnica de qPCR-PMA en comparación con qPCR es más exacta en la medición de genomas de bacterias viables (hasta 23% de diferencia en el conteo), por lo que se deberá utilizar la técnica de qPCR en combinación con un colorante de viabilidad.
- El análisis transcriptómico es un estudio de alta especificidad el cual debe tener controles estrictos de calidad de las muestras (Eliminación de DNA, purificación de RNA mensajero y réplicas biológicas).
  - Solo entre el 6-24 de la muestra fue correspondiente a RNA mensajero
  - Es posible utilizar el análisis transcriptómico para encontrar genes que se expresen en un estado metabólico en particular. En este estudio se encontró un gen de “aminoimidazole riboside kinase” como gen único para el estado VNC.

### Etapa 3, Prueba en agua de pozo

- La prueba de la técnica de detección en agua de pozo indica que se puede utilizar ésta en agua de pozo con calidad baja (Alto contenido orgánico y COT)
- El parámetro que tienen mayor interferencia en la técnica molecular es la que está relacionada con la medición del COT.
- Las condiciones socioeconómicas de la región de Huejutla explican el por qué se dio un brote en dicha comunidad
- El pozo de “La caldera” presenta condiciones muy bajas de calidad, por lo que se debe monitorear bien la desinfección en la plata potabilizadora por el alto contenido de materia orgánica.

- La técnica de detección tiene la capacidad de detectar desde 30 bacterias de *H. pylori* y *V. cholerae*, por lo que esta técnica puede ser utilizada en posteriores brotes

### Etapa 4, Desinfección

#### Ozono

- El modelo de operación para generar una solución stock de ozono mostró que la columna se estabiliza a las 25 minutos de operación
- Por debajo de 0.8 mg/L las concentraciones de ozono residual se mantienen inestables en el tiempo
  - El material de plástico no consume ozono residual
  - La demanda de ozono con la bacteria es de 0.2 mg/L
- Una concentración de arriba de 1 mg/L es la indicada para trabajar con la desinfección y garantizar que el ozono residual se mantenga presente durante el tiempo de contacto.

#### Cloro

- El cloro es un compuesto químico fácil de operar
- Por debajo de 1 mg/L y arriba de 3 mg/L las concentraciones de cloro libre se mantienen inestables en el tiempo (ideal trabajar entre 1-3 mg/L)
  - El material de plástico no consume cloro residual
  - La demanda de cloro con la bacteria es de 0.3 mg/L

### Ensayo de desinfección con ozono y cloro (*H.pylori*)

#### Ozono

- Los efectos con mayor significancia se encuentran por debajo de un CT=3
- La forma VNC es más resistente al ozono en los valores de CT más bajos (CT=0.2 presenta una diferencia de 0.64 log)
  - Todos los valores resultaron estadísticamente significativos
- Cambios morfológicos están implicados en la resistencia de la forma VNC
- Los valores de CT reportados para una inactivación 2-log están cercanos a los valores donde se encuentran las diferencias más grandes entre ambas formas metabólicas
- A valores de CT por arriba de 0.4 se observa que el comportamiento se vuelve similar para ambas formas metabólicas por lo que se comprueba que el poder oxidante del ozono puede inactivar las bacterias
- Se debe aplicar un valor CT de 0,6 mg min/L para garantizar una inactivación de 3 log
- El mejor ajuste se da con la ecuación de Hom ( $R^2=0.83$ ) y el valor de  $n>1$  por lo que la concentración es más importante que el tiempo

#### Cloro

- Los efectos con mayor significancia se encuentran por debajo de un CT=10

- La forma VNC es más resistente al cloro en los valores de CT por debajo de 2 (CT=0.5, 1, 1.5 es donde se presenta las diferencia más altas 1 log)
  - Todos los valores resultaron estadísticamente significativos
  - Cambios morfológicos están implicados en la resistencia de la forma VNC
- Los valores de CT reportados para una inactivación 2-log están cercanos a los valores donde se encuentran las diferencias más grandes entre ambas formas metabólicas
- Se debe aplicar un valor CT de 1.5 mg min/L para garantizar una inactivación de 3 log
- El mejor ajuste se da con la ecuación de Hom ( $R^2=0.90$ ) y el valor de  $n < 1$  por lo que la concentración es igual de importante que el tiempo de contacto

### Ensayo de desinfección con ozono y cloro (*V.cholerae*)

#### Ozono

- Los efectos con mayor significancia se encuentran por debajo de un CT=3
- La forma VNC es más resistente al ozono en los valores de CT más bajos (CT=0.5 presenta una diferencia de 1.56 log)
  - Todos los valores resultaron estadísticamente significativos
  - Cambios morfológicos están implicados en la resistencia de la forma VNC
- Los valores de CT reportados para una inactivación 2-log están cercanos a los valores donde se encuentran las diferencias más grandes entre ambas formas metabólicas (casi 2-log de diferencia)
- A valores de CT por arriba de 1 se observa que el comportamiento se vuelve similar para ambas formas metabólicas por lo que se comprueba que el poder oxidante del ozono puede inactivar las bacterias
- Se debe aplicar un valor CT de 1 mg min/L para garantizar una inactivación de 2 log
- El mejor ajuste se da con la ecuación de Hom ( $R^2=0.94$ ) y el valor de  $n < 1$  por lo que la concentración es igual de importante que el tiempo de contacto

#### Cloro

- Los efectos con mayor significancia se encuentran por debajo de un CT=10
- La forma VNC es más resistente al cloro en todos los valores de CT (las diferencia más altas es alrededor de 1.53 log en todos los puntos)
  - Todos los valores resultaron estadísticamente significativos
  - Cambios morfológicos están implicados en la resistencia de la forma VNC
- Los valores de CT reportados para una inactivación 2-log están cercanos a los valores donde se encuentran las diferencias más grandes entre ambas formas metabólicas
- Se debe aplicar un valor CT de 1.5 mg min/L para garantizar una inactivación de 3 log
- El mejor ajuste se da con la ecuación de Hom ( $R^2=0.65$ ) y el valor de  $n > 2$  por lo que la concentración es más importante que el tiempo de contacto

## 7 Conclusiones

Se logró inducir el estado viable no cultivable de *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* en agua de mar artificial y se comprobó la presencia de dicho estado metabólico por medio del uso del colorante fluorescente (LIVE/DEAD) con el cual se detectó y cuantificó la señal de fluorescencia, lo cual permitió de manera sistematizada conocer el proceso de inducción al estado viable no cultivable.

Se obtuvo una secuencia genómica específica para detectar el estado viable no cultivable de *Vibrio cholerae* de acuerdo al análisis transcriptómico de 3 estados metabólicos. El uso de esta secuencia como marcador del estado VNC permite la diferenciación entre formas metabólicas con un nivel de certeza alto y rapidez en los resultados.

Se logró la detección y cuantificación de las formas viables de *H.pylori* PMA en suspensión acuosa mediante el uso de la técnica qPCR-PMA la cual tiene la ventaja de ser una técnica independiente de cultivo y obtener resultados en 2 horas.

Se determinaron las dosis y tiempos de contacto necesarias para inactivar a las bacterias *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* en medio acuoso en el estado viable cultivable y viable no cultivable utilizando técnicas moleculares las cuales cuentan con una alta precisión.

De acuerdo al diseño de experimentos planteado se obtuvo la resistencia a la desinfección comparando las formas viables no cultivables con la forma reportada en la literatura así como las constantes cinéticas de inactivación para ambos estados metabólicos con lo que se observó la resistencia a la desinfección adquirida en el proceso de inducción.

## 8 Referencias

- Amoako, K.K., Janzen, T.W., Shields, M.J., Hahn, K.R., Thomas, M.C., Goji, N., 2013. Rapid detection and identification of *Bacillus anthracis* in food using pyrosequencing technology. *International Journal of Food Microbiology* 165, 319–325. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.028
- Amoako, K.K., Thomas, M.C., Kong, F., Janzen, T.W., Hahn, K.R., Shields, M.J., Goji, N., 2012. Rapid detection and antimicrobial resistance gene profiling of *Yersinia pestis* using pyrosequencing technology. *Journal of Microbiological Methods* 90, 228–234. doi:10.1016/j.mimet.2012.05.012
- Baker, K.H., Hegarty, J.P., Redmond, B., Reed, N.A., Herson, D.S., 2002. Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 981–984. doi:10.1128/AEM.68.2.981-984.2002
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E., 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 485–494. doi:10.1007/s00253-006-0615-z
- Brinkman, N.E., Francisco, R., Nichols, T.L., Robinson, D., Schaefer, F.W., Schaudies, R.P., Villegas, E.N., 2013. Detection of multiple waterborne pathogens using microsequencing arrays. *J Appl Microbiol* 114, 564–573. doi:10.1111/jam.12073
- Chua, A.L., Elina, H.T., Lim, B.H., Yean, C.Y., Ravichandran, M., Lalitha, P., 2011. Development of a dry reagent-based triplex PCR for the detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae*. *Journal of Medical Microbiology* 60, 481–485. doi:10.1099/jmm.0.027433-0
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczeniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X., Mortazavi, A., 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 1–19. doi:10.1186/s13059-016-0881-8
- de Salud, S., 2015. Prevención de Enfermedades Diarreicas Agudas y Cólera 1–76.
- de Velásquez, M.O., Noguez, I.Y., 2017. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental* .... doi:10.1080/09593330.2016.1210680
- Fan, H., Wu, Q., Kou, X., 2008. Co-detection of five species of water-borne bacteria by multiplex PCR. *Life Sci J.*
- Fykse, E.M., Nilsen, T., Nielsen, A.D., Tryland, I., Delacroix, S., Blatny, J.M., 2012. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water. *Marine Pollution Bulletin* 64, 200–206. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.12.007
- Guilbaud, M., de Coppet, P., Bourion, F., Rachman, C., Prévost, H., Dousset, X., 2005. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Biofilms by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2190–2194. doi:10.1128/AEM.71.4.2190-2194.2005
- Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A., 2003. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5178–5185. doi:10.1128/AEM.69.9.5178-5185.2003
- Haas, B.J., Chin, M., Nusbaum, C., Birren, B.W., Livny, J., 2012. How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? *BMC Genomics* 13, 1–1. doi:10.1186/1471-2164-13-734
- Hoshino, T., Yilmaz, L.S., Noguera, D.R., Daims, H., Wagner, M., 2008. Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5068–5077. doi:10.1128/AEM.00208-08
- Ishii, S., Kitamura, G., Segawa, T., Kobayashi, A., Miura, T., Sano, D., Okabe, S., 2014a. Microfluidic Quantitative PCR for Simultaneous Quantification of Multiple Viruses in Environmental Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 7505–7511. doi:10.1128/AEM.02578-14

- Ishii, S., Nakamura, T., Ozawa, S., Kobayashi, A., Sano, D., Okabe, S., 2014b. Water Quality Monitoring and Risk Assessment by Simultaneous Multipathogen Quantification. ... science & technology. doi:10.1021/es500578s
- Johnson, C.N., Flowers, A.R., Noriega, N.F., Zimmerman, A.M., Bowers, J.C., DePaola, A., Grimes, D.J., 2010. Relationships between Environmental Factors and Pathogenic Vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7076–7084. doi:10.1128/AEM.00697-10
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Hill, V.R., Lu, X., Sobsey, M.D., Erdman, D.D., 2005. Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3131–3136. doi:10.1128/AEM.71.6.3131-3136.2005
- KOTHARY, M.H., BABU, U.S., 2001. INFECTIVE DOSE OF FOODBORNE PATHOGENS IN VOLUNTEERS: A REVIEW. *Journal of Food Safety* 21, 49–68. doi:10.1111/j.1745-4565.2001.tb00307.x
- Kramer, M.F., Vesey, G., Look, N.L., Ben R Herbert, Simpson-Stroot, J.M., Lim, D.V., 2007. Development of a Cryptosporidium oocyst assay using an automated fiber optic-based biosensor. *Journal of Biological Engineering* 2007 1:1 1, 3. doi:10.1186/1754-1611-1-3
- Krueger, W.S., Hilborn, E.D., Converse, R.R., Wade, T.J., 2015. Environmental risk factors associated with Helicobacter pylori seroprevalence in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. *Epidemiol. Infect.* 143, 2520–2531. doi:10.1017/s0950268814003938
- Kuehl, B., Marten, S.-M., Bischoff, Y., Brenner-Weiß, G., Obst, U., 2011. MALDI-ToF mass spectrometry–multivariate data analysis as a tool for classification of reactivation and non-culturable states of bacteria. *Anal Bioanal Chem* 401, 1593–1600. doi:10.1007/s00216-011-5227-5
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 449–490. doi:10.1128/CMR.00054-05
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Liu, W.-T., Boon, N., Köster, O., Vrouwenvelder, H., Egli, T., Hammes, F., 2013. A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks. *Water Research* 47, 3015–3025. doi:10.1016/j.watres.2013.03.002
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F., Ferré, V., 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology* 155, 11–15. doi:10.1016/j.resmic.2003.09.013
- Lee, D.-Y., Lauder, H., Cruwys, H., Falletta, P., Beaudette, L.A., 2008. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Science of The Total Environment* 398, 203–211. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.004
- Lee, D.-Y., Seto, P., Korczak, R., 2010. DNA microarray-based detection and identification of waterborne protozoan pathogens. *Journal of Microbiological Methods* 80, 129–133. doi:10.1016/j.mimet.2009.11.015
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5, 130. doi:10.3389/fmicb.2014.00258
- Linke, S., Lenz, J., Gemein, S., Exner, M., Gebel, J., 2010. Detection of Helicobacter pylori in biofilms by real-time PCR. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 176–182. doi:10.1016/j.ijheh.2010.03.006
- Long, F., He, M., Shi, H.C., Zhu, A.N., 2008. Development of evanescent wave all-fiber immunosensor for environmental water analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 952–958. doi:10.1016/j.bios.2007.09.013
- Long, F., He, M., Zhu, A.N., Shi, H.C., 2009. Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2346–2351. doi:10.1016/j.bios.2008.12.003
- Lu, X., Zhang, X.-X., Wang, Z., Huang, K., Wang, Y., Liang, W., Tan, Y., Liu, B., Tang, J., 2015. Bacterial Pathogens and Community Composition in Advanced Sewage Treatment

- Systems Revealed by Metagenomics Analysis Based on High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 10, e0125549. doi:10.1371/journal.pone.0125549
- Masago, Y., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., 2006. Quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in river water by quenching probe PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Water Science & Technology* 54, 119–126. doi:10.2166/wst.2006.457
- Mathur, H., C Rea, M., 2016. Flow Cytometry as a Tool to Study the Effects of Bacteriocins on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *J Mol Biomark Diagn* 01, 1–8. doi:10.4172/2155-9929.S8-013
- Maynard, C., Berthiaume, F., Lemarchand, K., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., Brousseau, R., 2005. Waterborne Pathogen Detection by Use of Oligonucleotide-Based Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8548–8557. doi:10.1128/AEM.71.12.8548-8557.2005
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., de León, S.P., Cravioto, A., 2001. *Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City. *Archives of Medical Research* 32, 458–467. doi:10.1016/S0188-4409(01)00304-6
- Min, J., Baeumner, A.J., 2002. Highly Sensitive and Specific Detection of Viable *Escherichia coli* in Drinking Water. *Analytical Biochemistry* 303, 186–193. doi:10.1006/abio.2002.5593
- Moore, L.R., Coe, A., Zinser, E.R., Saito, M.A., Sullivan, M.B., Lindell, D., Frois-Moniz, K., Waterbury, J., Chisholm, S.W., 2007. Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnology and Oceanography: Methods* 5, 353–362. doi:10.4319/lom.2007.5.353
- Morishige, Y., Fujimori, K., Amano, F., 2015. Use of Flow Cytometry for Quantitative Analysis of Metabolism of Viable but Non-culturable (VBNC) *Salmonella*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38, 1255–1264. doi:10.1248/bpb.b15-00005
- National Research Council, 1980. *Drinking Water and Health*, Volume 2. National Academies Press, Washington, D.C. doi:10.17226/1904
- Orta de Velásquez, M.T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B., Monje-Ramírez, I., 2014. *Agua y saneamiento* 49, 61.
- Park, S., Kim, Y.T., Kim, Y.-K., 2010. Optical enzyme-linked immunosorbent assay on a strip for detection of *Salmonella typhimurium*. *BioChip J* 4, 110–116. doi:10.1007/s13206-010-4204-y
- Park, Y., Cho, Y.-H., Jee, Y., Ko, G., 2008. Immunomagnetic Separation Combined with Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Norovirus in Contaminated Food. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4226–4230. doi:10.1128/AEM.00013-08
- Pinto, D., Santos, M.A., Chambel, L., 2013. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 61–76. doi:10.3109/1040841X.2013.794127
- Plate, L., Marletta, M.A., 2012. Nitric Oxide Modulates Bacterial Biofilm Formation through a Multicomponent Cyclic-di-GMP Signaling Network. *Molecular Cell* 46, 449–460. doi:10.1016/j.molcel.2012.03.023
- Ram, S., Vajpayee, P., Shanker, R., 2008. Rapid Culture-Independent Quantitative Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Surface Waters by Real-Time PCR with Molecular Beacon. *Environmental science & ...* doi:10.1021/es703033u
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., Shinoda, S., 2014. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Public Health* 2, 93. doi:10.3389/fpubh.2014.00103
- Ramírez-Castillo, F., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F., Harel, J., Guerrero-Barrera, A., 2015. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens* 4, 307–334. doi:10.3390/pathogens4020307
- RAO, V.K., SHARMA, M.K., GOEL, A.K., SINGH, L., SEKHAR, K., 2006. Amperometric Immunosensor for the Detection of *Vibrio cholerae* O1 Using Disposable Screen-printed Electrodes. *Analytical Sciences* 22, 1207–1211. doi:10.2116/analsci.22.1207
- Rochelle, P.A., Ferguson, D.M., Handojo, T.J., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1997. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and

- determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2029–2037.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113, 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- She, F.-F., 2003. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World Journal of Gastroenterology* 9, 516. doi:10.3748/wjg.v9.i3.516
- Signoretto, C., Canepari, P., 2008. Towards more accurate detection of pathogenic Gram-positive bacteria in waters. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 248–253. doi:10.1016/j.copbio.2008.03.001
- Solnick, J.V., Hansen, L.M., Canfield, D.R., Parsonnet, J., 2001. Determination of the Infectious Dose of *Helicobacter pylori* during Primary and Secondary Infection in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Infection and Immunity* 69, 6887–6892. doi:10.1128/IAI.69.11.6887-6892.2001
- Strepparava, N., Wahli, T., Segner, H., Polli, B., Petrini, O., 2012. Fluorescent In Situ Hybridization: A New Tool for the Direct Identification and Detection of *F. psychrophilum*. *PLoS ONE* 7, e49280. doi:10.1371/journal.pone.0049280
- Tsen, H.Y., Lin, C.K., Chi, W.R., 1998. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J Appl Microbiol* 85, 554–560. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853535.x
- Vouga, M., Greub, G., 2016. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. *Clinical Microbiology and Infection* 22, 12–21. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.010
- Wilson, W.J., Strout, C.L., DeSantis, T.Z., Stilwell, J.L., Carrano, A.V., Andersen, G.L., 2002. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Molecular and Cellular Probes* 16, 119–127. doi:10.1006/mcpr.2001.0397
- Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., Yu, X., 2015. UV Disinfection Induces a Vbnc State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1721–1728. doi:10.1021/es505211e
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W., Ding, T., 2017. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 8, 656–16. doi:10.3389/fmicb.2017.00580

