



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“PROPUESTA DE UN PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR
CÉLULAS DE *VIBRIO CHOLERAE* EN ESTADO VIABLE NO
CULTIVABLE UTILIZANDO CALORIMETRÍA DIFERENCIAL
DE BARRIDO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LIC. EN QUÍMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

Ricardo Omar Navarro Cortez



**DIRECTOR DE TESIS
Dr. CARLOS A. GÓMEZ ALDAPA**



Este trabajo se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en el Centro de Investigaciones Químicas, en el laboratorio de Biotecnología y Alimentos II, bajo la dirección del Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa y asesoría del Dr. Javier Castro Rosas, formando parte del proyecto denominado “Propuesta de un protocolo para identificar células de *Vibrio cholerae* en Estado Viable No Cultivable utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido”



AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme permitido terminar esta etapa de mi vida en compañía de mis abuelitos, padres, hermanos, esposa e hija y demás familiares. Por haberme dado nuevas oportunidades para redimir mi mal camino y terminar mis estudios profesionales.

A mis padres: Apolinar Navarro y Esthela Cortez, que me brindaron la oportunidad de estudiar, por comprenderme, entenderme y apoyarme para concluir con mis estudios y con este proyecto.

A mis hermanos: Ma. de los Angeles y Gustavo Adolfo, por su apoyo incondicional y cariño que me han ofrecido todos estos años que hemos tenido de convivencia.

A mi esposa Beatriz Peña, que me ha apoyado en todo momento para salir adelante en los momentos de adversidad y festejar conmigo los momentos de alegría.

A mi hija Astrid Naely, que es la que me ha motivado a alcanzar mis metas, que nunca me ha reclamado el tiempo que no he pasado con ella y por su comprensión, quién a pesar de su corta edad entiende el motivo de mi ausencia.

A mis suegros: Juan F. Peña y Alicia Martín, que al igual que mi familia me brindaron su comprensión y apoyo incondicional, pero sobre todo les agradezco que hayan cuidado de mi hija.

Al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa y al Dr. Javier Castro Rosas, por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su guía, por sus consejos, por creer en mi y alentarme a seguir estudiando, por su amistad incondicional y por los momentos de convivencia en los cuales me hacían reflexionar sobre mis actos.

A todos los profesores que participaron en mi formación profesional por compartir sus conocimientos.

A todas aquellas personas que le dedicaron un momento de su tiempo para la revisión y sugerencias para mejorar el contenido de este proyecto.

Índice General

Índice General	iv
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	viii
Resumen.	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	4
2.1.- Bacterias.	4
2.1.1.- Definición.	4
2.1.2.- Estructura bacteriana.	4
2.1.2.1.- Elementos obligados	4
2.2 Clasificación de las bacterias	6
2.2.1 Bacterias Gram positivas	7
2.2.2 Bacterias Gram negativas	8
2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido	8
2.3.1 Usos de la calorimetría aplicada a células bacterianas	9
2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) aplicada a proteínas	11
2.4 Estado viable no cultivable de las bacterias	14
2.4.1 Factores que inducen el aparente EVNC	16
2.4.2 Detección de células en posible EVNC	16
2.4.3 Implicaciones sanitarias	20
2.4.4 Cambios morfológicos y fisiológicos	20
2.4.5 Reversión del EVNC	21
2.5 Aspectos microbiológicos de <i>Vibrio cholerae</i>	26
2.5.1 Ecología de <i>Vibrio cholerae</i> O1	27
III. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general.	28
3.2 Objetivos específicos.	28
IV. Metodología experimental	28
4.1 Metodología	29
4.1.1 Obtención de la cepa	29
4.1.2 Desarrollo de la cepa de <i>Vibrio cholerae</i> en agar TCBS	29

4.1.3 Tinción Gram	30
4.1.4 Inducción del Estado Viable No Cultivable	30
4.1.5 Conteo en placa	31
4.2 Preparación de las muestra para el calorímetro	31
4.2.1 Método para evaluar el EVNC con adición de agua destilada	31
4.2.2 Método para evaluar el EVNC sin adición de agua destilada	32
4.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido	32
V. Resultados y Discusión	33
5.1 Resultados del conteo de placa	33
5.2 Resultados del DSC	34
VI. Conclusiones y sugerencias	40
VII. Bibliografía	41

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de un calorímetro diferencial de barrido (DSC).	12
Figura 2. Termograma de <i>Vibrio cholerae</i> obtenido con el método con agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al tiempo cero.....	35
Figura 3. Termograma de <i>Vibrio cholerae</i> obtenido con el método sin agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al tiempo cero.....	36
Figura 4. Termograma de <i>Vibrio cholerae</i> obtenido con el método con agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al final del experimento.....	37
Figura 5. Termograma de <i>Vibrio cholerae</i> obtenido con el método sin agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al final del experimento.	38

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
°C	Grados centígrado
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EVNC	Estado Viable No Cultivable
J/g	Joule - gramo
mL	Mililitro
min	Minutos
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
T°	Temperatura
Tm	Temperatura media
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonia
TCBS	Tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa.
ΔH	Diferencia de entalpía
ΔS	Diferencia de entropía

Resumen.

En el presente trabajo se propuso un protocolo para identificar células de *V. Cholerae* en Estado Viable No Cultivable utilizando calorimetría diferencial de barrido. El estado viable no cultivable (EVNC) de células de *Vibrio cholerae*, se trató de inducir inoculando células de *Vibrio cholerae* en agua de mar y refrigerándolas a 4 °C durante un mes. Para la preparación de la muestra se emplearon 2 métodos diferentes, uno utilizando agua destilada y solución salina isotónica para el lavado de las células y en el otro utilizando únicamente solución salina, para la obtención de las células de *Vibrio cholerae* se colocaron 70 mL del agua de mar inoculada con *Vibrio cholerae* en 2 tubos para centrífuga de 35 mL cada uno, éstos se centrifugaron a 3500 rpm, después se lavaron unos con agua destilada y solución salina y otros con solución salina, después de agregarles tanto el agua destilada como la solución salina se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, al centrifugar las células de *Vibrio cholerae* precipitan, posteriormente se usó una pipeta Pasteur para depositar el contenido de los tubos en cápsulas de acero inoxidable. Se usó un DSC Mettler Toledo, para detectar la estabilidad térmica de células de *Vibrio cholerae*. Para evaluar la estabilidad de las células, se usó un método de 4 a 180 °C con una velocidad de calentamiento fija de 5°C/min. La habilidad para formar colonias en el estado viable no cultivable se evaluó mediante un conteo en placa, los resultados obtenidos en el conteo en placa nos indican que las células de *Vibrio cholerae* nunca entraron al estado viable no cultivable, con estos resultados solo se evidencia que las células van perdiendo la capacidad para formar colonias cuando se encuentran condiciones adversas para ellas, como la temperatura, pH, concentración salina y concentración de nutrientes en un determinado lapso de tiempo. En los termogramas obtenidos por calorimetría, uno de ellos presentó eventos térmicos observables, fue en el que utilizó agua destilada para la obtención de la muestra, en este termograma, se observaron 3 eventos térmicos, el primero es un pico grande a temperaturas de 60 a 80°C asociado con la desnaturalización de ribosomas, el segundo es a temperaturas de 80 a 100°C asociado con la fusión del ADN.

I. Introducción.

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que detecta y monitorea las transiciones conformacionales inducidas térmicamente. El calorímetro diferencial de barrido mide el diferencial de flujo de calor entre un crisol de referencia y un crisol con muestra en función de la temperatura a una tasa de calentamiento fija. A medida que las células son calentadas, éstas incrementan su temperatura dependiendo de la capacidad calorífica de las células. Cerca de la temperatura donde los componentes celulares pasan de una transición de orden a desorden se observan picos en los diagramas de capacidad calorífica contra temperatura en dirección positiva (absorción de calor) o en dirección negativa (pérdida de calor).

La calorimetría diferencial de barrido ha sido utilizada para el estudio de sistemas biológicos para observar y explicar los cambios intracelulares y la desnaturalización del ADN en células bacterianas.

El concepto de célula viva o viabilidad celular es referido en la literatura de diferentes formas. Hasta hace algún tiempo, la capacidad para cultivar microorganismos en un medio de laboratorio, constituía una herramienta decisiva para determinar la viabilidad de las bacterianas provenientes de diferentes muestras ambientales.

Por ejemplo Valentine y Bradfiel (1954), propusieron el término viable para describir células capaces de crecer y formar colonias en un medio de cultivo, y el término vivo para células con metabolismo respiratorio capaces de dividirse bajo las mismas condiciones.

Las bacterias Gram-negativas que sobreviven en agua de mar y en agua fresca son conocidas por entrar en un estado viable no cultivable, en el cual estas bacterias no desarrollan sobre medios de cultivo convencionales, cuando se encuentran en condiciones adversas para su desarrollo como la temperatura, pH, concentración salina y escasez de nutrientes, pero retienen su actividad metabólica

y su capacidad patógena. Se ha demostrado que *Vibrio cholerae*, la bacteria Gram-negativa responsable de enfermedades diarreicas y bacteria entérica, puede entrar en el estado viable no cultivable en respuesta a condiciones adversas del medio ambiente. En este estado las células reducen su tamaño.

Este trabajo está enfocado a proponer un protocolo para determinar la presencia de *Vibrio cholerae* en la condición viable no cultivable utilizando calorimetría diferencial de barrido.

II. Antecedentes.

2.1.- Bacterias.

2.1.1.- Definición.

Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos, relativamente sencillos que se reproducen por fisión binaria y se caracterizan porque su material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se llaman procariotas.

Su tamaño se mide en μm y oscila entre 0.2 y 2 μm

2.1.2.- Estructura bacteriana.

Estructuralmente están constituidos por:

Elementos obligados: están presentes en todas las bacterias y son indispensables para la vida de la bacteria, como la pared celular, la membrana plasmática, el citoplasma, los ribosomas y la región nuclear.

Elementos facultativos pueden estar o no presentes en la bacteria y son: la cápsula, los flagelos, las endosporas e inclusiones citoplasmáticas.

2.1.2.1.- Elementos obligados

Pared celular

Es el límite externo de la célula, tiene una estructura rígida debido al peptidoglicano. La pared celular rodea a la membrana citoplasmática y confiere a la bacteria una morfología típica. La adquisición de este tipo de estructuras, a modo de exoesqueleto, ha servido a las bacterias como mecanismo de adaptación al medio externo, protegiéndola de su posible lisis, ya sea osmótica o mecánica, proporciona a la bacteria resistencia contra los antibióticos (Salton 1994). Además

de ser el medio de intercambio de solutos entre el exterior y el interior celular. La pared bacteriana sirve de punto de unión para toda una batería de proteínas implicadas en procesos de crecimiento y división celular, y en las interacciones de la célula con el medio exterior. De hecho, la pared desempeña un papel importante en los procesos de colonización, adherencia, inflamación e invasión bacteriana (McCullers y Tuomanen 2001).

Membrana plasmática

Estructura delgada que se extiende por dentro de la pared celular, encerrando al citoplasma de la célula, actúa como barrera selectiva, contiene las proteínas y otros componentes de la respiración celular y fosforilación oxidativa, interviene en la degradación de nutrientes y en la producción de energía. Está compuesta por fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos forman una doble capa que engloba a las proteínas globulares que se disponen plegadas de forma irregular.

Citoplasma

El citoplasma bacteriano es un gel de alta presión osmótica, que engloba a todos los orgánulos celulares. Visto al microscopio electrónico muestra un aspecto finamente granular, debido a su alto contenido en ribosomas e inclusiones de diversos materiales nutritivos que las bacterias almacenan en forma insoluble, formado por un 80% de agua, enzimas, iones.

Aproximadamente en el centro del citoplasma se localiza el material genético de la bacteria, organizado en un nucleóide, este material genético consiste de un cromosóide único formado por ADN de doble hebra.

2.2 Clasificación de las bacterias

Los procariotas se dividen dentro de tres grupos, distinguidos por la naturaleza de la envoltura celular. El grupo más pequeño es el de las micoplasmas, estos no poseen pared celular; la membrana es el límite externo de la célula. Las micoplasmas, por consiguiente son osmóticamente frágiles y solo pueden sobrevivir en un ambiente externo isosmótico con el contenido celular.

Todos los demás procariotas tienen pared celular y dos grupos principales son distinguidos por sus propiedades químicas específicas y la estructura de su pared celular. Éstos son llamados bacterias Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a la reacción celular con un procedimiento llamado tinción de Gram

El procedimiento de la tinción Gram fue desarrollado en 1884 por un físico Danés estudiante en Berlín Christian Gram. Él observó tejidos de pulmón durante autopsias de individuos que habían muerto de neumonía. Él notó que el *Streptococcus pneumoniae* encontrado en los tejidos de pulmón retenía el primer tinte conocido como marcador café (ahora es usado el cristal violeta), mientras que el tejido del pulmón no se teñía. Posteriormente se determinó que ciertas bacterias conocidas con el término de Gram positivas retenían el cristal violeta cuando se teñían con este método, mientras las Gram negativas no retenían este tinte. La tinción Gram es llamada tinción diferencial por que se distinguen estos dos grupos de bacterias.

Procedimiento:

Coloración primaria: preparar un frotis de la bacteria y teñir con cristal violeta, ambas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas se tiñen de color violeta.

Mordente: inundar la preparación con una solución de yoduro de potasio y yodo, esto fija el cristal violeta con el material celular.

Decoloración: lavar con etanol el frotis teñido. El cristal violeta es lavado de las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta y quedan teñidas de un color violeta.

Coloración de contraste: teñir la preparación con safranina. Las bacterias Gram negativas se tiñen de rosa.

Una clase de polímero que constituye la pared celular es el peptidoglicano, sintetizado solamente por los procariontes, es común tanto en las bacterias Gram positivas como en las Gram negativas. El peptidoglicano es un heteropolímero, compuesto de dos amino azúcares y un pequeño número de aminoácidos.

2.2.1 Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas poseen una pared gruesa y uniforme, constituida principalmente de peptidoglicano responsable de la rigidez de la pared celular, este constituye del 40 al 80% del peso seco de la pared celular. Otros constituyentes de la pared celular de las bacterias Gram positivas incluyen al ácido teicoico y al ácido teicurónico. El ácido teicoico es polímero poliálcool fosfato, como el poliglicerol fosfato y el polirribitol fosfato, Las funciones primarias de estos polímeros son la estabilización del peptidoglicano y la captura de Magnesio. Azúcares como la glucosa y la galactosa, aminoazúcares como la glucosamina y el aminoácido D-alanina.

Las bacterias Gram positivas son formadoras de endosporas y tienen el crecimiento de un micelio vegetativo que les permite el movimiento. Además son más susceptibles a la actividad antibacteriana de colorantes básicos, detergentes aniónicos y catiónicos, al fenol, sulfamidas y penicilina, además son más resistentes a la actividad antibacteriana de ácidos, agentes oxidantes y a la estreptomycin. Siendo de igual forma más resistentes a la digestión de enzimas proteolíticas y a la acción de ruptura de los compuestos alcalinos.

Las bacterias Gram positivas contienen ribonucleótido de magnesio y pueden volverse Gram negativas tratándolas con ribonucleasa

Las bacterias Gram positivas son de forma cilíndrica y pueden formar esporas y son productoras de exotoxinas. Este mecanismo de protección lo llevan a cabo cuando los factores ambientales son adversos para ellas.

2.2.2 Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas son más complejas que las Gram positivas, ya que poseen varias capas de peptidoglicano y tienen otra capa llamada membrana externa. En la membrana externa de estas bacterias predominan proteínas y lípidos. La pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta del 11 al 22% de lípidos y están presentes todos los aminoácidos.

Las bacterias Gram negativas son más resistentes a la actividad antibacteriana de colorantes básicos, detergentes aniónicos y catiónicos, fenol, sulfamidas y penicilina.

El punto isoeléctrico de las proteínas presentes en las bacterias Gram negativas se encuentra en un rango de pH de 4 a 5. La mayor parte de las bacterias Gram negativas presentan forma de bacilos, espirilos y cocos, las cuales no forman esporas, pero si forman endotoxinas.

Las bacterias Gram negativas para defenderse de factores externos desfavorables, como la temperatura, el pH, la salinidad, la escasez de nutrientes y la presencia de antimicrobianos, entran en un estado de dormancia, conocido también como Estado Viable No Cultivable (EVNC).

2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que detecta y monitorea las transiciones conformacionales inducidas térmicamente. El calorímetro diferencial de barrido mide el diferencial de flujo de calor entre un crisol de referencia y un crisol con muestra en función de la temperatura a una tasa de calentamiento o enfriamiento fija.

A medida que las células son calentadas, éstas incrementan su temperatura dependiendo de la capacidad calorífica de las células. Cerca de la temperatura donde los componentes celulares pasan de una transición de orden a desorden se observan picos en los diagramas de capacidad calorífica contra temperatura en dirección positiva (absorción de calor) o en dirección negativa (pérdida de calor).

En la temperatura de transición para inducir las transformaciones térmicas, donde el calor involucrado en una transición es igual al área debajo del pico, estas medidas son calculadas por el DSC. Las temperaturas de transición son puntos de máxima capacidad calorífica (endotérmica) o mínima capacidad calorífica (exotérmica). De los termogramas obtenidos del DSC se pueden obtener valores térmicos (temperatura de transición) y valores termodinámicos (Energía libre de Gibbs. Entalpia), parámetros de transición adicionales para determinar la capacidad calorífica de la masa del material.

La ventaja de la calorimetría es aproximar un estudio termodinámico, se hacen medidas directas de la entalpia y la capacidad calorífica, el análisis y los datos recolectados no son específicos para un material en particular y para preparar la muestra antes de realizar el análisis, el material no requiere ser destruido (Lee and Kaletunc 2002).

2.3.1 Usos de la calorimetría aplicada a células bacterianas

Algunos investigadores han usado la calorimetría diferencial de barrido para llevar a cabo tratamientos de calor bajo condiciones controladas, incrementando la

temperatura, para determinar las transiciones inducidas térmicamente con el propósito de evaluar la relación entre la estabilidad de los componentes celulares y las células dañadas o muertas (Miles y otros 1986; Mackey y otros 1988; Mackey y otros 1991; Belliveau y otros 1992; Mackey y otros 1993).

Los valores de la viabilidad celular, basados en datos calorimétricos y conteo en placa, muestran una relación entre sí. Se han hecho estudios sobre los componentes celulares aislados y células intactas de *Escherichia coli* y *Lactobacillus plantarum*, para conocer la tolerancia térmica de estos dos microorganismos, mostrando los resultados que *Escherichia coli* tiene una mayor tolerancia térmica que *Lactobacillus plantarum*. La inactivación térmica de microorganismos está asociada con la desnaturalización irreversible de membranas, ribosomas y ácidos nucleicos. Sin embargo, los modelos de cambios de las macromoléculas que inducen la muerte de células de microorganismos mediante tratamiento térmico aun no se conocen claramente.

Un sin número de transiciones, con un efecto endotérmico neto, son observadas cuando los microorganismos son calentados. Los picos de las transiciones observadas corresponden a la desnaturalización de componentes celulares (Miles y otros 1986; Anderson y otros 1991; Mackey y otros 1991; Mohacsi y Farkas 1999; Kaletunc 2001).

Esto hace pensar que existe una relación estrecha entre la muerte térmica de la bacteria y el primer pico de los termogramas en el DSC en un rango de temperatura de 60 a 80 °C, que es atribuido a la fusión ribosomal (Mackey y otros 1993; Teixeira y otros 1997).

Varios investigadores han mostrado la relación entre la estabilidad de ribosomas y la viabilidad celular de *Staphilococcus aureus* (Allwood-Russel, 1967), *Listeria monocytogenes* (Stephens-Jones 1993) y *Salmonella typhimorium* (Tolker-Nielsen 1996).

Otros estudios aplicando la calorimetría diferencial de barrido fueron los que realizaron Victoria León y otros en el 2006, para evaluar la termoresistencia de bacterias ácido-lácticas en salchichas cocidas.

2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) aplicada a proteínas

La estabilidad y la organización estructural de una proteína, pueden ser estudiadas a través del proceso de desnaturalización inducido por la temperatura o por agentes químicos. La calorimetría diferencial de barrido mide la variación de la capacidad calorífica a presión constante, C_p , de un sistema con la temperatura, y permite monitorizar las transiciones inducidas térmicamente. El análisis de las mismas permite determinar los parámetros termodinámicos de las transiciones que tienen lugar durante su desnaturalización, siempre que tenga lugar en condiciones de equilibrio (Privalov 1979; Freire y otros 1990, Sánchez-Ruiz 1995), y es la única técnica que permite una medida directa del cambio energético del proceso (Privalov 1979; Freire y otros 1990).

Los calorímetros actuales operan en modo diferencial, midiendo la diferencia entre la capacidad calorífica de la celda de muestra y la celda de referencia (Figura 1). El sistema se calienta cuasi-adiabáticamente a velocidad constante, y la potencia eléctrica (CBF) necesaria para minimizar la diferencia de temperatura (ΔT) entre las dos celdas es proporcional a la diferencia de C_p entre las mismas (capacidad calorífica de exceso).

Se muestran las dos celdas (muestra y referencia) rodeadas por la coraza adiabática (en gris), y los sistemas de termoestabilización (TS) y retroalimentación (CFB y JFB) controlados por el ordenador. El barrido de temperatura se realiza de manera adiabática mediante un controlador de temperatura (JFB) que mantiene constante la diferencia de temperatura (ΔT_2) entre la coraza adiabática (gris) y la celda de temperatura constante. A velocidad de calentamiento constante, la potencia del CFB (retroalimentación de la celda de muestra) es proporcional a la capacidad calorífica de exceso entre la muestra y la referencia.

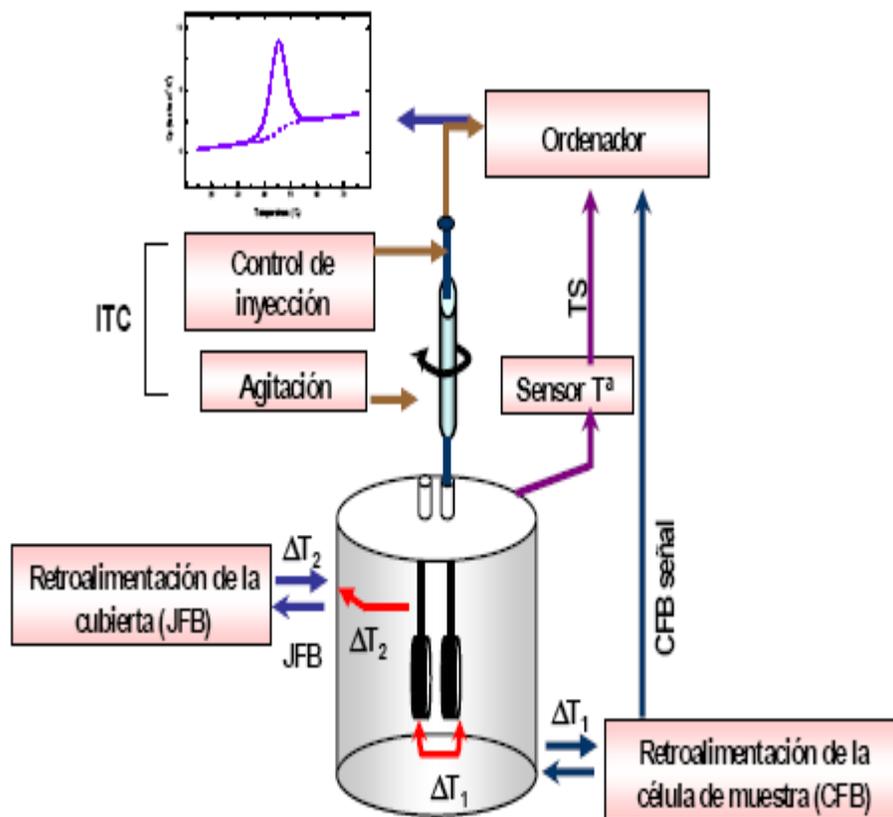


Figura 1. Representación esquemática de un calorímetro diferencial de barrido (DSC).

Las transiciones conformacionales inducidas por la variación de la temperatura en proteínas viene caracterizada por la presencia de uno o varios picos en el intervalo de temperatura en que tiene lugar la desnaturalización de la misma, mientras que los valores de C_p en las regiones de la pre y post-transición corresponden a la capacidad calorífica de la forma nativa ($N C_p$) y de la desnaturalizada ($D C_p$), respectivamente. La entalpía de desnaturalización, ΔHD , se obtiene por integración del área comprendida bajo la curva de la capacidad calorífica (Privalov 1979).

La relación existente entre ΔC_p y ΔS (variación de entropía) permite obtener ésta última como una función continua de la temperatura a partir de la integral definida en la ecuación [1], siendo la temperatura inicial (T_o) y la temperatura final (T_f) temperaturas situadas por debajo y por encima del intervalo de temperaturas en que tiene lugar la transición.

$$\Delta S = \int_{T_o}^{T_f} \frac{\Delta C_p}{T} dT \quad (1)$$

Conocidas ΔHD y ΔSD , puede calcularse la energía libre de Gibbs (ΔG) de desnaturalización a partir de la relación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, y conocer la dependencia de la estabilidad de la estructura nativa con la temperatura. En el caso de una proteína multidomínios, la función de estabilidad debe definirse para cada una de las regiones cooperativas en que se encuentra plegada la cadena polipeptídica.

Para una transición que sigue el modelo de equilibrio entre dos estados, sin cambios en el estado de asociación, la dependencia de la estabilidad de la estructura nativa con la temperatura vendría dada por la expresión:

$$\Delta G(T) = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left[(T - T_m) - T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \dots \dots \dots (2)$$

El análisis de los termogramas obtenidos durante la desnaturalización de una proteína permite obtener información sobre el número de estados implicados en el

proceso (sin necesidad de asumir un modelo previo para el proceso estudiado; Freire y Biltonen 1978); la organización de la cadena polipeptídica en dominios cooperativos y tamaño de los mismos; o la existencia de procesos acoplados a la pérdida de la estructura nativa (disociación de subunidades, ligaduras, etc); (Freire 1989; Brandts y Lin 1990; Sánchez-Ruiz 1995).

El análisis termodinámico y la obtención de información estructural mediante DSC están limitados, en principio, al estudio de procesos reversibles. Sin embargo, la desnaturalización térmica de proteínas es, frecuentemente, irreversible. En muchos de estos casos, el proceso está controlado cinéticamente, por lo que debe describirse mediante ecuaciones de velocidad (Sánchez-Ruiz 1992). En consecuencia, la forma de los termogramas obtenidos variará con la velocidad de barrido y la obtención de información termodinámica a partir del análisis de las curvas calorimétricas es posible, únicamente, en aquellos casos en los que la población de formas reversiblemente desnaturalizadas sea significativa dentro del intervalo de temperaturas en que se produce la transición, de tal forma que puedan aislarse las contribuciones de las formas reversible e irreversiblemente desnaturalizadas (Sánchez-Ruiz 1992; Varea y otros 2004).

2.4 Estado viable no cultivable de las bacterias

Antes de abordar el tema del EVNC, es importante mencionar lo qué se entiende por célula viable. El concepto de célula viva o viabilidad celular es referido en la literatura de diferentes formas. Hasta hace algún tiempo, la capacidad para cultivar microorganismos en un medio de laboratorio, constituía una herramienta decisiva para determinar la viabilidad de las bacterias provenientes de diferentes muestras ambientales. Dependiendo de la eficacia y/o selectividad del medio de cultivo empleado, la interpretación de viabilidad variaba, refiriéndose a ella con varios términos tales como: células vivas, células muertas, células vegetativas, células viables, células no viables, células estresadas, células dañadas o células moribundas. Por ejemplo, Valentine y Bradfield (1954), propusieron el término viable para describir células capaces de crecer y formar colonias en un medio de

cultivo y el término vivo para células con metabolismo respiratorio capaces de dividirse bajo las mismas condiciones. Postgate y Hunter (1962), dieron el nombre de células muertas a aquellas que no se dividen; sin embargo, consideraron que algunas veces la bacteria puede no dividirse y mantener características de células vivas, como es la integridad de la membrana. El término “moribundo” fue sugerido por Postgate (1967), para referirse a un estado intermedio a los anteriores. Postgate señala que las bacterias experimentan tal condición al encontrarse en un medio pobre en nutrientes y, por lo tanto, no son capaces de multiplicarse, aunque mantienen otras funciones metabólicas. El término “dormancia o latencia” es una palabra frecuentemente empleada para microorganismos que forman esporas o quistes (Dworkin 1979). Las esporas y los quistes producidos por algunos microorganismos son un mecanismo de sobrevivencia y se pueden encontrar en diversos grupos microbianos. La espora, además, le confiere resistencia a la bacteria ante diversos factores antimicrobianos (Dworkin 1979).

Kurath y Morita (1983), al igual que Valentine y Bradfiel (1954), definen como células viables a aquellas con capacidad de crecer y formar colonias y como no viables a las que han perdido tal capacidad.

En la década de los 80's, Roszak y otros (1984), describieron la existencia de células *Salmonella enteritidis* con actividad metabólica, aunque incapaces de crecer en un medio de cultivo. A estas células las designaron como viables pero no cultivables (VNC). Roszak y Colwell (1987), señalan que el estado VNC de las bacterias gram-negativas, podría ser un análogo de la forma esporulada de las bacterias gram-positivas.

En la actualidad el concepto más aceptado sobre el EVNC (según diferentes investigadores) se aplica a una forma de resistencia, en la cual, la célula bacteriana mantiene por tiempo indefinido su viabilidad y parte de su actividad metabólica (expresada mínimamente), pero que no crecen en los medios de cultivo (Byrd y otros 1991; Rahman y otros 1994; Huq and Colwell 1996). Una característica de las células en aparente condición VNC es que en el caso de las patógenas, mantienen

este potencial. Es decir, si un individuo, por ejemplo, ingiriera células de *V. cholerae* en la condición no cultivable, es posible que desarrolle un cuadro de cólera (Huq y Colwell 1996). El desarrollo del EVNC se ha demostrado en la mayoría de las bacterias patógenas no esporuladas y transmisibles por los alimentos (Huq y Colwell 1996); merece destacarse el caso de *V. cholerae* O1.

2.4.1 Factores que inducen el aparente EVNC

Diversos investigadores sugieren que factores tales como la temperatura, el pH, la salinidad, la presión osmótica, la escasez de nutrientes y la presencia de antimicrobianos inducen a las bacterias al EVNC (Xu y otros 1982; Huq y otros 1983; Ravel y otros 1995). Al parecer, la temperatura es el factor más importante. Investigaciones efectuadas por Rollin y Colwell (1986), mostraron que un incremento en la temperatura de cultivo de *Campylobacter jejuni* conduce a una disminución en la recuperación del patógeno en los medios de cultivo, no obstante que la población se mantiene viable. Xu y otros (1982), observaron que *V. cholerae* y *E. coli* entran al EVNC como respuesta al incremento de la salinidad del medio. Otros investigadores reportan que la escasez de nutrientes y la disminución de la temperatura del medio (4-5°), inducen a *V. cholerae* al EVNC (Ravel y otros 1995). La condición VNC se ha demostrado en bacterias patógenas como *Vibrio vulnificus* (Nilsson y otros, 1991), *Salmonella enteritidis* (Roszak y otros 1984), *Shigella sonnei* y *flexneri* (Colwell y otros 1985), *E. coli* O157:H7 (Rigsbeer y otros 1997), *Yersinia enterocolitica* (Singh y McFeters 1987) *Aeromonas salmonicida* (Morgan y otros 1991) y *Legionella pneumophila* (Hussong y otros 1987).

También se ha observado en bacterias no patógenas al hombre como *Pasteurella piscicida* (Maragiños y otros 1994), *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus faecalis* y *Micrococcus flavus* (Byrd y otros 1991).

2.4.2 Detección de células en posible EVNC

En la actualidad existen diferentes técnicas para poner de manifiesto la viabilidad de la célula bacteriana. Todas ellas, sin embargo, presentan ciertas limitaciones. Por ejemplo, en la técnica de cuenta directa viable (CDV), el parámetro para determinar la viabilidad es la elongación de la célula. Algunos autores mencionan que tal técnica presenta el inconveniente de que cierto porcentaje de células viables no cultivables de la población, no muestran incremento de su tamaño con esta técnica, por lo que no serán consideradas como viables (Davies y Evison 1991). Otros mencionan que el porcentaje de células que no aumentan de tamaño es bajo (1-5%), por lo que debe ser considerada como una técnica confiable (Roszak y otros 1984; Grimes y Colwell 1986).

Las técnicas para diferenciar células bacterianas vivas de muertas, fueron desarrolladas desde finales del siglo XIX y principios del XX. Los procedimientos se basan en la capacidad de las células para captar colorantes vitales, tales como rojo neutro, eosina, azul de metileno, carbol fucsina, rojo congo y azul de toluidina. Estas tinciones permitían diferenciar células vivas de muertas en sentido absoluto. Sin embargo, las células provenientes de hábitats acuáticos naturales, producían resultados ambiguos (Roszak y Colwell 1987).

Durante la década de los treinta y en las posteriores tres décadas, para diferenciar bacterias vivas de muertas o etapas intermedias, se emplearon procedimientos basados en la obtención de microcolonias en medios de cultivo y su búsqueda con ayuda de un microscopio de luz visible (Roszak y Colwell 1987).

A principio de la década de los setentas se empezó a aplicar el marcaje con radioisótopos para determinar la actividad metabólica celular. Estas técnicas se fundamentaban en que las células metabólicamente activas (vivas), al ser expuestas a un isótopo radiactivo serían capaces de incorporarlo y se podría detectar la actividad celular empleando películas fotográficas o mediante un contador de centelleo (Roszak y Colwell 1987). Más tarde estas técnicas fueron combinadas con inmunofluorescencia para distinguir poblaciones específicas (Shahamant y otros 1993).

Zimmerman y otros (1978), desarrollaron una técnica para diferenciar bacterias vivas de muertas, basándose en la actividad respiratoria. Para ello utilizaron el colorante redox cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazalium (INT), el cual compete con el oxígeno molecular como receptor final de los electrones provenientes de la cadena respiratoria. El poder reductor generado por el sistema de transporte de electrones convierte el INT en cristales insolubles de INT-formazán, que es acumulado en bacterias metabólicamente activas. Los depósitos de INT-formazán dentro de la célula, pueden ser observados al microscopio mediante campos claros o fluorescencia, como depósitos de color rojo. Por otro lado, el formazán puede ser extraído de la célula con etanol y otros solventes orgánicos y cuantificarse fotométricamente.

En 1979, Kogure y otros describieron un método microscópico directo para el recuento de bacterias viables en muestras de agua de mar. El procedimiento consiste en incubar las muestras a 20°C una vez que se les ha adicionado extracto de levadura y ácido nalidíxico. El ácido nalidíxico es un inhibidor de la síntesis del ADN, pero no de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, durante la incubación con extracto de levadura, las células no se dividen pero sí incrementan de tamaño y se alargan siendo fácilmente distinguibles al adicionar naranja de acridina. Este colorante se puede unir tanto al ADN como al ARN; en el primer caso forma complejos que fluorescen de verde bajo la luz ultravioleta y en el segundo los complejos fluorescen de naranja. En las células vivas debido a la abundancia de ARN (como resultado de la síntesis de proteínas), se observará fluorescencia naranja o roja, en tanto que en las células inactivas (pobres en ARN) la fluorescencia será verdosa (Kogure y otros 1979).

Existen varios métodos específicos y sensibles desarrollados en los últimos años para poner de manifiesto las células en posible EVNC. El método de cuenta directa de células viables (CDV) desarrollado por Kogure y otros (1979), es quizás el más convincente y ampliamente usado para detectar células viables, independientemente de ser o no cultivables. El procedimiento ha sido optimizado

para la detección de viabilidad de *V. cholerae*, combinándolo con anticuerpos fluorescentes poli o monoclonales (FA) (Brayton y Colwell 1987). Mediante este procedimiento se ha detectado *V. cholerae* O1 en EVNC en muestras de plancton recolectados de estanques en Bangladesh; de un total de 876 muestras, 563 (64.27 %) fueron positivas por la técnica de FA y sólo 3 (0.3 %) por la técnica tradicional de cultivo (Huq y otros 1990). Mediante esta técnica Huq y otros (1990), han demostrado la presencia de *V. cholerae* O1 en varios ríos por espacio de un año en Bangladesh, donde el cólera es endémico. La técnica de FA combinada con la de CDV (DFA-DVC), permite una cuantificación más fácil de las células en VNC (Brayton y Colwell 1987). Esta técnica combinada, puede ser usada para detectar números discretos de microorganismos en posible EVNC a partir de alimentos y muestras de agua, previa concentración de las bacterias en filtros (Hasan y otros 1995).

La técnica del p-nitrofenil-tetrazolium (ITN) desarrollada por Zimmerman y otros (1978), en combinación con la técnica de CDV de Koguel y otros (1979), ha sido propuesta como el método INT-CDV por Hasan (1995). Así se han detectado células en EVNC de *Aeromonas hydrophila* (Hasan, 1995) y *Shigella dysenteriae* (Rahman y otros 1996) a partir de agua contaminada.

Una técnica propuesta para diferenciar células bacterianas vivas de muertas es la conocida como SYTO 9-PI (Live/dead® BacLight™ Bacterial Viability Kits., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.) Se propuso su uso para distinguir células bacterianas en EVNC de células muertas. En dicha técnica se utilizan dos colorantes fluorescentes el SYTO 9-PI, que tiñe el ADN de color verde, y el yoduro de propidio, que tiñe al ADN de rojo. Estos colorantes se diferencian en sus espectros de absorción de la luz y en su penetración a la célula intacta. El colorante SYTO 9-PI es capaz de penetrar en la célula intacta y teñirla. En contraste, el yoduro de propidio únicamente penetra las células con membrana deteriorada. De esta forma, las bacterias con una membrana celular intacta se tiñen y fluorescen de color verde, mientras que las células con alteraciones en su membrana se tiñen de rojo. La técnica se ha utilizado en la investigación del EVNC

de *E. coli* O157 H:7 (Rigsbeer y otros 1997). Ha sido empleada también por Bogosian y otros (1998), con cepas *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, y *Salmonella choleraesuis*.

En todas las técnicas mencionadas hasta el momento, es indispensable el uso de un microscopio de epifluorescencia (Rigsbeer y otros 1997; Bogosian y otros 1998, Hasan 1995; Brayton y Colwell 1987). Existen métodos más sofisticados para poner de manifiesto las células no cultivables, tales como la autoradiografía o la citometría de flujo (Shahamat y otros 1993; Votyakova y otros 1994). Se cuenta también con métodos en los que se emplea el material genético, por ejemplo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detectar el gen que codifica para la toxina colérica (Hasan y otros 1994), pruebas con oligonucleotidos (Heidelberg y otros 1993) o hibridación del ADN (Rivera y otros 1995).

2.4.3 Implicaciones sanitarias

Es importante resaltar que los patógenos en el posible EVNC, representan un mayor peligro para la población desde un punto de vista práctico. Para el caso de *V. cholerae*, pueden destacarse algunas de las implicaciones sanitarias de la condición no cultivable. Por lo general la investigación de este patógeno a partir de agua, alimentos u otros materiales, se efectúa mediante cultivo. La no detección del patógeno conducirá a resultados falsos negativos durante el monitoreo del microorganismo, si está presente pero en la condición viable no cultivable. En consecuencia, la vigilancia epidemiológica se vería seriamente afectada por que se descuidan focos potenciales de contaminación ante reportes que no reflejan la situación real de la prevalencia del patógeno en el medio ambiente. De ahí la importancia de disponer de técnicas que permitan poner de manifiesto las células del patógeno en tal condición en todo tipo de alimento.

2.4.4 Cambios morfológicos y fisiológicos

En el EVNC las bacterias pueden experimentar una serie de cambios morfológicos y fisiológicos (Kondo y otros 1994; Chowdhury y otros 1995). El *V. cholerae* sufre una secuencia de cambios morfológicos en su estructura celular (Chowdhury y

otros 1995). Kondo y otros (1994), mediante microscopía electrónica observaron que *V. cholerae* en el EVNC disminuye en 2/3 su tamaño en comparación con el de células cultivables. Observaron que las membranas celulares externa e interna, presentan forma ondulada; la pared de peptidoglicano se vuelve más gruesa y densa que la de las células normales. Linder y Oliver (1989), encontraron que la mayoría de los ácidos grasos de 16 carbonos (C16 y C16:1) de la membrana celular de *Vibrio vulnificus*, disminuyen en un 57 % sus niveles al entrar el patógeno a la condición viable no cultivable; las células adquirieron una morfología de coco, disminuyeron de tamaño y exhibieron pocos ribosomas. Hazeleger y otros (1995), en estudios efectuados con *Campylobacter jejuni*, observaron que las células del patógeno al entrar al EVNC, disminuyen de tamaño y adquieren una morfología de coco. Por otro lado, no encontraron diferencias en el perfil de proteínas entre las células en EVNC y normales. La síntesis de proteínas de las células del patógeno durante su transformación a la condición no cultivable, no fue afectada por cloranfenicol. La irradiación del ADN con rayos gamma no afectó la transformación de las células al EVNC. Con base en sus resultados, los investigadores concluyen que la transformación de las células de una morfología espiral a cocoide, no es un proceso regulado genéticamente.

A pesar de los cambios que ocurren en la célula, los microorganismos patógenos mantienen este potencial. Se ha demostrado que *C. jejuni*, *E. coli*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, y *S. dysenteriae* mantienen su virulencia en el EVNC (Colwell y otros 1985; Jones y otros 1991; Rahman y otros 1994). Algunos autores señalan la posibilidad de que todos los patógenos en la condición no cultivable retengan su virulencia (Huq y Colwell 1996).

2.4.5 Reversión del EVNC

La no recuperación en medios de cultivo de microorganismos en el EVNC ha estimulado investigaciones tendientes a revertir dicho estado. Algunos investigadores han reportado reversión de la condición viable no cultivable de las

bacterias luego de aplicar ciertos tratamientos a la población no cultivable. Por ejemplo, mediante la adición de nutrientes al medio es posible revertir el EVNC de *S. enteritidis* (Roszak y otros 1984). Nilsson y otros (1991), observaron que *Vibrio vulnificus* puede salir del EVNC al incrementar la temperatura de 4 a 23°. De igual forma Ravel y otros (1995), señalan que *V. cholerae* en EVNC suspendido en agua artificial de mar y mantenido a 4°, revierte tal condición al incubar el sistema a 30° / 72 h. Wai y otros (1996), han logrado revertir la condición no cultivable de *Vibrio cholerae* por medio de un choque térmico. Mediante modificaciones en la composición de los gases es posible también revertir la condición no cultivable de *Clostridium jejuni* (Bovill y Mackey 1997).

Es importante señalar que la mayoría de los estudios sobre el EVNC de *V. cholerae* se han efectuado con modelos en los que el microorganismo se encuentra suspendido en agua de río, mar, lagunas o solución salina. Aparentemente no se dispone de estudios sobre el EVNC de *Vibrio cholerae* en los alimentos o adherido a superficies.

Una condición con cierta semejanza al EVNC es el estrés celular. Éste se define como un daño subletal que experimenta la célula bacteriana como resultado de los tratamientos a los que son sometidos los alimentos (Russell y otros 1995; Hoffmans y otros 1997). A diferencia de las células en EVNC, las estresadas tienen la peculiaridad de desarrollarse en un medio libre de inhibidores, pero no en uno selectivo (Hoffmans y otros 1997). Años atrás, antes del conocimiento de este hecho, las bacterias patógenas en condición de estrés representaban un riesgo a la población al no ser detectadas. Actualmente son un problema menor ya que se han desarrollado diversos procedimientos para reactivarlas y ponerlas de manifiesto.

El cólera es uno de los padecimientos que ha provocado innumerables muertes a lo largo de la historia. El más dramático ejemplo documentado, fue el ocurrido en 1994 en los campos de refugiados Rwandeses en Goma, Zaire, con 14,000 defunciones (Siddique y otros 1995). El cólera ha afectado muchas partes del

mundo. En nuestro país entre 1991 y 1993 se registraron 21,564 casos con 326 defunciones (Secretaría de salud 1994).

En América Latina existe el riesgo de que el cólera adquiera carácter endémico, particularmente por las características socioculturales de su población. En enero de 1991 una epidemia de cólera se inició en Perú y se extendió a Ecuador, Colombia, Guatemala y Brasil con importantes brotes (Tauxe y otros 1994). Desde entonces hasta 1993 se diagnosticaron 948,429 casos de cólera, con más de 7,995 defunciones, de los que correspondieron a Venezuela 3,264 casos y 90 defunciones, siendo alarmante que la tasa de letalidad se mantiene desde entonces en el orden del 0,8%, no dando muestras de disminución (Koo y otros 1997). Durante el período 1996-1998 se diagnosticaron, solamente en el estado Zulia de Venezuela, más de 1,461 casos de cólera, con un 35% de los pacientes afectados menores de cinco años. Estas cifras, revelan la existencia de condiciones de salubridad inadecuadas en diversos estratos de la sociedad, las cuales facilitan el mantenimiento de la enfermedad (Lares y otros 1998).

El cólera es una enfermedad aguda e infecciosa. Fue descrita antes de la época de Hipócrates en el siglo V a. de C. (Kumate y otros 1993). En Asia, entre los siglos XV y XVIII se describieron varias epidemias de la enfermedad. A mediados del siglo XIX John Snow, en Inglaterra, fue el primero en describir las medidas de prevención de la enfermedad con base en estudios epidemiológicos de la epidemia ocurrida en Londres (Kumate y otros 1993). En 1833 Roberto Koch descubrió el agente causal del cólera y lo describió como un bacilo curvo de gran movilidad, al que llamo *Vibrio comma* (Mata 1992).

Desde principios del siglo XIX hasta nuestros días, se han registrado siete pandemias de cólera, las cuales iniciaron desde el lejano Oriente, en su mayoría del subcontinente Indio, especialmente de la región de Bengala, hoy representada por la provincia hindú de Calcuta y la República de Bangladesh (Mata 1992). La evidencia epidemiológica indica que las primeras seis fueron causadas por el biotipo clásico de *Vibrio cholerae* O1. Este biotipo “desapareció” en casi todas las

regiones que afectó, al menos por dos razones: la inmunización contraída al afectarse amplios segmentos de la población, y la dificultad del bacilo para sobrevivir en el ambiente exterior. En contraste, la séptima pandemia que comenzó en 1961 en las islas Sulawesi (Indonesia), es causada por el biotipo El Tor de *Vibrio cholerae* O1, el cual posee menor virulencia, patogenicidad y letalidad que el biotipo clásico, pero mayor capacidad de sobrevivir en el medio ambiente (Heiser y Carpenter 1971; Kumate y otros 1993). Además, este biotipo se difunde más lentamente en la población, aunque persiste por años en muchos territorios invadidos. Mientras el biotipo Clásico ha ido desapareciendo dejando sólo un reducto en Bangladesh, El Tor muestra tendencia a persistir en el ecosistema de muchos países, tornándose endémico (Kumate y otros 1993).

El cólera es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en algunos países de Asia y de África, y desde 1991 también en Latinoamérica (Anónimo 1991a; 1991e; Valdespino y otros 1991). La enfermedad es la expresión de un proceso infeccioso intestinal causado por *Vibrio cholerae* O1, patógeno exclusivamente humano.

El papel del agua y de los alimentos en la transmisión del cólera está bien establecido (Black 1986). Se conocen dos ciclos en la propagación del padecimiento: a) ingestión de agua contaminada con excretas de pacientes o portadores y b) consumo de alimentos contaminados por agua contaminada con excretas de pacientes o portadores del microorganismo o por contaminación directa de los alimentos (manos) por portadores (Mhalu y otros 1984; St.-Louis y otros 1990).

a) La transmisión hídrica ha sido el mecanismo más importante y determinante de las epidemias del cólera a través de los siglos. El agua a su vez, es fuente de contaminación de alimentos y de utensilios de cocina (Feachem y otros 1981). El agua de pozos superficiales, de las cañerías, reservorios intra-domiciliarios, de los arroyos, ríos, lagunas y lagos, se contamina con las heces de personas enfermas o portadores asintomáticos. Por otro lado, los tratamientos inadecuados de las aguas

residuales favorecen la sobrevivencia del vibrión convirtiéndose en fuentes de contaminación, dando lugar a la aparición de brotes. El agua contaminada puede acarrear miles o cientos de miles de bacilos por cada mililitro e infectar al humano si sobreviven, la barrera de la acidez estomacal. Por medio del agua, el microorganismo puede pasar de un país o continente a otro. Por ejemplo, McCarthy y otros (1989), aislaron *Vibrio cholerae* O1 a partir de agua no potable recolectada en barcos procedentes de diferentes destinos; de 19 barcos analizados, 5 resultaron positivos a *Vibrio cholerae* O1, serotipo Inaba, biotipo El Tor, toxigénico. El agua contaminada es peligrosa cuando se consume sin tratar o en el hielo, en refrescos casi neutros, neutro o alcalinos (Blake y otros 1977). Al consumir mucha agua se diluye la acidez gástrica y se favorece su paso hacia el intestino (Pollitzer 1957); el hielo es un buen vehículo del microorganismo porque este puede sobrevivir a la congelación por tiempos prolongados (Miyaki y otros 1967; Reily y otros 1985).

b) El papel de los alimentos contaminados en la transmisión del cólera fue intuido por Snow, (Mata 1992). Muchos autores habían demostrado desde principios de siglo que el vibrión colérico sobrevive varias horas en alimentos ordinarios. También se ha demostrado que puede multiplicarse en la carne y pescado.

Algunos alimentos pueden participar en la transmisión del cólera si se preparan bajo condiciones peligrosas (por un portador, por ejemplo) (St-Louis y otros 1990), si se consumen crudos (hortalizas regadas con agua de residuales) o después de tres horas o más de haber sido cocidos, sin adecuado recalentamiento, previa recontaminación (Guthrie y otros 1985; Makukutu y Guthrie 1986). Se ha encontrado que los alimentos de origen marino juegan un papel importante en la transmisión del padecimiento. El consumo de bivalvos crudos (ostiones y mejillones) se ha asociado a brotes explosivos en las costas de Italia (Baine y otros 1974) y casos esporádicos en los E.U.A. (Blake y otros 1980). Se ha encontrado que estos alimentos se contaminan principalmente de origen (en el mar), por lo cual se recomienda consumirlos completamente cocidos. El consumo de verduras crudas regadas con aguas negras, sin previo tratamiento antimicrobiano,

representa un riesgo importante de infección. Diferentes estudios han mostrado que el vibrión puede sobrevivir durante tiempo prolongado e incluso multiplicarse en diversas verduras (germinado de alfalfa, por ejemplo) (Castro Rosas y Fernández Escartín 2000). El patógeno es capaz de multiplicarse en los alimentos e incrementar considerablemente su número. Se han presentado además, brotes asociados al consumo de hortalizas regadas con aguas negras, como lechuga, col y cilantro (Swerdlow y otros 1992).

2.5 Aspectos microbiológicos de *Vibrio cholerae*

El *Vibrio cholerae* O1 se encuentra situado dentro del Orden *Pseudomonadales*, familia *Vibrionaceae*. Las especies del género *Vibrio* son gram-negativas y tienen forma de bacilo corto, recto o curvo a manera de una coma. Mide 1.4 a 2.6 μm de longitud por 0.5 a 0.8 μm de diámetro. Es una bacteria no esporulada que en cultivos frescos y puros se presenta de tamaño uniforme, mientras que en cultivos viejos se torna pleomórfica, con formas ocasionales esféricas o filamentosas y cadenas de bacilos. No forma endosporas. Posee un flagelo polar que le imparte movimiento vibrátil. Son aerobios facultativos, poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo (Baumann y Shubert 1984). El patógeno tiene capacidad de fermentar la glucosa lo que le distingue de otras *Pseudomonadaceae*. Son halotolerantes, con afinidad al medio alcalino y muy sensibles a los ácidos. No fijan el nitrógeno, todos son quimiorganótrofos, muchos capaces de crecer en un medio mineral únicamente con D- glucosa y cloruro de amonio. Sólo unas cuantas cepas necesitan factores orgánicos de crecimiento. Los iones sodio estimulan el crecimiento en todas las especies y son un requerimiento para la mayoría; la concentración mínima necesaria es del orden de 5-700 mM, por lo que muchas especies crecen bien en medios que contengan agua de mar (Ravel y otros 1995). El patógeno puede encontrarse en hábitats acuáticos con variedad de salinidad y son comunes en ambientes marinos. También puede encontrarse en agua dulce donde, dependiendo de diversos factores, su sobrevivencia puede ser de horas hasta días (Rogers y otros 1980; Bourque y otros 1986).

Vibrio cholerae es susceptible a la desecación, el calor, desinfectantes químicos como el cloro y antibióticos como las tetraciclinas (Kumate y otros 1993).

2.5.1 Ecología de *Vibrio cholerae* O1

Tradicionalmente, los epidemiólogos del cólera consideraban que el único reservorio de *Vibrio cholerae* era el intestino humano y que las perspectivas de su sobrevivencia fuera de él eran precarias (Felsenfeld 1966). Recientemente diversas evidencias sugieren que *Vibrio cholerae* es capaz de sobrevivir largo tiempo fuera del intestino humano, principalmente en ambientes acuáticos (Colwel y otros 1977). Estas evidencias junto con los datos de brotes provocados por el consumo de productos marinos sin indicios de contaminación fecal humana del agua en los sitios de recolección o captura (Anónimo 1980a) y estudios de biología molecular efectuados por Hood y otros (1981), revelan que el vibrión puede ser un componente autóctono de las aguas de estuarios, litorales y pantanos salados en zonas templadas (Hood y otros 1981).

Ante estos hallazgos, las investigaciones se han enfocado al estudio de la ecología de *Vibrio cholerae* en el medio acuático y en su interacción con la microflora, como el plancton y la macroflora residente, como los camarones y ostiones (Colwell otros 1981).

III. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Propuesta de un protocolo para identificar células de *Vibrio cholerae* en Estado Viable No Cultivable utilizando calorimetría diferencial de barrido.

3.2 Objetivos específicos.

- a). Inducir el estado viable no cultivable en células de *Vibrio cholerae*.
- b). Uso de una técnica nueva para detectar el EVNC de *Vibrio cholerae*.

IV. Metodología experimental

4.1 Metodología

4.1.1 Obtención de la cepa

La cepa fue aislada de aguas negras y previamente identificada, en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Hidalgo y donada por su Directora, la Dra. Armida Zuñiga Estrada.

4.1.2 Desarrollo de la cepa de *Vibrio cholerae* en agar TCBS

Se tomó con un asa bacteriológica una muestra de la cepa de *Vibrio cholerae* y se sembró en agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sacarosa), se incubó por 24 h a 35 °C en una incubadora Dry Tipe Bacteriological Incubator (Blue M). Las colonias típicas de *Vibrio cholerae* son amarillas y la periferia translúcida, además en este medio el microorganismo forma colonias mucosas.

4.1.3 Tinción Gram

Se tomó con un asa bacteriológica 1 colonia de las que crecieron en agar (TCBS), se preparó un frotis con estas bacterias y se tiñó con cristal violeta, se dejó actuar por 1 min, se lavó con agua destilada, a la preparación se le agregó Lugol, se dejó actuar por 1 min, se lavó el frotis con etanol y se le agregó safranina, se dejó actuar por 20 seg, se lavó con agua destilada y se dejó secar. La preparación se observó al microscopio.

4.1.4 Inducción del Estado Viable No Cultivable

Se tomó con una asa bacteriológica una colonia de *Vibrio cholerae* de las que crecieron en agar (TCBS), se sembró en 2 tubos de caldo soya tripticaseína (Bioxon), se incubó por 24 h a 35 °C en una incubadora dry tipe bacteriological incubator (Blue M), se depositó el contenido de los tubos en 400 mL de caldo soya tripticaseína (Bioxon), se incubó por 24 h a 35 °C en una incubadora dry tipe bacteriological incubator (Blue M), se centrifugó el contenido del frasco, al residuo

se le agregó solución salina isotónica y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min a una temperatura de 20 °C en una centrífuga Hemmle Labnet (Z 323 K), el residuo se depositó en 1 L de agua de mar y se refrigeró a 3 °C en un enfriador vertical (MOD. REB 800/804) durante un mes.

4.1.5 Conteo en placa

Del litro de agua de mar inoculada con *V. cholerae*, se tomó 1 mL con una micropipeta 100-1000 µL (Brand) y se hicieron 7 diluciones decimales 1:9 en diluyente de peptona (Bioxon), posteriormente se tomó 1 mL de la 5ta, 6ta y 7ta dilución con una micropipeta 100-1000 µL (Brand) y se sembró en agar cuenta estándar (Bioxon), se incubó por 24 h a 35 °C en una incubadora dry type bacteriological incubator (Blue M) y posteriormente se contaron las colonias que desarrollaron en este medio con ayuda de un cuenta colonias (Darkfiel Quebec, American optical).

Este procedimiento se realizó cada 8 días que son los días que transcurrieron entre cada experimento.

4.2 Preparación de la muestra para el calorímetro

4.2.1 Método para evaluar el EVNC con adición de agua destilada

Cada 8 días se tomaron 70 mL en 2 tubos de plástico para centrífuga (Nalgene Vol. aprox. de 35 mL), en cada uno de los tubos se colocaron 35 mL del agua de mar inoculada con el microorganismo, estos tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 20 °C en una centrífuga Hemmle Labnet (Z 323 K), se desechó el sobrenadante de cada tubo, al residuo se le agregaron 35 mL de agua destilada, se agitaron con el vortex-2 Genie (MOD. 560), posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 20°C en una centrífuga digital Hemmle Labnet (Z 323 K), se desecho el sobrenadante de los tubos, se le agregaron 35 mL de solución salina isotónica y se volvieron a centrifugar a 3500 rpm durante 15 min a 20°C en una centrífuga digital Hemmle Labnet (Z 323 K), el residuo se colocó en una cápsula de

acero inoxidable para calorímetro (Marca Mettler Toledo, Numero de catalogo ME 26929), se peso en una microbalanza (Marca Mettler Toledo, Modelo AX20) y se sometieron a un tratamiento térmico en el calorímetro (Mettler Toledo, modelo 822E).

4.2.2 Método para evaluar el EVNC sin adición de agua destilada

Cada 8 días se tomaron 70 mL en 2 tubos de plástico para centrífuga (Nalgene Vol. aprox. de 35mL), en cada uno de los tubos se colocaron 35 mL del agua de mar inoculada con el microorganismo, estos tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 20 °C (Centrífuga digital Hemmle Labnet, Z323K), se desechó el sobrenadante de cada tubo, se le agregaron 35 mL de solución salina isotónica y se volvieron a centrifugar a 3500 rpm durante 15 min a 20 °C (Centrífuga digital Hemmle Labnet Z323K), el residuo se colocó en una cápsula de acero inoxidable calorímetro (Mettler Toledo, Numero de catalogo ME 26929), se pesó en la microbalanza (Marca Mettler Toledo, Modelo AX20) y se sometieron al tratamiento térmico en el calorímetro (Mettler Toledo, modelo 822E).

4.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

Para determinar la muerte térmica de las células de *Vibrio cholerae* se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler Toledo (MOD. 822E). La calibración del equipo se realizó de acuerdo al manual de operación de dicho equipo, utilizando como estándar para temperatura y flujo de calor indio (In) ($T_0 = 156.6$ °C, $H = 28.4$ J/g). La calibración del equipo se realiza cuando éste presenta una desviación no mayor a 0.5 °C ó 0.4 J/g. Para verificar el estado del equipo se utilizo indio. Para checar el estado del calorímetro o para llevar a cabo su calibración, se utilizan crisoles de aluminio estándar de 40 μ L, uno con el estándar (Indio) y otro de referencia (vacío), ambos sellados herméticamente (Selladora Mettler Toledo); se utilizó un flujo de 20 mL/min de nitrógeno para homogenizar la conductividad térmica dentro de la celda de calentamiento.

El método utilizado para evaluar el EVNC de *V. Cholerae* en el calorímetro empezó a una temperatura de 4 °C y concluyó a 180 °C, todos los experimentos se realizaron utilizando una tasa de calentamiento de 5 °C/min. Se pesaron un promedio de 50 mg por muestra y se colocaron en cápsulas de acero inoxidable (Mettler Toledo, Número de Catalogo ME-26929), uno con la muestra y otro de referencia.

V. Resultados y Discusión.

5.1 Resultados del conteo de placa

Los resultados obtenidos del conteo en placa de *Vibrio cholerae* obtenidos durante los días que duró el experimento de inducción del estado viable no cultivable de este microorganismo muestran una disminución en la concentración de colonias de 232×10^6 UFC/mL a 92×10^5 UFC/mL, antes de la inducción del EVNC se partió de una concentración de 4×10^{10} UFC/mL. Los datos antes mencionados nos indican que las células de *Vibrio cholerae* nunca entraron al EVNC, con estos resultados solo se evidencia que las células van perdiendo la capacidad para formar colonias cuando se encuentran en un ambiente desfavorable para ellas en un determinado lapso de tiempo.

Estos resultados no concuerdan con los datos obtenidos por Vargas (2008), en estudios similares realizados en bacterias de *Escherichia coli* en la inducción del estado viable no cultivable y están de acuerdo con lo reportado por Hartke y otros (1998), los cuales trabajaron con *Enterococcus faecalis* y reportaron que después de 85 días a una temperatura de 4 °C, tenían aún bacterias en estado viable cultivable, las cuales habían sufrido cambios morfológicos debido principalmente a una falta de nutrientes en el medio y no a que hayan desarrollado el estado viable no cultivable.

En el estado viable no cultivable las bacterias muestran actividad metabólica y respiración pero no pueden ser mostradas como UFC por el conteo en placa, por lo tanto se quedan ocultas.

Las células entéricas en el estado viable no cultivable experimentan una reducción de tamaño, adoptan forma de coco, con cambios significativos en la estructura de la membrana, contenido proteico y contenido ribosomal.

5.2 Resultados del DSC

Los termogramas obtenidos de *Vibrio cholerae* al inicio y al final del experimento de inducción del estado viable no cultivable se muestran en las figuras 2 a la 5, las cuales fueron obtenidas utilizando dos métodos distintos de preparación u obtención de las células bacterianas, en las figuras 2 y 4 las células fueron lavadas con agua destilada durante el proceso de obtención y en las figuras 3 y 5 no fueron lavadas con agua destilada.

En la figura 2 esta representado el termograma del método en el cual se utilizó agua destilada para la obtención de la muestra, en esta figura se observa un pico de mayor área, éste se encuentra en un rango de temperatura de 60°C a 80 °C, este pico sugiere la desnaturalización de ribosomas (Lee y Kaletunc 2002) más estables y de mayor tamaño, aunque también comienza el proceso asociado con la muerte térmica de las células, esto debido al hecho de que en un mismo intervalo de temperaturas se pueden llevar a cabo innumerables transiciones térmicas.

En el termograma representado en la figura 2, se observa otro evento térmico entre 80° y 100°C. El cual, de acuerdo a lo reportado por Mackey y otros (1991), quienes estudiaron la desnaturalización térmica de células completas de *E. coli* y sus componentes celulares por calorimetría diferencial de barrido, se relaciona con la fusión del ADN.

Sin embargo, Lee y Kaletunc (2002), en el análisis térmico de las células completas de *E. coli* y *L. plantarum* reportaron la presencia de 5 eventos térmicos en el intervalo de temperaturas de 55 a 120 °C, lo cual no está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Figura 2). Estas diferencias pueden deberse principalmente al método de preparación de la muestra para el análisis térmico. Ya que estos investigadores no realizaron lavados con agua destilada, mientras que el método empleado en este estudio incluía lavados con agua

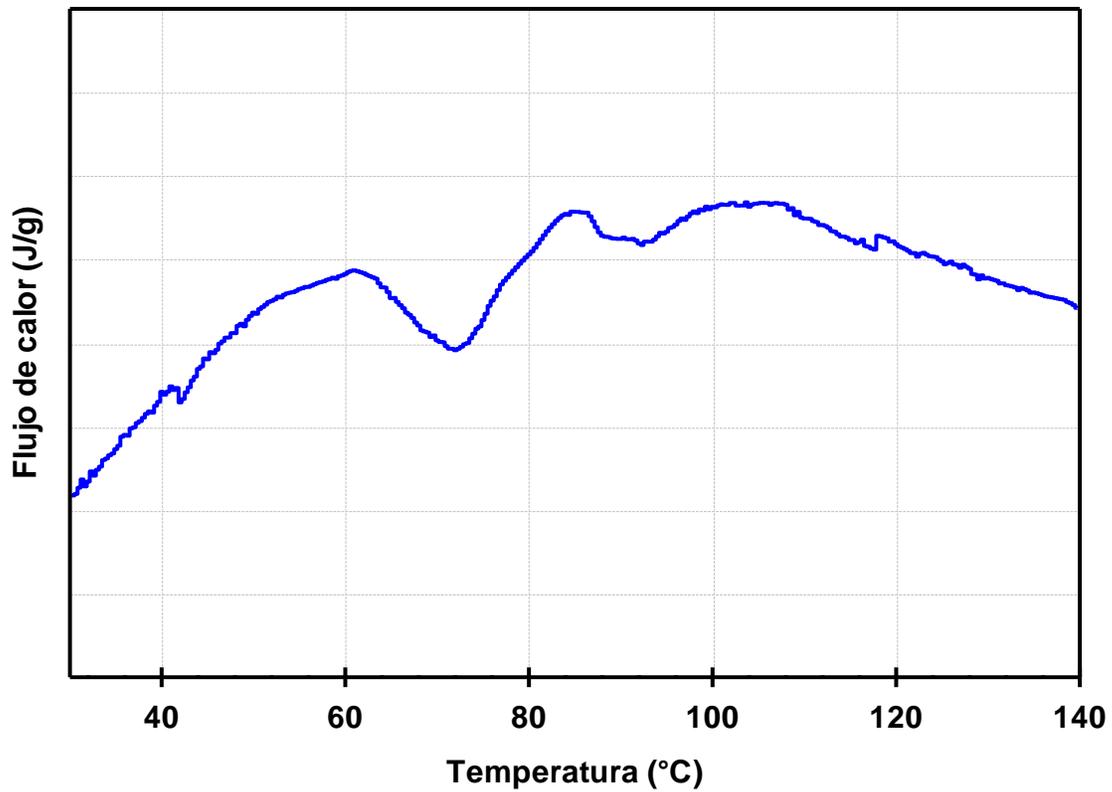


Figura 2. Termograma de *Vibrio cholerae* obtenido con el método con agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al tiempo cero.

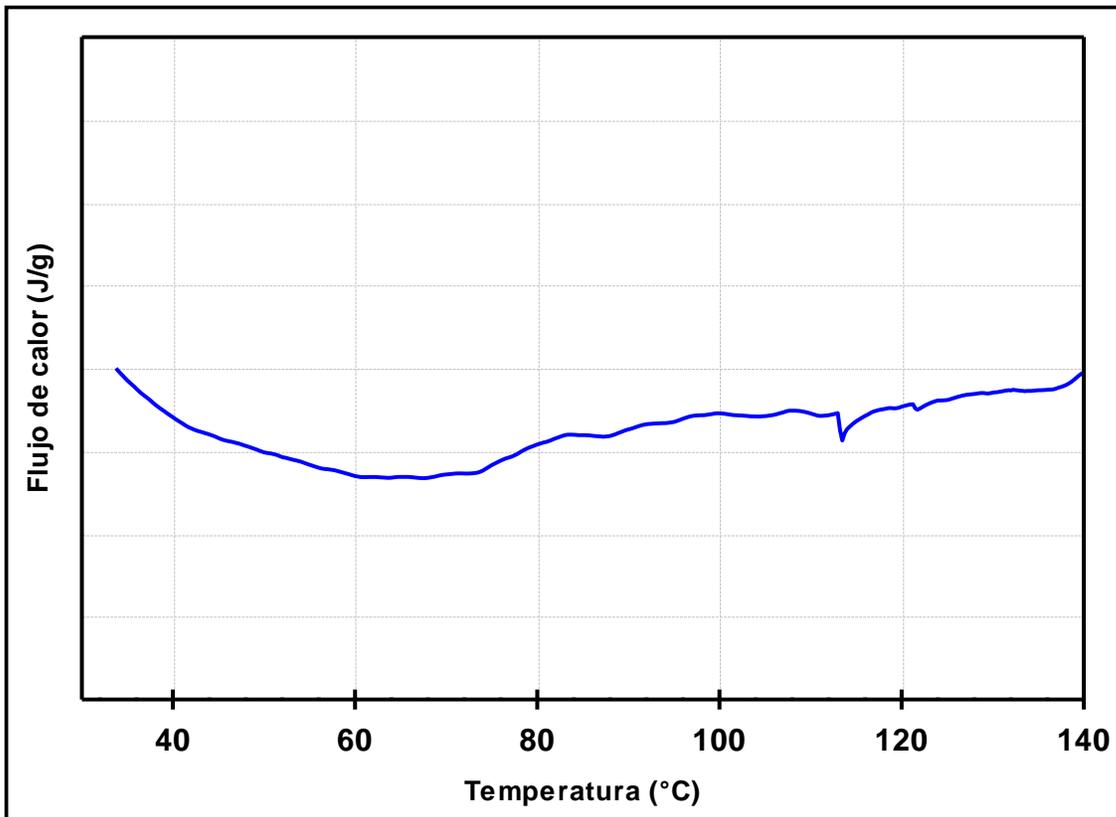


Figura 3. Termograma de *Vibrio cholerae* obtenido con el método sin agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al tiempo cero.

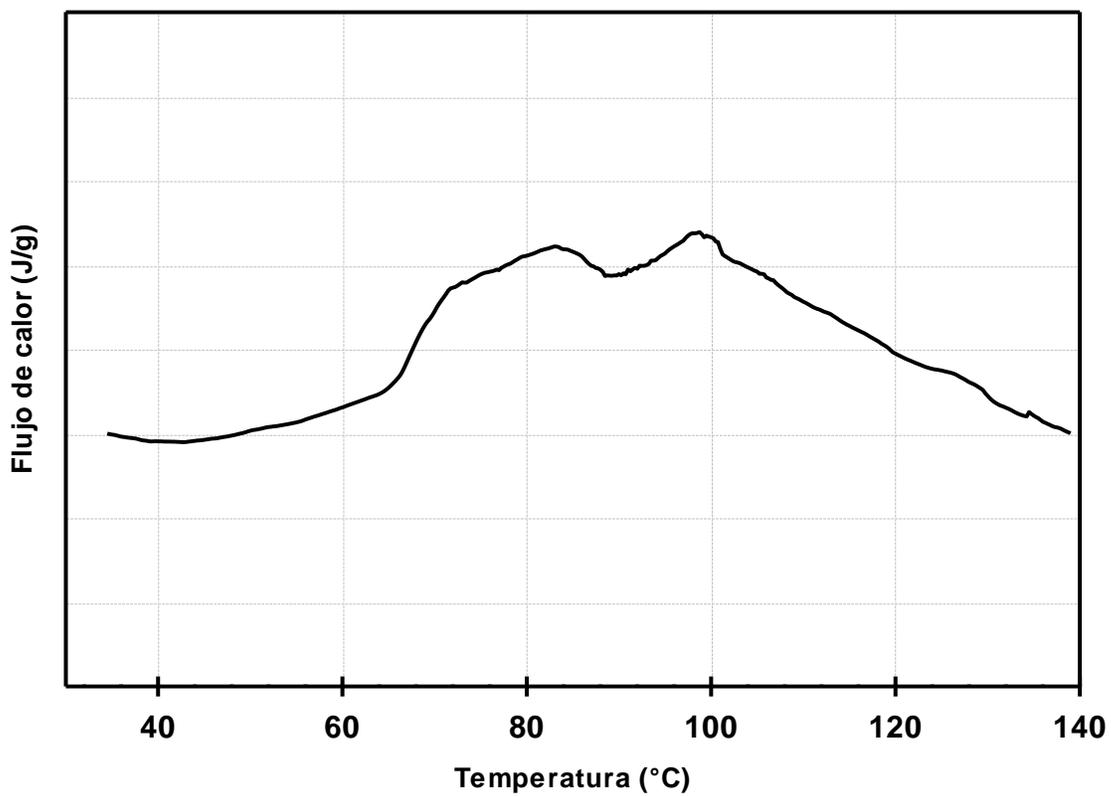


Figura 4. Termograma de *Vibrio cholerae* obtenido con el método con agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al final del experimento.

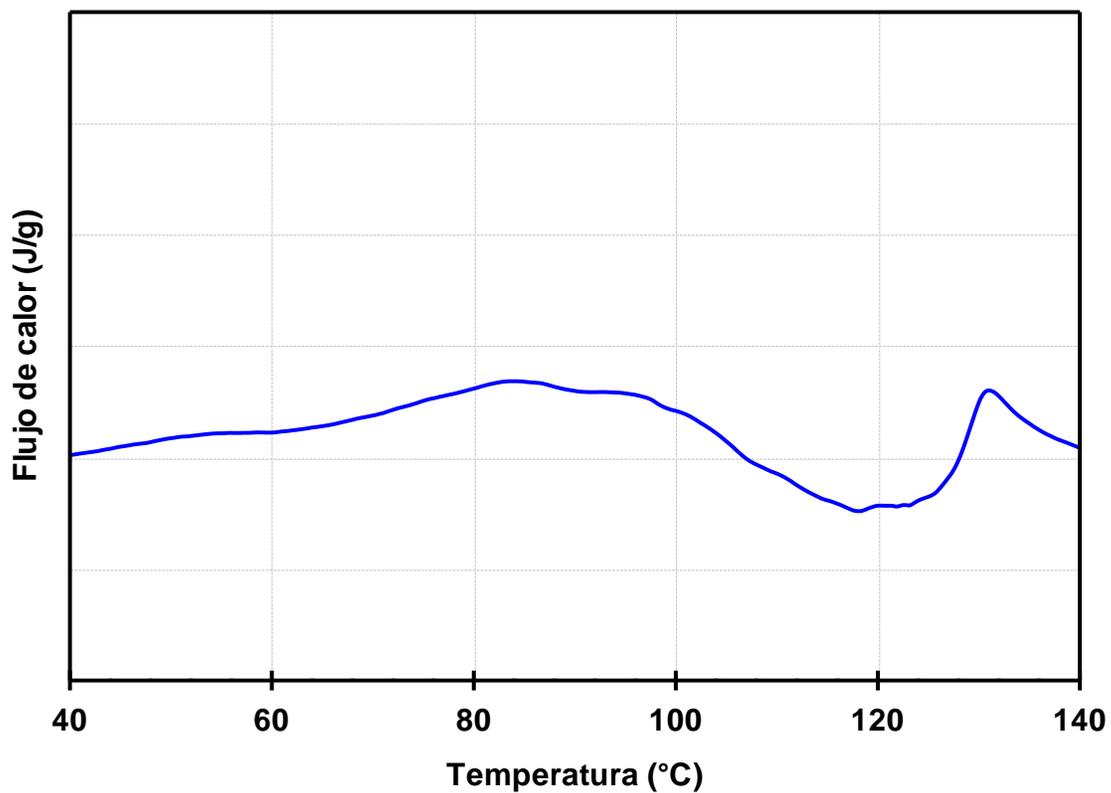


Figura 5. Termograma de *Vibrio cholerae* obtenido con el método sin agua destilada durante la preparación de la muestra para el análisis térmico al final del experimento.

destilada, lo cual pudo ocasionar la lisis de las células de *Vibrio cholerae* debido a los cambios de presión osmótica inducidos por el agua destilada en el interior de las células bacterianas ocasionando su ruptura. Adicionalmente cabe mencionar que la velocidad de calentamiento empleada en el trabajo antes referido se realizó a 3 °C/min, la cual es diferente a la empleada (5 °C/min), el uso de velocidades de calentamiento menores puede dar lugar a una mejor separación de los eventos térmicos que suceden durante el experimento. Es decir que es muy probable que utilizando una velocidad de 5 °C/min, como fue el caso, los múltiples eventos térmicos reportados por Lee y Kaletunc (2002), no son observados en la figura 2 debido a un solapamiento de las señales.

En la figura 3 se presenta el análisis térmico de las células de *Vibrio cholerae*, realizado en células preparadas sin la etapa de lavado con agua destilada, en este termograma se observan las diferencias entre las figuras 2 y 3 es la falta de una definición apropiada de los eventos térmicos (figura 3) y el método utilizado para preparar la muestra, ya que en este último experimento se utilizó solamente solución salina para el lavado de la muestra y no agua destilada.

Los resultados mostrados en las figuras 4 y 5, los cuales deberían corresponder a la respuesta térmica de las células de *Vibrio cholerae* en estado viable no cultivable tampoco presentan una definición apropiada para realizar la cuantificación de las señales de los eventos térmicos. Cabe señalar en este caso que estas respuestas térmicas no corresponden al estado viable no cultivable, tal como se mencionó en el apartado anterior, ya que las células no fueron capaces de desarrollar dicha condición en las condiciones ambientales empleadas. Debido a la falta de seguridad de estas respuestas no se puede saber a ciencia cierta si la falta de señales térmicas en ambos termogramas son consecuencia del método empleado para preparar las células para el análisis térmico o porque las células desarrollaron otra estructura por la falta de nutrientes en el medio.

VI. Conclusiones y sugerencias

El conteo en placa nos ofrece información de cómo las células de *Vibrio cholerae* pierden su capacidad para formar colonias cuando se encuentra en condiciones adversas conforme transcurre el tiempo. Adicionalmente los resultados obtenidos nos permiten concluir que no fue posible lograr que las células de *V. cholerae* desarrollaran la condición de estado viable no cultivable en las condiciones empleadas para la realización del presente trabajo experimental.

Los resultados evidencian que la calorimetría diferencial de barrido es una herramienta de gran utilidad para evaluar la muerte térmica y desnaturalización térmica de los componentes celulares de *Vibrio cholerae*. Siendo el método de lavado con agua destilada el que ofreció la mejor resolución de los eventos térmicos de las células de *Vibrio cholerae*.

Este trabajo debe de ser evaluado con estudios posteriores ya que no se cuenta con información acerca del comportamiento de este microorganismo al ser calentado cuando se encuentra en EVNC.

VII. Bibliografía

Allwood, M. C., and A. D. Russel, 1967. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 15:1266–1269.

Anderson, W. A., N. D. Hedges, M. V. Jones, and M. B. Cole, 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied in differential scanning calorimetry. J. Gen. Microbiol. 137:1419–1424.

Anónimo. 1980a. Cholera and other vibrios associated with diarrhoeas. Bull. W.H.O. 58: 353-374.

Anonimo. 1991a. El cólera en las Americas. Actualización. Boletín epidemiológico OPS. Organización Panamericana de la Salud. 12: 1-14.

Anonimo. 1991e. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. 6 : 41-48.

Baine, W.B., Mazzoti, M., Greco, D. Jazzo, E., Zampieri, A., Angioni, G., Digrola, M., Gangarosa, E.J. and Pochiari, F. 1974. Epidemiology of cholera in Italy in 1973. Lancet. 1: 1730-1736.

Baumann, P. and Shubert, H.W. 1984. Family II. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245 (AL), En: Krieg NR (de.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volumen 1, William and Wilkins, Baltimore. 516-550.

Black, R.E. 1986. Cholera: 242-246. En Last, J.M. (ed). Public Health and preventive Medicine. 12th ed. Appleton-Century-Crofts.

Blake, P.A., Allegra, D.T., Snyder, J.D., Barrett, T.J., McFarland, L. Caraway, C.T., Feeley, J. C., Craig, J.P., Lee, J.V., Puhr, N.D. and Feldman, R.A. 1980. Cholera a possible endemic focus in the United States. N. Engl. J. Med. 302 : 305-309.

Bogosian G., Morris P J. L. and O'Neil J. P. 1998 A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1736-1742.

Boone David and Castenholz Richard.2001. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. 2nd edition. p 21-23.

Bourque, A., Cossins, Y. and Gray, B. 1986. Investigation of cholera acquired from de riverine environment in Queensland Med. J. Austr. 144: 229-234.

Bovill, R.A. and Mackey, B.M.1997. Resuscitation of non-culturable cell from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. Microbiol. 143: 1575-1581.

Brandts, J.F., y Lin, L-N., (1990). Study of ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochem.* 29: 6927-6940.

Brayton, P.R. and Colwell R.R. 1987. Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental *V. cholerae* O1. J. Microbiol. Meth. 6: 309-314.

Bryan Arthur, Bryan A. Charles y Bryan G. Charles. 1983. Bacteriología, 6^{ta} edición

Byrd, J.J. Xu, H.S. and Colwell R.R. 1991. Viable but Nonculturable bacteria in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 57: 875-878.

Castro-Rosas, J. and Escartín, E.F. 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprout. J. Food Sci. 65: 162-165

Chowdhury, M.A.R., Montilla, R.R., Quintero, E.J., Huq, A., Maugel, T., Xu, B., Hasan, A.K. and Colwell, R.R. 1995. Cellular changes and serogrup conversion of viable but nonculturable *V. cholerae*. Abstr. Amer. Soc. Microbiol. Gen. Mett.

Colwell, R.R., Kaper, J. and Joseph, S.W. 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other virios : occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science. 198: 394-396.

Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.R. Huq, S.A. and Palmer, L.M. 1985. Viable but non-culturable *V. cholerae* and related pathogens in the environment : implication for release of genetically engineered microorganisms. Biotech. Sci 3: 817-820.

Davies, C.M. and Evison, L.M. 1991. Sunlight and the survival of enterics in natural waters. J. Appl. Bacteriol. 70: 265-274.

Davis D. Bernard, Dulbecco Renato, Eisen N. Herman and Ginsberg S. Harold, Microbiology, 4th edition

Dworkin, M. 1979. Spores, cyts and stalks. In the Bacteria. Vol.VII. Academic press, Cambridge University Press.

Feachem, R.G. 1981. Environmental aspects of cholera epidemiology I. A review of selected reports of endemic and epidemic situations during 1961-1980. Trop. Dis. Bull. 78: 675-698.

Felsenfeld, O. 1966. A review of recent trends in cholera research and control. Bull. W.H.O. 34: 161-195.

Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., y Sanchez-Ruiz, J.M.,1990. Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19: 159-188.

Freire, E., y Biltonen, R., (1978). Statistical mechanical deconvolution of termal transitions in macromolecules. I. Theory and applications to homogeneous systems. *Biopol.* 17: 463-479.

Granados Pérez Raquel y Villaverde Peris María del Carmen. 2002. Ciencias de la Salud, Microbiología Tomo I, Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. 1^{er} edición. Unidad I y IV, p. 3-13, 68-74.

Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. FEMS Microbiol. Lett. 34: p161-165.

Guthie, R.K., Makukutu, C.A. and Gibson, R.W. 1985. Recovery of *Vibrio cholerae* O1 after heating and/or cooling. Dairy Food Sanit. 5: 427-430.

Hartke, A., J.-C. Giard, J.-M. Laplace, and Y. Auffray. 1998. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 64:4238–4245.

Hasan, J.A.K. 1995. Development and application of rapid test kits for the detection of *Vibrio cholerae* in water, foods and clinical samples. Doctoral dissertation, University of Maryland at College Park, MD. Citado en : Huq, A. and Colwell, R.R. 1996. A Microbiological Paradox: Viable but Nonculturable Bacteria With Special Reference to *Vibrio cholerae*. J. Food Prot. 59: 96-101

Hazeleger, W.C., Janse, J.D., Koenraad, P.M.F.J., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. and Abee, T. 1995. Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2713-2719.

Heidelberg, J.F., O'Neill, K.R., Jacobs, D. and Colwell, R.R. 1993. Enumeration of *Vibrio vulnificus* on membrane filters with a fluorescently labeled oligonucleotide probe specific for kingdom level 16S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3474-3476.

Heiser, V.G. and Carpenter, M.D. 1971. Recollection of cholera at the turn of the century. Bull. N.Y. Acad. Med. 47: 1211-1212.

Hoffmans, C.M., Fung, D.Y.C. and Kastner, C.L. 1997. Methods and resuscitation environments for the recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes* : A review. J. Rap. Meth. Autom. Microbiol. 5: 249-268.

Hood, M.A., Ness, G.E. and Rodrick, G.E. 1981. Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster. *Cassostrea virginica*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 555-558.

Huq, A. and Colwell, R.R. 1996. A microbiological paradox: viable but nonculturable bacteria with special reference to *Vibrio cholerae*. J. Food Prot. 59: 96-101.

Huq, A. Colwell, R.R, Rahman, R., Ali, A., Chowdhury, M.A.R., Salina P., Sack, D.A. and Cohen-Rusek. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. Appl. Environ. Microb. 56: 2370-2373.

Huq, A., Small, B.E., West, A.P., Huq, M.I., Rahman, R, and Colwell, R.R. 1983 Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol. 45: 275-283.

Hussong, D., Colwell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M. and Burge, W.D. 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. Bio.Techn. 5: 947-950.

Jones, D.M., Sutcliffer, E.M. and Curry, A. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. J. General Microb. 137: 2477.

Kaufman, M.R., Taylor, R.K. 1994. The toxin-coregulated pilus: Biogenesis and function. In: Wachsmuth, I.K., Blake, P.A. and Olsvik, O. (Eds). *Vibrio cholerae* and Cholera; Molecular to global perspectives. Am. Soc. Microbiol., U.S.A.

Kogure, K., Simidu, U. and Taga N. 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) cleve on the growth of marine bacteria. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 36: 201-215.

Kondo, K., Takade, A. and Amako K. 1994. Morphology of the viable but non culturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. FEMS Microbiol.Lett. 123: 179-183.

Koo D, Traverso H, Libel M, Drasbek C, Tauxe R, Bennet B. 1997 El cólera epidémico en América Latina de 1991 a 1993: Implicaciones de las definiciones de casos usados en la Vigilancia Epidemiológica. Pan. American J. Public Health 1: 85-91.

Kumate, J., Sepúlveda, J. y Gutiérrez, G. 1993. El Cólera. Epidemias, Endemias y Pandemias. Ed. Interamericana, Mc Graw-Hill, México.

Kurath, G. and Morita, Y. 1983. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1206-1211.

Lares A, Vargas J, Luengo H, Paz A.1998. Epidemia de cólera en el Estado Zulia. 1996-1998. Resúmenes de los trabajos presentados en las XXV Jornadas Nacionales de Microbiología "Dr. Gustavo Prieto", Puerto La Cruz, Venezuela, 4-7 noviembre 1998. Boletín Sociedad Venezolana de Microbiología. p. 21.

Lee, J., and G. Kaletunc,. 2002. Calorimetric determination of inactivation parameters of microorganisms. J. Appl. Microbiol. 93:178–189.

Linder, K. and Oliver, J.D. 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2837-2842.

McCullers, J.A., y Tuomanen, E. 2001. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front..Biosci.* 1: 877-889.

Mackey, B. M., C. A. Miles, D. A. Seymour, and S. E. Parsons, 1993. Thermal denaturation and loss of viability in *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16:56–58.

Mackey, B.M., Miles, C.A., Parsons, S.E. and Seymour, D.A, 1991. Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137, p 2361-2374.

Mackey, B.M., Parsons, S.E., Miles, C.A. and Owen, R.J. 1988. The relationship between the base composition of bacterial DNA and its intracellular melting temperature as determined by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology* 134, 1185-1195.

Makukutu, C.A. and Guthie, R.K. 1986. Behavior of *Vibrio cholerae* in hot foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 824-827.

Maragiños, B., Romalde, J.I., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. 1994. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 180-186.

Mata, L. 1992. El Cólera: Historia, Prevención y Control. Ed. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

Mhalu, F.S., Mtango, F.D.E. and Msengi, A.E. 1984. Hospital outbreaks of cholera transmitted through close person-to-person contact. *Lancet.* 2: 82-84.

Miles, C. A., B. M. Mackey, and S. E. Parsons, 1986. Differential scanning calorimetry of bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 132:939–952.

Mohacsi-Farkas, C., J. Farkas, and A. Simon, 1994. Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. *Acta Aliment.* 23:157-168.

Morgan, J.A.W., Cranwell, P.A. and Pickup, R.W.. 1991. Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1777-1782.

Miyaki, K. Iwahara, S., Sato, K., Fujimoto, S. and Aibara, K. 1967. Basic studies on the viability of El Tor vibrios. *Bull. W.H.O.* 37: 773-775

Nilsson, L., Oliver D.J. and Kjelleberg, S. 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but non culturable state. *J. Bacteriol* 173: 5054-5059.

Perry J. Jerome, Starley T. James and Lory Stephen.2002. *Microbial Life*. Sunderland, Massachusetts. p 89-91.

Pollitzer, R. 1957. Cholera studies. *Bull. W.H.O.* 16: 738-857.

Postgate, J.R. 1967. Viability measurements and survival of microbes under minimus estress. *Adv.Microbiol. Physiol.* 1: 1-24.

Postgate, J.R and Hunter, J.R. 1962.The survival of starved bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 29: 233-263.

Privalov, P.1979. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.* 33: 167-241.

Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, Chowdhury, M.A.R. and Colwell, R.R. 1996. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 115-120.

Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E. and Colwell, R.R. 1994. Methionine Uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3573-3578.

Ravel, J., Knight, T.I., Monahan, E.C. Hill, T.R. Colwell, R.R. 1995. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? Microb. 141: 337-343.

Reily, L.A. and Hackney, C.R. 1985. Survival of *Vibrio cholerae* during cold storage artificially contaminated seafood. J. Food Sci. 50: 838-842.

Rigsbeer, W., Simpsons, M.L. and Oliver, D.J. 1997. Detection of viable but nonculturable state in *Escherichia coli* O157 H:7. J. Food Saf. 16: 255-261.

Rivera, I.G., Chowdhury, M.A.R., Huq, A., Jacobs, D., Martins and Colwell, R.R. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2898-2904.

Roger, I.G., Huq, I. And Yunus, M. 1980. Emergence of multiply antibiotic resistant *Vibrio cholerae* in Bangladesh . J. Infect. Dis. 142: 939-950.

Rollins, D.M. and Colwell R.R. 1986. Viable but nonculturable state of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. 52: 531-538.

Roszak, D.B., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. 30: 334-338.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. 5: 365-379.

Russell, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 255-261.

Salton, M.R.J. 1994. The bacterial cell envelope. A historical perspective. En *Bacterial cell wall.*(Ghuysen, J.M., y Hakenbeck, R., eds.) pp 1-22. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, The Netherlands.

Sánchez-Ruiz, J.M. 1992. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys.J.* 61: 921-935.

Sanchez-Ruiz, J.M. 1995. Differential scanning calorimetry of proteins. En *Subcellular Biochemistry; Proteins: Structure, Function and Genetics.* New York. p 133-176.

Secretetaria de Salud. 1994. Situación del cólera en México. *Boletín Cólera/Diarreas infecciosas.* Mexico.

Shahamat. M., Mai, U., Paszko-kolva, C., Kessel, M. and Colwell, R.R. 1993. Use of Autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1231-1235.

Siddique, A.K., Salam, A., Islam, M.S., Akram, K., Majumdar, R.N., Zaman, K., Fronczak, N. and Laston, S. 1995. Why treatment centers failed to prevent cholera deaths among Rwandan refugees in Goma, Zaire. *Lancet.* 345: 359-361.

Singh, A. and McFeters, G.A. 1987. Survival and virulence of copper-and chlorine-stressed *Yersinia enterocolitica* in experimentally infected mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1768-1774.

St-Louis, M.E., Porter, J.D., Helal, A., Drame, K., Hargrett-Bean, N., Well, J.G. and Tauxe, R.V. 1990. Epidemic cholera in west Africa: the role of food handling and high-risk food. *Am.J.Epidemiol.* 131: 719-728.

Stephens, P. J., and M. V. Jones, 1993. Reduced ribosomal thermal denaturation in *Listeria monocytogenes* following osmotic and heat shocks. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:177–182.

Swerdlow, D. L., Mintz, E. D., Rodriguez, M., Tejada, E., Ocampo, C., Espejo, I., Greene, K. D., Saldana, W., Seminario, I., Tauxe, R. V., Well, J. G., Bean, N. H., Ries, A. A., Pollack, M., Vertiz, B., and Blake, P. A. 1992. Waterborn transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru : Lessons for a continent at risk. *Lancet.* 340: 28-32

Tauxe R, Seminario L, Tapia R, Libel M. 1994. The Latin American Epidemic. En Wachsmuth K, Blake P, Olsvik O. *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to Global Perspectives. Ch. 21. American Society for Microbiology. Washington DC.

Teixeira, P., H. Castro, C. Mohacsi-Farkas, and R. Kirby, 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* 83:219–226.

Tolker-Nielsen, T., and S. Molin, 1996. Role of ribosome degradation in the death of heat-stressed *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142:155–160.

Singh, A. and McFeters, G.A. 1987. Survival and virulence of copper-and chlorine-stressed *Yersinia enterocolitica* in experimentally infected mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1768-1774.

Swerdlow, D. L., Mintz, E. D., Rodriguez, M., Tejada, E., Ocampo, C., Espejo, I., Greene, K. D., Saldana, W., Seminario, I., Tauxe, R. V., Well, J. G., Bean, N. H., Ries, A. A., Pollack, M., Vertiz, B., and Blake, P. A. 1992. Waterborn transmission

of epidemic cholera in Trujillo, Peru : Lessons for a continent at risk. *Lancet*. 340: 28-32

Valdespino, J.L., Garcia, M.L., Hinojosa, M., Sarti. E. y Sepúlveda, J. 1991. Epidemia de cólera en las Americas. *Ciencia y desarrollo*. 17: 55-64.

Valentine, R.C. and Bradfield. 1954. The urea method for bacterial viability counts with the electron microscope and its relation to other viability counting methods. *J. Gen. Microbiol.* 11: 349-357.

Varea, J., Monterroso, B., Saiz, J.L., García, J., López-Zumel, C., García, P y Menéndez, M. 2004. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. *J. Biol. Chem.* 279: 43697-43707.

Victoria León, T., Totosaus, A., Guerrero, I., Pérez Chabela, M.L., 2006. Efecto de Bacterias Ácido Lácticas Termoresistentes en Salchichas Cocidas. Vol. 5, numero 002. p 135-141

Votyakova, T.V., Kaprelyants, A.S. and Kell, D.B. 1994. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3284-3291.

Wai, S.N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H. and Amako K. 1996. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 187-191.

Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1982. Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. *Microb. Ecol.* 8: 313-323.

Zimmerman, R., Iturriaga R. and Becker-Birek. J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. Appl. Environ. Microbiol. 36: 926-935.