

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE CÉLULAS BACTERIANAS EN ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE A DIFERENTES FACTORES AMBIENTALES”

TÉSIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Ambientales

Presenta:

M. en C. Esmeralda Rangel Vargas

Director de Tesis:

Dr. Javier Castro Rosas

Co-director de Tesis

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Mineral de la Reforma, Hidalgo

Mayo de 2014.

Dedicatoria

A mis amores. Son la mejor decisión que he tomado en la vida. Su sola existencia me hace inmensamente feliz.

Mariana Guadalupe y Javier Alejandro

Agradecimientos

Comité de tesis.

Infinitas gracias por su apoyo e invaluable colaboración para que este trabajo pudiera ser realizado, sin su ayuda, no hubiera sido lo mismo.

A mis asesores de tesis

Gracias por su ayuda y oportuna guía.

A mi esposo

Por su apoyo e invaluable ayuda.

Resumen

Se estandarizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el estudio térmico de células bacterianas y se determinó la viabilidad de la técnica de DSC para cuantificar la actividad metabólica de células de *Escherichia coli* en caldo de soya tripticaseína (CST). Además, se estudió el estado viable no cultivable (VNC) de células de *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella* mediante DSC, espectroscopia de infrarrojo (IR) cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV), y se determinó la resistencia al pH y a la temperatura de células de *V. cholerae* y *Salmonella* en estado VNC. Se logró estandarizar la técnica de DSC para el estudio térmico de células bacterianas; las condiciones más adecuadas fueron el uso de crisoles de aluminio, vel. 5°C/min, peso promedio de 10 mg. Con la técnica de DSC se pudo cuantificar con precisión el crecimiento de *E. coli* a partir de diferentes concentraciones iniciales en CST a 35 °C. Dependiendo de la concentración inicial de *E. coli*, el calorímetro detectó actividad metabólica después de sólo unos pocos minutos o hasta en un máximo de cinco horas. El límite de detección del calorímetro fue de $4.3 \pm 0.4 \log_{10}$ UFC. La técnica de DSC resultó ser un método alternativo eficaz para medir el crecimiento bacteriano en TSB en tiempo real. Por otro lado, durante el desarrollo del estado VNC se observó un incremento en la resistencia térmica de casi 15 °C en las células de *V. cholerae*, mientras que para *Salmonella*, por el contrario, se presentó una disminución de más de 20°C en la resistencia térmica de las células. Sin embargo, para el caso de *E. coli*, no se observaron cambios en la resistencia térmica durante su ingreso al estado VNC. Con la técnica de IR se observó una disminución en la concentración del péptidoglicano de la pared de las células en

estado VNC de *Salmonella* así como cambios relacionas con las amidas A, I y II de las proteínas. Sin embargo, para *V. cholerae* aunque también se observan cambios en estas mismas regiones y para estas mismas estructuras los cambios fueron menos acentuados. Por último, el estado VNC no confirió resistencia a las células de *S. Typhimurium* o *V. cholera* al efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio, por el contrario las hizo más sensible.

Los resultados sugieren que el estado VNC es una condición fisiológica que podría conferir cierta protección a algunas bacterias frente al efecto de algunos factores ambientales; no obstante, a otras bacterias el estado VNC podría hacerlas más sensibles al efecto de los factores ambientales y a otras más, no provocar ningún cambio en su resistencia natural.

Índice de contenido

Resumen.....	i
Índice de Figuras.....	vii
Índice de tablas	x
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	4
2.1 Estado viable no cultivable de las bacterias.....	4
2.1.1. Factores que inducen el aparente estado VNC	6
2.1.2. Detección de células en posible estado VNC	7
2.1.3. Bacterias que entran al estado VNC.....	11
2.1.4. Cambios morfológicos y fisiológicos	11
2.1.5. Reversión del estado VNC.....	13
2.1.6. Implicaciones sanitarias.....	14
2.1.7. Implicaciones ambientales.....	15
2.2. <i>V. cholerae</i>	15
2.2.1. Clasificación serológica	16
2.3. Ecología de <i>V. cholerae</i> O1	18
2.3.1. El estado VNC como posible mecanismo de sobrevivencia del <i>V. cholerae</i> en el medio ambiente.....	19
2.4. <i>Escherichia coli</i> genérica	20
2.4.1. Características de <i>E. coli</i>	22

2.5. Salmonella	23
2.5.1 Factores de supervivencia	25
2.6. Papel del cambio climático.....	26
2.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	27
2.7.1 Principios de DSC.....	27
2.7.2. Análisis térmico de bacterias mediante calorimetría diferencial de barrido.....	29
2.8. Espectroscopia de infrarrojo.....	33
3. Objetivo general:	37
3.1. Objetivos específicos:	37
4. Metodología.....	38
4.1. Material biológico	38
4.1.1. Agua artificial de mar	38
4.1.2. Cepas.	38
4.1.3. Preparación de microcosmos	38
4.2. Técnicas analíticas.....	39
4.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
4.2.2. Recuento en placa	39
4.2.3. Cuenta directa de viables (CDV).....	40
4.2.4. Espectroscopia de infrarrojo (IR)	41

4.3. Experimentos	42
4.3.1. Estandarización de la técnica de DSC para evaluar la resistencia térmica de las células bacterianas.....	42
4.3.2. Medición de actividad metabólica y crecimiento bacteriano por DSC...	42
4.3.3. Inducción al estado VNC de células bacterianas por medio de escasez de nutrientes y baja temperatura.	44
4.3.4. Evaluación de la resistencia de células en estado VNC a la alta temperatura y desinfectantes químicos.	44
4.3.5. Determinación de los cambios estructurales de células en estado VNC mediante espectroscopia de infrarrojo (IRS).....	45
4.4. Análisis estadístico.....	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Estandarización de la técnica de DSC.....	47
5.2. Medición de la actividad metabólica y crecimiento bacteriano por DSC. ...	52
5.3. Inducción al estado VNC de las bacterias de estudio por CD y CDV.....	63
5.4. Estudios de DSC de las células de <i>V. cholerae</i> , <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> durante el desarrollo del estado VNC.	71
5.5. Estudio del estado viable no cultivable mediante IR	78
5.6. Pruebas de resistencia térmica en células bacterianas en estado VNC	90
5.7. Efecto del hipoclorito en células en estado VNC.....	96
6. Conclusiones.....	102

7. Bibliografia..... 104

Índice de Figuras

Figura 2.1. Termograma de las transiciones térmicas de células completas de <i>E. coli</i> y la asignación de picos a cada componente celular.	32
Figura 5.1. Termogramas de <i>E. coli</i> bajo distintas condiciones de velocidad de calentamiento.	48
Figura 5.2. Relación de incremento del peso con la entalpia del primer pico de las transiciones térmicas de <i>E. coli</i>	51
Figura 5.3. Termogramas de DSC de la actividad metabólica de <i>E. coli</i> para cuatro concentraciones diferentes de inóculo inicial en CST a 35 °C y pH 7.	53
Figura 5.4. Desarrollo de <i>E. coli</i> monitoreado mediante cuanta en placa a partir de cuatro concentraciones diferentes de inóculo inicial en CST a 35 °C y pH 7.	61
Figura 5.5. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de <i>V. cholerae</i> suspendidas en agua estéril de mar a 5 °C durante 45 días.	65
Figura 5.6. Células viables no cultivables de <i>V. cholerae</i> (naranjas) tenidas por la técnica de CDV después de 56 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia.....	65
Figura 5.7. Células viables no cultivables de <i>Salmonella</i> (naranjas) teñidas por la técnica de CDV después de 110 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia.....	66
Figura 5.8. Células viables no cultivables de <i>E. coli</i> (naranjas) teñidas por la técnica de CDV después de 110 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia.....	66
Figura 5.9. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de <i>Salmonella</i> en agua estéril de mar a 5°C durante 120 días.	67

Figura 5.10. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de <i>E. coli</i> en agua estéril de mar a 5°C durante 120 días.	67
Figura 5.11. Morfología celular de <i>V. cholerae</i> , A cultivo fresco de 24 h de desarrollo, B células después de 56 días suspendidas en agua de mar a 3°C horas. Fotografía obtenida mediante microscopía de contraste de fases.	70
Figura 5.12. Termogramas de células viables cultivables <i>V. cholerae</i> , <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> obtenidas por DSC.....	73
Figura 5.13. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de <i>V. cholerae</i> . D= días de almacenamiento en agua de mar y refrigeración de la cepa al momento del análisis.....	75
Figura 5.14. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de <i>S. Typhimurium</i> . D= días de almacenamiento en agua de mar y en refrigeración de la cepa al momento del análisis	77
Figura 5.15. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de <i>E. coli</i> . D= días de almacenamiento en agua de mar y en refrigeración de la cepa al momento del análisis.....	77
Figura 5.16. Espectros de IR de <i>S. typhimuirum</i> y <i>V. cholerae</i> en estado cultivable. los espectros están dividido en las 4 regiones de estudio.....	80
Figura 5.17. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC de a) <i>V. cholerae</i> y b) <i>S. typhimuirum</i>	83
Figura 5.18. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 1 (4000-2400cm ⁻¹) de a) <i>V. cholerae</i> y b) <i>S. Typhimurium</i>	85
Figura 5.19. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 2 (1800-1300cm ⁻¹) de a) <i>V. cholerae</i> y b) <i>S. Typhimuirum</i>	87

Figura 5.20. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 3 ($1300-900\text{cm}^{-1}$) de a) <i>V. cholerae</i> y b) <i>S. typhimurium</i>	89
Figura 5.21. Transiciones de <i>V. cholera</i> sometidas a inactivación térmica a 55, 65 y 70°C	92
Figura 5.22. Transiciones de células en estado viable y VNC de <i>S. Typhimurium</i> sometidas a inactivación térmica a 45, 55 y 65°C durante 10 min.	95
Figura 5.23. Efecto del hipoclorito en las células de <i>V. cholerae</i> en estado viable a 5 ppm y 10 ppm.....	98
Figura 5.24. Efecto del hipoclorito en las células de <i>V. cholerae</i> en estado viable no cultivable a 5 ppm y 10 ppm.....	98
Figura 5.25. Efecto del hipoclorito en células de <i>S. tiphymurium</i> en estado viable con 5 ppm y 10 pmm.....	100
Figura 5.26. Efecto del hipoclorito en células de <i>S. tiphymurium</i> en estado viable no cultivable con 5 ppm y 10 pmm	100

Índice de tablas

Tabla 2.1. Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	21
Tabla 2.2. Asignación tentativa de algunas bandas encontradas frecuentemente en espectros de IR. Adaptado de Naumann (2000).	35
Tabla 5.1. Valores de ΔH , T_o , T_p y T_c del primer pico obtenidos a cada una de las distintas velocidades de calentamiento. N=3.	49
Tabla 5.2. Tiempo (minutos) de detección del inicio de las señales exotérmicas (inicio del pico), máximo y final del pico y cantidad de calor total generado durante el crecimiento de <i>E. coli</i> a partir de cuatro concentraciones iniciales de inóculo...	55
Tabla 5.3. Concentración de células alcanzada al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de <i>E. coli</i>	62
Tabla 5.4. Asignación tentativa de bandas en el espectro de infrarrojo de células bacterianas.....	82

1. Introducción

El comportamiento y persistencia de los microorganismos en el medioambiente está determinado en gran medida por su entorno y por su potencial de adaptación. Aquellos microorganismos que son capaces de adaptarse a los cambios de su entorno y del medioambiente tienen mejores perspectivas de sobrevivencia. Por ello, para evolucionar tienen que desarrollar una diversidad de mecanismos y estrategias que les permitan adaptarse a las nuevas condiciones. En general, estos cambios los pueden experimentar todo tipo de microorganismos, incluidos los patógenos. Actualmente, muchos de los mecanismos y estrategias que desarrollan los microorganismos para lograr adaptarse a su entorno no han sido estudiados a fondo.

Recientemente, diversos estudios sugieren que los cambios climáticos, como el fenómeno del niño, incluso el calentamiento global, están teniendo una influencia directa en la aparición, resurgimiento e incremento o desaparición de enfermedades de etiología microbianas. No obstante, no se sabe con exactitud el papel de éstos fenómenos climáticos en la epidemiología de tales enfermedades. Como es el caso del cólera, una de las enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos, que actualmente se ha tornado endémico en muchos países subdesarrollados. En nuestro país las cifras disponibles mostraban un abatimiento hasta cero en los últimos años, sin embargo el año pasado se presentaron casos de cólera, principalmente en la zona de la huasteca hidalguense, pero también en la capital del estado, así mismo en otros países (como los del continente asiático), el número de casos se ha mantenido constante respecto al tiempo, en otros

prácticamente ha desaparecido y en otros está resurgiendo, como es el caso reciente en Haití, Cuba y recientemente México.

En los últimos años, se ha descubierto una condición fisiológica que se sugiere desarrollan todas las bacteria no esporuladas, conocida como estado Viable no Cultivable (VNC). Diferentes investigadores señalan que el estado VNC es una forma de resistencia que desarrollan las bacterias no esporuladas debido al estrés provocado por su entorno o el medio ambiente. Se menciona que en el estado VNC las bacterias pueden mantenerse viables por tiempo indefinido, y cuando las condiciones del medio son favorables, tal estado es revertido y los microorganismos continúan con su ciclo de vida. No obstante, se desconoce si efectivamente el estado VNC es una forma de resistencia a las condiciones ambientales que adquieren las bacterias como mecanismo de sobrevivencia.

Una de las causa del por qué no ha sido evaluada la resistencia a las condiciones ambientales de las células en estado VNC radica en la dificultad para realizar esta evaluación, ya que no se cuenta con técnicas para ello.

Recientemente se ha reportado el análisis de células bacterianas mediante técnicas no convencionales como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopia de infrarrojo (IRS) y espectroscopia de luz ultravioleta (UVS). Las evidencias sugieren la posibilidad de que mediante el empleo de estas técnicas en combinación con las técnicas convencionales de cultivo (TCC) y microscopia de luz visible UV (UVM) se pueda estudiar la resistencia de las células en estado VNC a los factores ambientales desfavorables para su sobrevivencia. Por tal motivo, el presente estudio está enfocado en evaluar la resistencia de células de *Vibrio cholerae*, *Salmonella*

Typhimurium y *Escherichia coli* en estado VNC a diferentes factores ambientales mediante DCS, IRS, UVS, TCC, UVM.

2. Antecedentes

2.1 Estado viable no cultivable de las bacterias

Antes de abordar el tema del estado viable no cultivable (VNC) es importante mencionar 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 bacterianas 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 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. 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 la integridad de la membrana. El término “moribundo” fue sugerido por Postgate (1967) para referirse a un estado intermedio a los anteriores así mismo 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 quistes producidos por algunos microorganismos son un mecanismo de sobrevivencia y se pueden encontrar en diversos grupos microbianos. La espora, le confiere además 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. Roszak y col. (1984), describieron la existencia de células de *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 no esporuladas podría ser un análogo al de las esporas de las bacterias esporuladas.

En la actualidad el concepto más aceptado sobre el estado VNC, 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 col., 1991; Rahman y col., 1994; Huq y 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 tal condición no cultivable, es posible que desarrolle un cuadro de cólera (Huq y Colwell, 1996). El desarrollo del estado VNC 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*.

2.1.1. Factores que inducen el aparente estado VNC

Diversos investigadores sugieren que factores tales como la temperatura, pH, salinidad, presión osmótica, escasez de nutrientes y antimicrobianos inducen a las bacterias al estado VNC (Xu y col., 1982; Huq y col., 1983; Ravel y col., 1995). No obstante, 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 un decremento en la recuperación del patógeno en los medios de cultivo, no obstante que la población se mantiene viable. Xu y col. (1982) observaron que *V. cholerae* y *E. coli* entran al estado VNC como respuesta al incremento de la salinidad del medio. Otros investigadores reportan que disminuciones en la concentración de los nutrientes y de la temperatura del medio (4-5°C), inducen a *V. cholerae* al estado VNC (Ravel y col., 1995). La condición VNC se ha demostrado en prácticamente todas las bacterias patógenas como *Vibrio vulnificus* (Nilsson y col., 1991), *Salmonella enteritidis* (Roszak y col., 1984), *Shigella sonnei* y *flexneri* (Colwell y col., 1985), *E. coli* O157:H7 (Rigsbeer y col., 1997), *Yersinia enterocolitica* (Singh y McFeters, 1987) *Aeromonas salmonicida* (Morgan y col., 1991) y *Legionella pneumophila* (Hussong, y col., 1987). También se ha observado en bacterias no patógenas al hombre como *Pasteurella piscicida* (Maragiños y col., 1994), *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus faecalis* y *Micrococcus flavus* (Byrd y col., 1991), entre mucho otros.

2.1.2. Detección de células en posible estado VNC

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 col., 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 congó 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 col., 1993). Zimmerman y col. (1978), desarrollaron una técnica para diferenciar bacterias vivas de muertas, basándose en la actividad respiratoria. Para ello utilizó el colorante redox cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazalium (INT), el cual compite 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 col., 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 nalidixico. El ácido nalidixico 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 col., 1979a)

Existen varios métodos específicos y sensibles desarrollados en los últimos años para poner de manifiesto las células en posible estado VNC. El método de cuenta directa de células viables (CDV) desarrollado por Kogure y col. (1979a), 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 estado VNC 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 col., 1990). Mediante esta técnica Huq y col. (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 estado VNC (Brayton y Colwell, 1987). Esta técnica combinada, puede ser usada

para detectar números discretos de microorganismos en posible estado VNC a partir de alimentos y muestras de agua, previa concentración de las bacterias en filtros (Hasan y col., 1995).

La técnica del p-nitrofenil-tetrazolium (ITN) desarrollada por Zimmerman y col. (1978), en combinación con la técnica de CDV de Koguel y col. (1979), ha sido propuesta como el método INT-CDV por Hasan y col. (1995). Así se han detectado células en estado VNC de *Aeromonas hydrophila* (Hasan y col., 1995) y *Shigella dysenteriae* (Rahman y col., 1996) a partir de agua contaminada. Una técnica recientemente 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.); ésta se propuso para distinguir células bacterianas en estado VNC 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 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 estado VNC de *E. coli* O157 H:7 (Rigsbeer y col., 1997). Ha sido empleada también por Bogosian y col. (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. Existen métodos más sofisticados para poner de manifiesto a las células no cultivables, tales como la autoradiografía o la citometría de flujo (Shahamat y col., 1993; Votyakova y col., 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 col., 1994), pruebas con oligonucleotidos (Heidelberg y col., 1993) o hibridación del ADN (Rivera y col., 1995).

2.1.3. Bacterias que entran al estado VNC

El número de especies descritas que entran en el estado VBNC aumenta constantemente, con aproximadamente 60 hasta ahora reportadas que presentan esta respuesta fisiológica. Se incluyen un gran número de patógenos humanos, incluyendo *Campylobacter* spp., *E. coli* (incluyendo cepas EHEC), *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, varios serotipos de *Salmonella* spp, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*. Este último ha sido el más estudiado en lo que respecta al estado VNC (Oliver, 2005).

2.1.4. Cambios morfológicos y fisiológicos

En el estado VNC las bacterias pueden experimentar una serie de cambios morfológicos y fisiológicos (Kondo y col., 1994; Chowdhury y col., 1995). El *V. cholerae* sufre una secuencia de cambios en su estructura celular (Chowdhury y col., 1995). Kondo y col. (1994), mediante microscopía electrónica observaron que

V. cholerae en el estado VNC 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 *V. vulnificus* decrecen en un 57 % sus niveles al entrar el patógeno a la condición VNC; las células adquirieron una morfología cocoide, disminuyeron de tamaño y exhibieron pocos ribosomas. Hazeleger y col. (1995) en estudios efectuados con *Campylobacter jejuni*, observaron que las células del patógeno al entrar al estado VNC, disminuyen de tamaño y adquieren una morfología cocoide. Por otro lado, no encontraron diferencias en el perfil de proteínas entre las células en estado VNC 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 estado VNC. Con base en su 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 éste potencial. Se ha demostrado que *C. jejuni*, *E. coli*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, y *S. dysenteriae* mantienen su virulencia en el estado VNC (Colwell y col., 1985; Jones y col., 1991; Rahman y col., 1994). Algunos autores señalan la posibilidad de que todos los patógenos en la condición no cultivable retengan su virulencia (Huq y Colwell, 1996).

2.1.5. Reversión del estado VNC

La no recuperación en medios de cultivo de microorganismos en el estado VNC ha estimulado investigaciones tendientes a revertir dicho estado. Algunos investigadores han reportado reversión de la condición VNC de las bacterias luego de aplicar ciertos tratamientos a la población no cultivable. Por ejemplo, se ha reportado que mediante la adición de nutrientes al medio es posible revertir el estado VNC de *S. enteritidis* (Roszak y col., 1984). Nilsson y col. (1991) observaron que *V. vulnificus* puede salir del estado VNC al incrementar la temperatura de 4 a 23 °C. De igual forma Ravel y col. (1995) señalan que *V. cholerae* en estado VNC suspendido en agua artificial de mar y mantenido a 4 °C, revierte tal condición al incubar el sistema a 30 °C / 72 h. Wai y col. (1996), lograron revertir la condición no cultivable de *V. cholerae* por medio de un choque térmico. Se ha descrito también que mediante modificaciones en la composición de los gases es posible también revertir la condición no cultivable de *C. jejuni* (Bovill y Mackey, 1997). A pesar de todos los estudios que existen donde se sugiere reversión del estado VNC, existe mucha controversia al respecto, ya que algunos autores afirman que no existe tal reversión, y que lo que han observado los investigadores que así lo reportan es la multiplicación de algunas células vivas cultivables, que están presentes en el medio mezcladas con la VNC, y no la reversión de la población en estado VNC.

Una condición con cierta semejanza al estado VNC es el estrés celular. Este 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 col., 1995; Hoffmans y col., 1997). A diferencia de las células en estado VNC, las estresadas tienen la peculiaridad de que se desarrollan en un medio libre de inhibidores, pero no en uno que contenga inhibidores que en condición de no estrés la inhiben (por ejemplo, medios selectivos específicos para ese microorganismos) (Hoffmans y col., 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.

Desde cierta perspectiva, el estado VNC podría considerarse un tipo de estrés celular. Es posible que las células en este estado fisiológico puedan ser cultivables en un medio de laboratorio, precedido de un tratamiento específico (calor por ejemplo); sin embargo, no se han encontrado las condiciones adecuadas para lograr la reversión.

2.1.6. Implicaciones sanitarias

Es importante resaltar que los patógenos en el posible estado VNC, representan un mayor peligro para la población desde un punto de vista práctico. Por ejemplo, para el caso de *V. cholerae*, 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 de VNC. 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 VNC en todo tipo de alimentos.

2.1.7. Implicaciones ambientales

Los seres humanos han reconocido que las condiciones climáticas influyen en la aparición y dispersión de enfermedades epidémicas (NRC, 2001). Por lo cual y bajo las premisas del cambio climático, los patrones de difusión y diseminación de enfermedades infecciosas están cambiando, haciendo más importantes los métodos y formas de determinación de los agentes causales de enfermedad para su prevención. De esta forma, es importante estudiar si el estado VNC de agentes patógenos, como *V. cholerae*, realmente proporcionará resistencia a las bacterias ante los cambios ambientales a los que puedan ser sometidos y que si en el este estado es capaz de mantener su patogenicidad y virulencia a través de un intervalo de tiempo y espacio determinado.

2.2. V. cholerae

V. cholerae O1 se encuentra situado dentro del orden *Pseudomonadales*, familia *Vibrionaceae*. Las especies del género *Vibrio* son gram-negativas y tiene 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 confiere movimiento vibrátil. Son aerobios facultativos, poseen ambos metabolismos,

respiratorio y fermentativo (Baumann y Shubert, 1984). El patógeno tiene capacidad de fermentar glucosa, lo que le distingue de otras *Pseudomonadaceae*. La mayoría de los vibrios producen citocromo-oxidasa, lo que les distingue de las *Enterobacteriaceae*. 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 mínima concentración necesaria es del orden de 5-700 mM, por lo que muchas especies crecen bien en medios que contengan agua de mar (Ravel y col., 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 col., 1980; Bourque y col., 1986). *V. cholerae* es susceptible a la desecación, el calor, desinfectantes químicos como el cloro y a antibióticos como las tetraciclinas (Kumate y col., 1993).

2.2.1. Clasificación serológica

Se han descrito más de 140 grupos serológicos de acuerdo al antígeno somático O de *V. cholerae*, entre los cuales el grupo O1 produce la enterotoxina colérica (Mooi y Bik, 1997). Las cepas que no reaccionan con el antígeno O1 son llamadas *V. cholerae* no-O1 (Kumate y col., 1993). El antígeno O somático, es un polisacárido típico de las bacterias gram-negativas, el cual es un componente de

la membrana externa de la célula. Las porciones lipídicas tienen actividad endotóxica y la especificidad antigénica depende de los polisacáridos. El antígeno O es importante para su diagnóstico, a diferencia del antígeno H (flagelar) que es compartido con muchos vibrios no patógenos (Anónimo, 1975). Las cepas del serovar O1 muestran notable consistencia en su comportamiento fisiológico e inmunológico (Kumate y col., 1993), pero no en diversidad genética, aún dentro de una región geográfica (Mekalanos, 1997). A estas cepas se les denomina epidémicas. Muchas cepas de otro serovares tienen propiedades patógenas y pueden causar diversas formas de diarrea o lesiones extraintestinales (Kumate y col., 1993).

V. cholerae O1 incluye dos biotipos, el Clásico y El Tor. Se cree que el biotipo clásico generó las pandemias del siglo XIX. Las primeras cepas de El Tor fueron aisladas a principios del siglo XX de cadáveres de peregrinos que permanecieron en la estación de cuarentena El Tor en la península del Sinaí (Mata, 1992). El Tor es el biotipo que actualmente causa la séptima pandemia de cólera (Mata, 1992).

El biotipo clásico se distingue por su alta tasa de ataque, generar cuadros de diarrea graves, ser muy virulento, y poseer una tasa de letalidad de 10 hasta 50 por ciento. El biotipo El Tor es menos virulento, tiene una menor tasa de ataque y una letalidad considerablemente más baja que el clásico. Mientras el clásico ha ido desapareciendo, dejando solo un reducto en Bangladesh, El Tor muestra tendencia a persistir en el ecosistema de muchos países, tornándose endémico (Kumate y col., 1993). Bioquímicamente los biotipos se diferencian por la producción de acetilmetilcarbinol (reacción de Voges Proskauer), hemaglutinación

de eritrocitos de pollo, sensibilidad a la polimixina y sensibilidad a los fagos IV y V (Kumate y col., 1993).

Los dos biotipos comprenden tres serotipos asociados a antígenos O: el Inaba y el Ogawa, que son los principales y el Hikojima, que es raro. Esta especificidad se debe a la presencia de tres antígenos llamados A, B, y C. El serotipo Inaba contiene los antígenos A y C; el serotipo Ogawa los antígenos A y B; y el serotipo Hikojima los tres A, B y C (Mata, 1992). Existen evidencias que sugieren que los tipos Inaba e Hikojima resultaron de mutaciones in vivo. Por otro lado, el serotipo Hikojima es poco estable y se ha reportado que puede experimentar interconversiones transformándose a menudo en cualquiera de los otros serotipos (Stroeher y col., 1992). En el laboratorio los serotipos se diferencian mediante pruebas de aglutinación en láminas, de cepas que primero han aglutinado francamente con suero de conejo polivalente anti O1, y después con sueros específicos anti-Inaba o anti-Ogawa (Kayser y col., 1992).

Existen cepas de *V. cholerae* que no aglutinan con el antisuero O1 que se denominan *V. cholerae* no-O1. Los vibrios no-O1 pueden causar gastroenteritis de uno a tres días de evolución, así como infecciones extraintestinales como septicemia, otitis media, infección de heridas y cistitis (Kumate y col., 1993).

2.3. Ecología de *V. cholerae* O1

Tradicionalmente, los epidemiólogos del cólera consideraban que el único reservorio de *V. cholerae* era el intestino humano y que las perspectivas de su sobrevivencia fuera del intestino eran mínimas (Felsenfeld, 1966). Recientemente

diversas evidencias sugieren fuertemente que *V. cholerae* es capaz de sobrevivir largo tiempo fuera del intestino humano, principalmente en ambientes acuáticos (Colwell y col., 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, 1980), y los estudios de biología molecular efectuados por diferentes investigadores, revelan que el vibrión puede ser un componente autóctono de las aguas salobres, estuarios, litorales y pantanos salados en zonas templadas (Hood y col., 1981).

Ante estos hallazgos, las investigaciones se han enfocado al estudio de la ecología de *V. cholerae* en el medio acuático y en su interacción con la micro y macroflora residente (Colwell y col., 1981). Es importante destacar que la adherencia participa de manera importante en la interacción de *V. cholerae* con superficies o individuos marinos.

2.3.1. El estado VNC como posible mecanismo de sobrevivencia del *V. cholerae* en el medio ambiente

Huq y col. (1983), con base en numerosos estudios sobre la ecología del *V. cholerae* en ambientes acuáticos, señalan que un posible mecanismo de sobrevivencia del patógeno en el medio marino, sería el desarrollo del estado VNC de células de *V. cholerae* adheridas a superficies de copépodos. Los investigadores sugieren que estas células pueden experimentar el estado VNC en un ambiente desfavorable para su sobrevivencia como ocurre durante los meses lluviosos o de ciclones, por ejemplo. Bajo tales circunstancias, los nutrientes escasean y las condiciones ambientales se tornan extremas. Mencionan los

autores que bajo la condición VNC el *V. cholerae* puede sobrevivir adherido a los copépodos y subsecuentemente salir de tal condición y multiplicarse sobre la superficie del animal cuando las condiciones del medio revierten o son favorables. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado evidencias experimentales que refuerzan esta hipótesis. Se desconoce además si efectivamente el patógeno es capaz de desarrollar la condición VNC adherido a la superficie de animales acuáticos.

2.4. Escherichia coli genérica

E. coli es el microorganismo procarionte más estudiado en el área biológica debido a sus características genéticas, metabólicas y de cultivo que han sido la base para la ingeniería genética y la biotecnología moderna (Lederberg, 2004). Esta bacteria fue identificada en 1885 por Theodore von Escherich quien la denominó *Bacterium coli commune*. En 1895, el nombre de *B. coli commune* cambió por *E. coli* en honor a su descubridor. En la tabla 2.1, se resume la clasificación de este microorganismo según el manual de Bergey's (1994).

E. coli es el miembro principal de la flora intestinal del colon de animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano. Coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido y permanece toda la vida en simbiosis. Las funciones de *E. coli* en el humano son mantener saludable la fisiología intestinal y la síntesis de las vitaminas B y K (BAM, 1998; Vidal, 2003). Su presencia en los alimentos indica contaminación fecal reciente, ya que tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico. Es por ello que está considerada como un buen indicador de contaminación fecal (Pascual y Calderón, 2000).

Tabla 2.1. Clasificación de *Escherichia coli*.

Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Tribu	<i>Escherichieae</i>
Género	<i>Escherichia</i>
Especies	<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. blattae</i> , <i>E. vulneris</i> <i>E.</i> <i>fergussoni</i>
Fuente: Manual de Bergey's, 1994.	

2.4.1. Características de *E. coli*.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo (-), anaerobio facultativo, no esporulado, de dimensiones 1.1 a 1.5 μm (largo) x 2 a 6 μm (ancho), generalmente con flagelos peritricos y fimbrias (Bergey's Manual., 2005). Frecuentemente presenta una microcápsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoides; la mayoría son fermentadoras de lactosa y producen gas a partir de glucosa (Bergey's Manual., 2005). Este microorganismo tiene ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo (BAM, 1998). Su crecimiento es exponencial a temperaturas entre 7 y 45 °C (Jones y col., 2006) y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración (6 a 4 °C). El tiempo de generación de esta bacteria es cada 20 min, en medios de enriquecimiento (Lederberg, 2004). El pH óptimo para su crecimiento es de 7 con intervalos de 4.4 a 9.0, sin embargo; se ha aislado a pH de 3.7 (Cerna, 2003). Algunos reportes indican que la bacteria puede crecer a pH cercanos al neutro (6 a 8) pero no a 4 ó 5 (ajustando el caldo con ácido acético) (Schilling, 2008). Esta bacteria crece en medios de cultivo simple y sintético, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Cataboliza la D-Glucosa y otros carbohidratos con formación de ácido y gas (BAM, 1998).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son no patógenas, aunque existen algunas que son patógenas (Pascual y Calderon, 2000). Las cepas no patógenas pueden ser oportunistas y causar infecciones en humanos inmunocomprometidos. Mientras que las cepas patógenas pueden causar enfermedades gastrointestinales y diarrea en humanos saludables (Montville y Matthews, 2005).

Las cepas de *E. coli* son clasificadas dentro de grupos específicos basados en sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, cuadros clínicos y antígenos de superficie (Bergey's Manual, 1994; Montville y Matthews, 2005).

Se ha subdividido serológicamente a la *E. coli* patógena por la presencia de factores de virulencia para identificarlas o caracterizarlas epidemiológicamente. La caracterización serológica de *E. coli* se realiza mediante el análisis de tres antígenos de superficie: 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 74 capsulares (K) (Rodríguez-Ángeles, 2002; Montville y Matthews, 2005).

Es necesario determinar los antígenos O y H para los serotipos asociados con diarrea. El antígeno O identifica al serogrupo de una cepa, y el antígeno H identifica al serotipo (Bergey's Manual, 1994).

Se han descrito al menos seis grupos patógenos de *E. coli*: enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroadherente y enteroagregativa (Kasper col., 2004).

2.5. Salmonella

Desde hace cien años hay información que relaciona las bacterias del género *Salmonella* con padecimientos en humanos y animales. En la actualidad la salmonelosis es la principal causa de enfermedad transmitida por los alimentos en la mayoría de los países desarrollados y en los subdesarrollados es una de las más importantes causas de muerte.

El género *Salmonella* fue creado definitivamente en 1900 por Lignieres y se le denominó así en honor del Dr. D.E. Salmon, bacteriólogo norteamericano

codescubridor y que describió por primera vez la *Salmonella* entérica (antaoño conocida como *cholerae-suis*).

Aunque en la actualidad existen alrededor de 2300 serovares, todos considerados potencialmente patógenos al humano, sólo 200 han sido asociados con enfermedad humana.

La clasificación de los microorganismos que se incluyen en el género *Salmonella* se encuentra bajo revisión. La clasificación según Edwards y Ewing (1972) se aplica principalmente en Estados Unidos, y reconoce tres especies: *typhi*, *choleraesuis* y *enteritidis*.

Por otra parte, con fines epidemiológicos, el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y muchos otros autores coinciden en que el género *Salmonella* se le puede agrupar en tres grupos (Pérez Miravete, A. 1974):

- a. Los que infectan solamente a personas, incluye: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* y *Salmonella paratyphi C*. Este grupo incluye a los agentes de la fiebre tifoidea y paratifoidea que son las más graves de las enfermedades producidas por las *Salmonellas*.
- b. Los que pueden adquirirse al consumir alimentos, incluye: *S. gallinarum* (aves), *S. dublin* (bovinos), *S. abortus-equi* (equinos), *S. abortus-ovis* (ovinos) y *S. cholerae-suis* (cerdos).

- c. Serovares inadaptados (sin preferencia de hospedador). Son patógenos para humanos y otras especies animales, e incluyen a la mayoría de los serovares transmitidos por alimentos.

El hábitat natural (fuente) de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos y animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, habitualmente sin presentar ninguna enfermedad manifiesta.

El humano no representa más que un eslabón en la cadena contaminante. Los animales domésticos o salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir del cual las salmonellas pueden difundirse al ambiente y en especial al agua y alimentos. Pueden ser diseminadas por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales incluidas (personas).

2.5.1 Factores de sobrevivencia

La frecuencia de aislamiento y sobrevivencia de *Salmonella* en el medio ambiente y otros sustratos está determinada por factores ecológicos como la temperatura, actividad de agua, pH, potencial de óxido-reducción, exposición a agentes germicidas, la composición del material en que se encuentra y la humedad ambiental. Según Bryan el tiempo de permanencia del microorganismo varía de días hasta meses, los tiempos más prolongados se observan en polvo, pasturas y ropa. Es importante resaltar que el grado de sobrevivencia en heces depende de la especie animal (Torres Vitela y col., 2013).

Cuando el germen enfrenta condiciones de estrés fisiológico por efecto del calor, congelación, desecación, acidez, sustancias microbianas, escases de nutrientes

y otros agentes, responde sintetizando nuevas proteínas que concentra fuera de la membrana (Fernández Escartin, 2000).

Por efecto de la congelación, una proporción importante de la población bacteriana sufre daños fisiológicos y estructurales, y en situación extrema la muerte. La patogenicidad de los sobrevivientes no se altera (Sorrells y col., 1970). La resistencia a la desecación y a la congelación no es idéntica para todos los serovares. Aparentemente aquellos que se aíslan con mayor frecuencia de casos de salmonelosis exhiben un mayor grado de resistencia. Es posible que éste último factor contribuya a determinar esa frecuencia selectiva (Enkiri y Alford, 1971).

2.6. Papel del cambio climático

El aumento de las temperaturas atmosféricas y de la superficie ya está contribuyendo a la carga mundial de enfermedades y muertes prematuras, y se prevé que influyen en la dinámica de transmisión y distribución geográfica de la malaria, el dengue, las enfermedades transmitidas por las garrapatas y las enfermedades diarreicas como el cólera (IPCC, 2007a). El calentamiento global también está acelerando el ciclo hidrológico en todo el mundo, aumentando la intensidad, frecuencia y duración de las sequías, fuertes precipitaciones y las inundaciones (IPCC, 2007a). Tales fenómenos meteorológicos extremos han ido en aumento (IPCC, 2007a) y se han ligado al calentamiento global (Hoyos y col., 2006). Estos fenómenos meteorológicos, a su vez, contribuyen y aumentan el riesgo de una amplia gama de enfermedades transmitidas por vectores y por no vectores en los seres humanos, plantas y animales (IPCC, 2007b). De esta forma,

enfermedades como el cólera y la malaria se han relacionado con cambios estacionales cuando los caudales máximos y las temperaturas son altas, coincidiendo estos datos con los años en los que se presentó el fenómeno de El Niño, donde también se registraron temperaturas muy por encima de las normales (Wandiga, 2006). De esta manera se han hecho avances en la comprensión de las epidemias, como la del cólera, y se ha ido descubriendo que las epidemias están significativamente influenciadas por factores climáticos (Colwell, 1996; Lobitz y col., 2000; Lipp y col., 2002; Pascual y col., 2002; Colwell y col., 2003; Ruiz Moreno y col. 2007). De aquí varios factores medioambientales del ciclo estacional del cólera han sido identificados en la India y Bangladesh, donde el cólera es endémico (Colwell, 1996; Bouma y Pascual, 2001). El patrón de cambios en estos parámetros, se mostró que estaba relacionado con la dinámica de *V. cholerae* en las aguas costeras, estuarios y ribereñas de la bahía de Bengala y las epidemias de cólera causada por estas bacterias en esta región del mundo (Lobitz, 2000). Es decir, el distinto patrón estacional del cólera, en países donde la enfermedad es endémica se ha correlacionado con factores del medio ambiente y el clima que impulsan tanto la dinámica poblacional de copépodos y otras especies acuáticas y con los picos estacionales de la abundancia de *V. cholerae* en el ecosistema acuático de la Bahía de Bengala.

2.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

2.7.1 Principios de DSC.

La DSC es una técnica de análisis térmico que mide la diferencia de flujo de calor entre una muestra y una referencia como una función de la temperatura a una

velocidad de calentamiento fija (Chowdhry y Cole, 1989; Hohne col., 1996). La DSC detecta y monitorea transiciones conformacionales inducidas térmicamente y transiciones de fase cuando los componentes de la muestra se calientan. Los datos de DSC permiten determinar la temperatura de transición (T_m), la capacidad calorífica (C_p), y el calor de transición (ΔH) (Chowdhry y Cole, 1989; Hohne col., 1996; Kaletunc, 2001).

Cuando en el calorímetro se produce un suceso térmico en el crisol de muestras, un diferencial de temperatura (dT) se crea entre la muestra y la zona de referencia; termopares que se encuentran rodeado ambos crisoles detectan la dT por tiempo. El software del DSC convierte la dT detectado al flujo de calor (Q , J / s) frente a la temperatura (T , °C) mediante la ecuación;

—

donde k es la conductividad térmica del crisol ($Q/m^{\circ}C$); A es el área a través de la cual el calor fluye (m^2), y L es el espesor del crisol (m). Como resultado, los cambios en la muestra que se asocian con la absorción o desprendimiento de calor causan un cambio en el flujo de calor diferencial, que se registra como una curva de DSC (termograma, figura 2,1).

El valor de la Q se evalúa para calcular la capacidad calorífica (C_p) mediante una ecuación;

—

donde r es velocidad de calentamiento ($^{\circ}\text{C} / \text{s}$) y m es el peso de la muestra (g). El área bajo el pico es directamente proporcional al calor o cambio entálpico ($\Delta H = C_p \Delta T$) y su dirección indica si el evento térmico en una muestra es endotérmica (desnaturalización o de fusión) o exotérmica (cristalización o agregación). El pico característico de este tipo de trama proporciona la temperatura de transición (estabilidad térmica, T_m) en el que el evento térmico está en el punto máximo del pico.

2.7.2. Análisis térmico de bacterias mediante calorimetría diferencial de barrido.

Las bacterias tienen diferentes componentes celulares, tales como la envoltura celular, ribosomas, ácidos nucleicos y proteínas. Dado que las estructuras básicas de los componentes macromoleculares son biopolímeros, los componentes en células enteras pueden ir a través de transiciones conformacionales tras la exposición a calentamiento por DSC. En DSC, las transiciones se registran como picos endotérmicos (absorción de calor) o exotérmicos (pérdida de calor) en una gráfica conocida como termograma. La primera aplicación del DSC en el análisis térmico bacteriano fue el estudio de las propiedades físicas de las biomembranas. Steim y col. (1969), estudiaron las propiedades físicas de los lípidos presentes en las membranas celulares de *Mycoplasma laidlawii* utilizando DSC de células enteras, membranas celulares aisladas, y los lípidos extraídos. Se encontró que ambas membranas celulares aisladas y los lípidos extraídos de membrana mostraron una transición endotérmica alrededor de 40°C en el termograma del DSC.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha empleado para monitorear las transiciones conformacionales específicas en diversos componentes celulares de las células intactas como una función de la temperatura a fin de comprender la secuencia de acontecimientos que conducen a la inactivación de los microorganismos (Alpas y col., 2003; Anderson y col., 1991; Belliveau y col., 1992; Lee y Kaletunc, 2002a, 2002b; Lepock y col., 1990; Mackey y col., 1988; Mackey y col. 1991; Mackey y col., 1993; Miles y col., 1986; Nivel y col., 1999; Verrips y Kwast, 1977). La estabilidad térmica de los ribosomas se ha demostrado que se correlaciona con la temperatura de crecimiento de las células, y la desnaturalización de los ribosomas se ha propuesto como un mecanismo de lesión celular o la muerte (Alpas y col., 2003; Belliveau y col., 1992; Lee y Kaletunc, 2002a, 2002b; Lepock y col., 1990; Mackey y col., 1988; Mackey y col., 1991, Mackey y col., 1993; Miles y col., 1986; Teixeira y col., 1997). Además de cambios térmicos inducidos por el tratamiento, la DSC ha sido utilizada para evaluar el efecto de diversos factores físicos y químicos de inactivación bacteriana mediante la comparación de los termogramas antes y después de los tratamientos (Alpas y col., 2003; Niven y col., 1999).

Los termogramas generados con la calorimetría diferencial de barrido (DSC) de células bacterianas enteras muestran las transiciones térmicamente inducidas que revelan la respuesta al calor de las bacterias bajo condiciones de temperatura linealmente creciente. Un número de la superposiciones de las transiciones con un efecto endotérmico neto se observan cuando los microorganismos se calientan (Miles y col., 1986; Anderson y col., 1991; Mackey y col., 1991; Belliveau y col.,

1992; Kaletunc, 2001). Los picos de transición observadas corresponden a la desnaturalización de componentes celulares. La temperatura de un pico corresponde a cada transición que representa la estabilidad térmica de un componente celular de las bacterias. Mackey y col. (1991), investigaron los orígenes de aparentes transiciones individuales en el termograma de *E. coli*. Los picos individuales observados en los termogramas de células enteras de *E. coli* fueron asignados a componentes de la célula mediante la comparación de las temperaturas de transición de los componentes celulares aisladas con transiciones correspondientes en células enteras (figura 2.1). Además, la medición del DSC proporciona información sobre la cantidad de energía térmica (entalpía aparente, ΔH) asociada con la transición. Se cree que existe una fuerte relación entre la muerte térmica de las bacterias y el primer pico principal en los termogramas de DSC (rango de temperatura de 60 - 80 ° C), que se atribuye a la fusión ribosomal (Mackey y col. 1993; Teixeira col., 1997). Varios investigadores han demostrado correlaciones entre la estabilidad de los ribosomas y la viabilidad celular de *S. aureus* (Allwood y Russel, 1967), *L. monocytogenes* (Stephens y Jones, 1993), y *S. Typhimurium* (Tolker-Nielsen y Molin, 1996). Además, una reciente investigación con DSC sobre *E. coli* sometida a presión, demostró que la mortalidad de las células está estrechamente relacionada con el daño a los ribosomas (Niven y col., 1999). En otro estudio se observó que la desnaturalización irreversible del ADN requiere temperaturas muy por encima de la temperatura de inactivación celular (Mackey y col., 1991). A temperaturas que causan la desnaturalización o destrucción de los ribosomas, la desnaturalización el ADN es reversible (Mohacsi-Farkas y col., 1999).

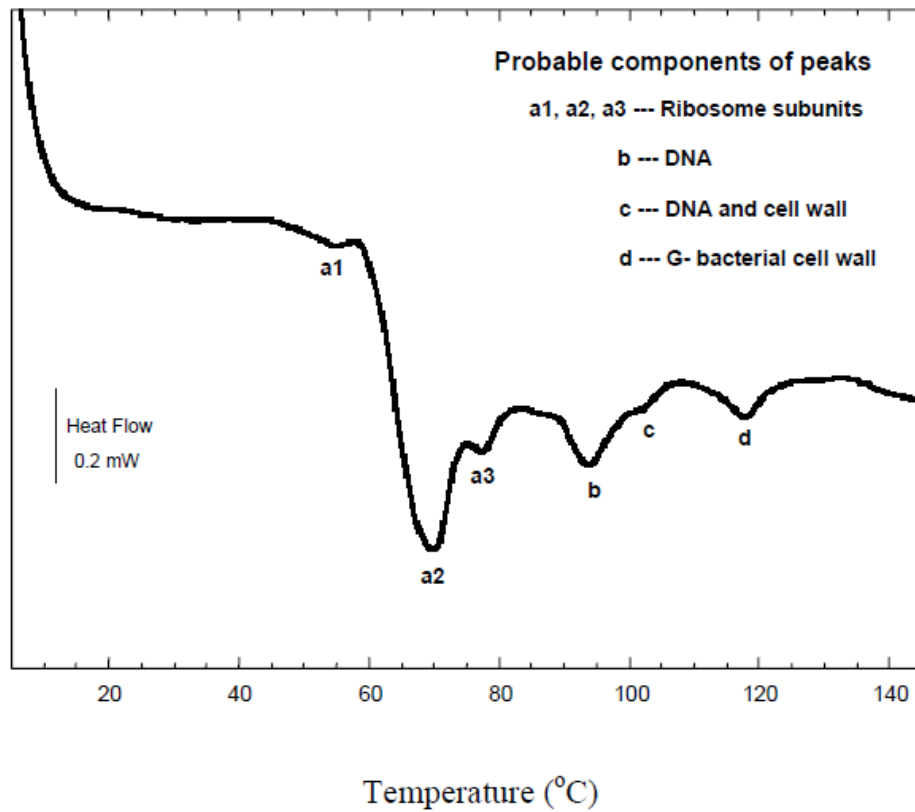


Figura 2.1. Termograma de las transiciones térmicas de células completas de *E. coli* y la asignación de picos a cada componente celular.

Por lo tanto, la técnica de DSC puede ser utilizada para la caracterización térmica de los microorganismos antes y después de la aplicación de un tratamiento para evaluar el impacto de éste sobre la célula bacteriana. La comparación de los diversos termogramas obtenidos después de aplicar diferentes tratamientos contra termogramas obtenidos a partir de células bacterianas que no fueron sometidas a los tratamientos, permitirá conocer su efecto sobre la célula.

2.8. Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en el uso de radiación de infrarrojos (IR) que cambia el comportamiento de vibración de las moléculas mediante la entrega de cuantos de energía y el cambio de sus modos de vibración y rotación. La radiación IR comúnmente abarca la radiación electromagnética cuya frecuencia está comprendida entre $14,300$ y 20 cm^{-1} , pero las frecuencias de vibración más útiles de la mayoría de las moléculas corresponde al espectro de IR medio (entre 4000 y 400 cm^{-1}). Los rangos de largo y cerca-IR no se emplean por lo general como únicos armónicos (vibraciones secundarias) y las vibraciones de combinación están registrados en esas regiones, siendo difícil de estudiar e interpretar desde un punto de vista analítico. Dentro del espectro de IR medio, cinco ventanas espectrales son comúnmente utilizados debido a sus propiedades: 1) la ventana entre 3000 y 2800 cm^{-1} (W1), influenciada por grupos funcionales de ácidos grasos de la membrana y por algunos aminoácidos vibraciones de la cadena lateral, ya que aquí dominan las vibraciones de estiramiento de C-H de los grupos funcionales $-\text{CH}_3$ y $>\text{CH}_2$; 2) la ventana entre 1800 y 1500 cm^{-1} (w2), afectada por la amida I y amida II grupos pertenecientes a las proteínas y

péptidos. Estos producen picos muy intensos y proporcionan información global sobre la estructura de proteínas. Las bandas de cerca de 1740 cm^{-1} se deben a NC-O vibraciones de estiramiento de los grupos funcionales éster en los lípidos. También las absorciones de ácidos nucleicos se producen en este rango debido a vibraciones de estiramiento de $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}$ y $>\text{C}=\text{C}<$ de estructuras de base heterocíclica del ADN o ARN; 3) la ventana entre 1500 y 1200 cm^{-1} (w3), región mixta influenciado por proteínas, ácidos grasos y compuestos debido a los modos de flexión $>\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ fosfato de realización; 4) la ventana entre 1200 y 900 cm^{-1} (w4), debido a la vibración de estiramiento simétrico de grupos que se encuentran en los ácidos nucleicos y a vibraciones de estiramiento C-O-C y C-O-P estiramiento, que revela la aparición de hidratos de carbono y polisacáridos en la pared celular, sino también la influencia de ácidos nucleicos; 5) Por último, la ventana entre 900 y 700 cm^{-1} (w5), que se llama la verdadera región de huellas dactilares y tiene débiles patrones muy específicos, espectros de vibraciones de anillos aromáticos de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina) y nucleótidos (Tabla 2.2).

La espectroscopia infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR) es una técnica ampliamente utilizada en la biofísica y la bioquímica, la cual proporciona información estructural de las moléculas biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. En la última década, FTIR se ha aplicado también a la identificación y diferenciación de microorganismos. Desde que Naumann y col., (1991) publicaron su trabajo pionero en este campo, diversos grupos de investigación de todo el mundo han demostrado la validez de las

Tabla 2.2. Asignación tentativa de algunas bandas encontradas frecuentemente en espectros de IR. Adaptado de Naumann (2000).

Frecuencia (cm^{-1})	Asignación
2959–2852	CH, CH ₂ , CH ₃ de ácidos grasos
1655–1637	Bandas Amide I, de estructuras α -helicoidales y estructuras de hoja plegada β
1548	Banda Amida
1515	Tirosina
1468	C-H deformación de >CH ₂
1310–1240	Banda amida III componente de las proteínas
1250–1220, 1084–1088	P=O estiramiento de fosfodiesteres
1200–900	C-O-C, C-O vibraciones del anillo de carbohidratos
720	C-H balanceo de >CH ₂
900–700	Región “huella dactilar”

técnicas espectroscópicas FTIR (más allá de las dudas razonables) en la identificación de estructuras celulares. Los resultados obtenidos han demostrado consistentemente que la información espectral es suficiente para distinguir entre diversos microorganismos tanto a nivel de especie como de cepa.

Aunque en general se acepta que los espectros IR de los materiales biológicos proporcionan información característica de la composición química y la estructural, debido a la superposición de absorbancia debido a la multitud de compuestos celulares, las bandas observadas en el rango infrarrojo medio no están muy resueltas y por lo tanto es muy difícil tener una comprensión global de las biomoléculas a partir de la información espectral. Una estrategia común es el uso de técnicas de análisis multivariante para el análisis de datos como el análisis factorial, análisis de conglomerados, o análisis de redes neuronales artificiales para estudiar el patrón general oculto en los datos del espectro microbiano para diferenciar, identificar y clasificar a los microorganismos sin información previa (Lasch y Naumann, 1998).

3. Objetivo general:

Evaluar la resistencia de células de *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* en estado VNC a diferentes factores ambientales.

3.1. Objetivos específicos:

1. Diseñar un protocolo que permita evaluar la resistencia térmica de las células en estado VNC mediante DSC.
2. Inducir el estado VNC a células de *V. cholerae* O1, *S. Typhimurium* y *E. coli* por medio de escasez de nutrientes y baja temperatura y determinar la resistencia térmica de las células durante el desarrollo al estado VNC.
3. Evaluar la resistencia de células en estado VNC al efecto de la temperatura e hipoclorito de sodio.
4. Determinar los cambios estructurales de células en estado VNC mediante espectroscopia de infrarrojo (IRS), y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

4. Metodología

4.1. Material biológico

4.1.1. Agua artificial de mar

Se trabajó con agua artificial de mar (AAM). El AAM se preparó a partir de las sales comerciales (Sigma-Aldrich, México) a una concentración de 3.7%. Se prepararon 5 litros de AAM por cada microorganismos, se esterilizo y se almacenó en refrigeración (1-3°C) hasta su uso.

4.1.2. Cepas.

Se trabajó con 3 cepas: 1. *Vibrio cholerae* O1 aisladas de alimentos, 2. *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14020) y 3. *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.1.3. Preparación de microcosmos

Cultivos de las 4 tipos de bacterias con 18 h de desarrollo en caldo soya tripticaseina (CST), fueron centrifugados a 3500 rpm/20 min y el sobrenadante se eliminó; el paquete celular fue resuspendido por adición de solución salina isotónica estéril (SSI; 0.85 % de NaCl) y agitación en vortex por 60 s, comúnmente en microbiología a todo este procedimiento se le conoce como “lavado del cultivo”. Se realizaron dos lavados más de los cultivos y en el lavado final se empleó AAM para resuspender el “paquete celular”. Se realizaron dos lavados más de los cultivos y en el lavado final se empleó AAM estéril para resuspender el paquete celular a una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL. A partir de los cultivos lavados, se prepararon suspensiones del patógeno en AAM estéril (1000

mL) a una concentración final de 1×10^8 UFC / mL (microcosmos). Los microcosmos se prepararon por triplicado para cada microorganismo en estudio.

4.2. Técnicas analíticas

4.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se empleó un Calorímetro 822e/400 (Mettler-Toledo®), el cuál fue calibrado con Indio, a la velocidad de calentamiento de trabajo que a cada experimento le correspondía, se utilizaron crisoles o portamuestras de aluminio de 40µl. Las corridas resultantes fueron analizadas en el software del equipo Star-e (Mettler-Toledo®) de análisis de evaluaciones. A partir de los cultivos bacterianos y de microcosmos en estudio se realizó la toma de muestra la cual se describe brevemente a continuación. Para la estandarización de la técnica se tomaron alícuotas de 35 mL a los cuales se les realizó el lavado del cultivo para obtener el paquete celular. Una vez obtenido el paquete celular fue pesado y colocado en los crisoles. Mientras que para determinar la actividad y el crecimiento bacteriano las muestras fueron tomadas directamente del caldo de cultivo lavado y vueltas a suspender en CST y colocados en los crisoles los cuales en ambos casos fueron sellados herméticamente para su análisis térmico.

4.2.2. Recuento en placa

Para el recuento en placa, se utilizó la técnica de vertido en placa empleando agar de soya tripticaseína (AST) e incubando a 35°C / 48-72 h. La población en total se consideró como no cultivable cuando el número de UFC por 10 mL de microcosmo fue < 1 UFC.

4.2.3. Cuenta directa de viables (CDV)

La técnica microscópica para la determinación de viabilidad empleada fue la cuenta directa viable (CDV) (Kogure y col., 1979a). Brevemente, por separado se tomaron alícuotas de 1 mL de cada uno de los microcosmos y fueron depositadas en tubos de ensaye estériles; a cada tubo se adicionó ácido nalidíxico y extracto de levadura estériles a una concentración final de 0.002 y 0.25 %, respectivamente, y se incubó a 22 °C / 12 h. Posteriormente, se agregó naranja de acridina estéril (Sigma-Aldrich, México) al 0.1 %, se incubó en la obscuridad a 22 °C / 5 min. 10 µL de cada una de las suspensiones fueron colocados por triplicado en porta objetos desengrasados y se fijaron con metanol frío. Se seleccionaron los frotis que presentaron una circunferencia bien definida. Bajo el microscopio estereoscópico y con ayuda de un vernier, se midió el diámetro de los frotis seleccionados y se calculó su área. Los frotis y se observaron con microscopia de inmersión y en un microscopio de epifluorescencia (modelo BH-2; Olympus, Co., Japón) con filtros de 450-490 nm. El ácido nalidíxico empleado en esta técnica es un inhibidor de la síntesis del ADN, pero no de la síntesis de RNA. Por lo tanto, durante la incubación las células no se dividen pero sí incrementan de tamaño 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 ultra violeta y en el segundo los complejos fluorescentes de naranja. En las células vivas debido a la abundancia de ARN se observaron células con fluorescencia naranja o roja, en tanto que en las células inactivas (pobres en ARN) la fluorescencia fue verdosa. En nuestro caso, las

células con fluorescencia naranja o roja y que duplicaron su tamaño, fueron consideradas como viables. Se observaron al menos 50 campos al azar y se registró el promedio.

Para estimar el número de células viables por mL, se utilizó la siguiente fórmula:

$$Cve = \frac{AF}{AO} (P) (100) (5)$$

Cve = células viables por mL

AF = área del frotis

AO = área del objetivo ocular

P = promedio de células viables por campo del microscopio

100 = factor de dilución

Todos los estudios con los microcosmos fueron efectuados por triplicado.

4.2.4. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Para la espectroscopia de infrarrojo se utilizó un espectrómetro PERKIN-ELMER FT-IR system Spectrum GX en transmitancia a una longitud de onda entre 4000 y 600 cm^{-1} y se realizaron 16 barridos. La muestra fue obtenida de la siguiente manera: a partir de los microcosmos se tomaron alícuotas de 35 mL a los cuales se les realizó el lavado del cultivo para obtener el paquete celular. Posteriormente el paquete celular fue secado por liofilización con una liofilizadora marca Freeze Dry Systema Freezone 4.5, una vez seca la muestra se mezcló con KBr en una relación 4:1 y prensada para obtener una pastilla la cual fue colocada en el equipo para obtener los espectros respectivos. Cada muestra fue analizada por duplicado.

4.3. Experimentos

4.3.1. Estandarización de la técnica de DSC para evaluar la resistencia térmica de las células bacterianas.

Se examinaron diferentes procedimientos para determinar las mejores condiciones en la determinación de la resistencia térmica de las distintas bacterias en los que se examinaron variaciones de los siguientes factores: forma de concentrar las células a examinar (centrifugación, filtración por membrana, etc.), células lavadas y no lavadas, tipo de solución de lavado [(buffer de fosfato, Solución Salina Isotónica (SSI), diluyente de peptona, etc.)], peso de la muestra (4-15mg), velocidad (1, 5 y 10°C/min) y tiempo de calentamiento (10 min - 12 hrs) en el calorímetro. La estandarización de esta técnica se hizo empleando solo *E. coli*. Esto es debido a que por muchos años se ha empleado a esta bacteria como modelo para estudiar y conocer los diferentes fenómenos o procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en las células; por esta razón, en nuestro estudio se usó como modelo para realizar la estandarización.

De estos estudios se seleccionó el procedimiento que proporcionó las mejores respuestas (o más definidas) para su uso en los estudios con las células en estado VNC.

4.3.2. Medición de actividad metabólica y crecimiento bacteriano por DSC

Para detectar el crecimiento bacteriano y por lo tanto actividad metabólica se utilizaron cultivos de *E. coli* de 18 h / 35 °C en CST los cuales fueron lavados dos

veces con solución salina isotónica (0.85 %) mediante centrifugación a 1507g por 20 min en cada ocasión y después resuspendidos en CST a pH 7.0. El cultivo final lavado se resuspendió en CST a una concentración final de 1×10^9 UFC/mL. Se realizaron diluciones decimales en CST a pH 7 para obtener concentraciones de 4×10^7 , 4000, 40 o 4 UFC por cada 40 μ L. tomaron 40 μ L de cada suspensiones bacterianas de *E. coli* (4×10^7 , 4000, 40 o 4 UFC) y se colocaron en crisoles de aluminio de 40 μ L previamente esterilizados. Los crisoles se sellaron herméticamente y se colocaron en el calorímetro. Se empleó CST estéril no inoculado para verificar la línea base del equipo. El equipo se programó para mantener la temperatura a 35°C/14 h.

Se analizaron los termogramas resultantes para obtener tres valores: tiempo de inicio de detección de la señal de generación de calor (inicio), tiempo en el que se alcanza la generación máxima de calor (pico) y tiempo de la señal final de detección de calor (final), así como el calor total generado determinado por el área bajo la curva (Toro-Vázquez et al., 2003). Los tiempos del inicio, pico y final para las diferentes transiciones se determinaron utilizando la primera derivada de la capacidad calorífica de la muestra calculada con la biblioteca de software DSC. Por lo tanto, el tiempo de inicio y el final se establecieron como los tiempos en los que la primera derivada de la capacidad calorífica de la muestra se aleja y regresa a la línea de base, respectivamente. En contraste, el pico se estableció como el tiempo a la que la primera derivada de la capacidad calorífica de la muestra cruzó la línea base (es decir, el punto de la curva de transición de inflexión). La entalpía (calor total generado) se calculó mediante la integración del pico exotérmico

correspondiente. La integración se realizó entre los tiempos de inicio y el final del pico con el software del calorímetro (Toro-Vázquez et al., 2003). Se realizaron tres repeticiones por experimento.

4.3.3. Inducción al estado VNC de células bacterianas por medio de escasez de nutrientes y baja temperatura.

Una vez preparados los microcosmos se procedió a iniciar el proceso de inducción al estado VNC a temperatura de refrigeración (3-5°C). Dicha temperatura se ha utilizado en la mayoría de los estudios de inducción al estado VNC con diferentes microorganismos (Huq y Colwell, 1996). A partir de los microcosmos de cada una de las bacterias se efectuaron, periódicamente, recuentos en placas con agar soya tripticaseína (AST) para determinar la capacidad del patógeno para desarrollar en medio de cultivo, así mismo se realizó la determinación de viabilidad celular mediante la técnica de cuenta directa viable (CDV) (Kogure, 1979a) la cual se describe en el siguiente apartado así mismo se determinó la resistencia térmica mediante DSC del microorganismo conforme se produjo la inducción al estado VNC de la población de estudio.

4.3.4. Evaluación de la resistencia de células en estado VNC a la alta temperatura y desinfectantes químicos.

En estos estudios se trabajó con células tanto en estado VNC que fueron inducidas a tal estado en AAM y a 5°C como con células viables de *Salmonella* y *V. cholerae*. Cuando toda la población de células de los microcosmos estuvo en estado VNC (< 1 UFC/ 10 mL y al menos el 80% de células viables con respecto al

número inicial), la población de los microcosmos se sometió al efecto de desinfectantes químicos.

a. Efecto de la temperatura.

Se lavaron 100 mL de los microcosmos fueron lavados con SSI a 3500 rpm/30min y las células lavadas fueron resuspendidas en SSI a una concentración final de aproximadamente 1×10^8 células/mL. Los 100 mL de las células lavadas fueron sometidos a un tratamiento térmico en el DSC en régimen isotérmico a temperaturas de 55°C, 65°C, 70°C y 75°C por espacio de 10 minutos y posteriormente se evaluó la resistencia térmica realizando un escaneo de las células desde 4°C-110° a una velocidad de 5°C/min, para observar si el tratamiento afecto la resistencia térmica de las células por DSC.

b. Efecto del hipoclorito de sodio

Se prepararán suspensiones lavadas de los microcosmos de la misma forma como se describió en el apartado anterior. A estas suspensiones se les adicionaron soluciones de hipoclorito de sodio para tener una concentración final en los microcosmos de 5, y 10 mg / L y se almacenaron los tubos a temperatura ambiente por 5 y 10 min. Adicionalmente, se determinó la resistencia térmica de las suspensiones mediante la técnica de DSC.

Para todos los estudios, se incluyeron como controles células cultivables de cada *patógeno* suspendidas en SSI que se sometieron a los mismos tratamientos.

4.3.5. Determinación de los cambios estructurales de células en estado VNC mediante espectroscopia de infrarrojo (IRS).

Se estudió la estructura de las células bacterianas tanto en estado viable cultivable como el VNC esto con la finalidad de observar los cambios que presentaron las células bacterianas a ser inducidas al estado VNC. De esta manera una vez obtenidas las células viables y las VNC se procedió a analizar la estructura de las mismas por espectroscopia de infrarrojo (IRS). Se realizó la obtención de los espectros de IR de las distintas células bacterianas tanto en estado viable como en VNC únicamente para *Salmonella* y *V. cholerae* ya que estas cepas presentaron comportamientos opuestos durante la inducción al estado VNC observado en DSC.

4.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron calculadas con un análisis de varianza (ANOVA) y con la prueba de Duncan (Statistica 8, StatSoft, Inc., 2007). Se determinó el coeficiente de correlación simple (r) entre la concentración de inóculo inicial y la producción total de calor por el crecimiento de *E. coli* en CST (Statistica 8, StatSoft, Inc., 2007). Se analizaron tres repeticiones para cada concentración y tipo de bacteria.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de la técnica de DSC.

Antes de comenzar con los estudios con el DSC fue necesario realizar la estandarización de la técnica de DSC debido a que no existían antecedentes sobre su uso para realizar las evaluaciones deseadas. La estandarización se realizó con la finalidad de optimizar las condiciones que mejor se ajustaran para estudiar a la célula bacteriana con el DSC; para ello se tomaron como referencia los estudios previamente publicado por otros investigadores (Verrips y Kwast, 1977; Van Alphen y col., 1979; Marison y Von Stockar, 1985; Miles y col., 1986; Mackey y col., 1988; 1991; Anderson y col., 1991; Belliveau y col., 1992; Bayles y col., 2000; Lee y Kalenctuc, 2002a; 2002b; Kalenctuc y col., 2004; Nguyen y col., 2006; Tunick y col., 2006; Lee y Kalenctuc, 2010).

Un primer punto era conocer la velocidad de calentamiento más adecuada a la que debían ser calentadas las células de *E. coli* (contenidas en el crisol de aluminio del equipo) para poder obtener termogramas definidos que permitieran detectar los cambios estructurales de las células revelados por el comportamiento térmico (endo o exo) de las células por efecto de los diferentes tratamientos. En la figura 5.1 se muestran los termogramas obtenidos a las velocidades de 1 °C/min, 5 °C/min y 10 °C/min, en la figura 5.1 se observa como conforme se incrementa la velocidad de calentamiento se tiene una mejor definición de los distintos picos, ya que mientras a 10 °C/min son evidentes la mayoría de los picos (5 picos) a 1 °C/min el ruido enmascara los picos más pequeños (esto debido a que la señal

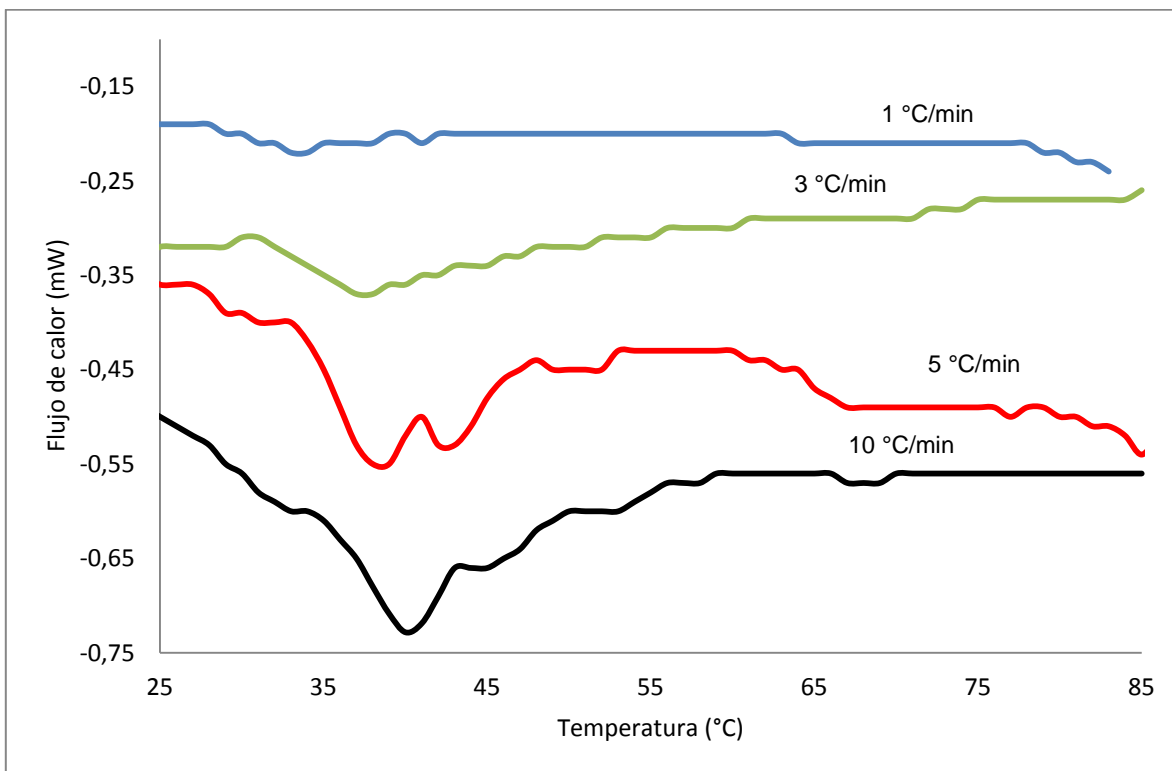


Figura 5.1. Termogramas de *E. coli* bajo distintas condiciones de velocidad de calentamiento.

térmica es muy pequeña); en este sentido, aunque se incrementa la sensibilidad para la detección de las señales térmicas de la muestra también se incrementa la detección de cualquier otro ruido que puede interferir con el análisis, por lo tanto esta no fue una velocidad de calentamiento adecuada y se decidió utilizar la velocidad intermedia de calentamiento, ya que observa una mejor resolución de los transiciones térmicas.

De los termogramas se obtuvieron los valores específicos de entalpia (ΔH), temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p) y temperatura final (T_f) de la tabla (5.1) determinados por la integración del primer pico, el cual fue utilizado para observar las diferencias principales entre cada tratamiento.

Tabla 5.1. Valores de ΔH , T_o , T_p y T_c del primer pico obtenidos a cada una de las distintas velocidades de calentamiento. N=3.

Velocidad	ΔH (J/g)	T_o ($^{\circ}C$)	T_p ($^{\circ}C$)	T_c ($^{\circ}C$)
10 $^{\circ}C$ /min	*0.18 \pm 0.03 ^a	55.17 \pm 0.42 ^a	58.82 \pm 0.24 ^a	61.52 \pm 0.23 ^a
5 $^{\circ}C$ /min	0.32 \pm 0.09 ^b	53.74 \pm 0.36 ^b	55.86 \pm 0.50 ^b	58.07 \pm 0.44 ^b
3 $^{\circ}C$ /min	0.31 \pm 0.13 ^b	52.85 \pm 0.52 ^b	54.39 \pm 0.27 ^b	56.23 \pm 0.48 ^b
1 $^{\circ}C$ /min	N/D	N/D	N/D	N/D

* Media \pm SD de tres repeticiones. ¹Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Los datos de la tabla también permiten evaluar el efecto que tiene la velocidad de calentamiento sobre la señal de los picos, se aprecia que para velocidades por debajo de 5 $^{\circ}C$ /min se obtuvieron valores de T_p muy similares que no presentaron diferencia estadísticamente significativas con la velocidad de calentamiento más

baja, sin embargo para la velocidad de 10 °C/min sí se observó diferencia significativa; es posible que en este tratamiento debido a que la velocidad es tan rápida no exista el tiempo necesario para que el calor se difunda adecuadamente en la muestra, por lo que las temperaturas del inicio y sobre todo la del pico de la transición están más alejadas y se necesite más temperatura para que las transiciones ocurran o se aprecien; por tanto, los datos sugieren que no es una velocidad adecuada de calentamiento. Cabe mencionar que no se registraron los valores para la velocidad de calentamiento de 1°C/min ya que este pico al ser muy pequeño no se observa. Por lo cual se observó que la velocidad de 5°C/min fue la más adecuada ya que proporciono una mejor definición de los picos.

Se observó también el efecto del peso de la muestra sobre la entalpia (Figura 5.2); observandose que existe una relación directa entre ellos ya que a mayor cantidad de muestra se observa un incremento en la entalpia, lo cual se puede apreciar bien en el pico. Sin embargo, conforme el peso se acercó a 10 mg de muestra la tendencia parece ser asintótica por lo cual un peso de 10 mg mostró ser el adecuado para realizar el muestreo.

De esta manera se observó que las condiciones más adecuadas para definir los picos fue la velocidad de 5°C/min adicionalmente se observó que el tiempo de decantación no tuvo efecto, mientras que se observó que el tamaño mínimo de muestra con la cual se obtuvo una mejor proporción de los picos fue de 10 mg.

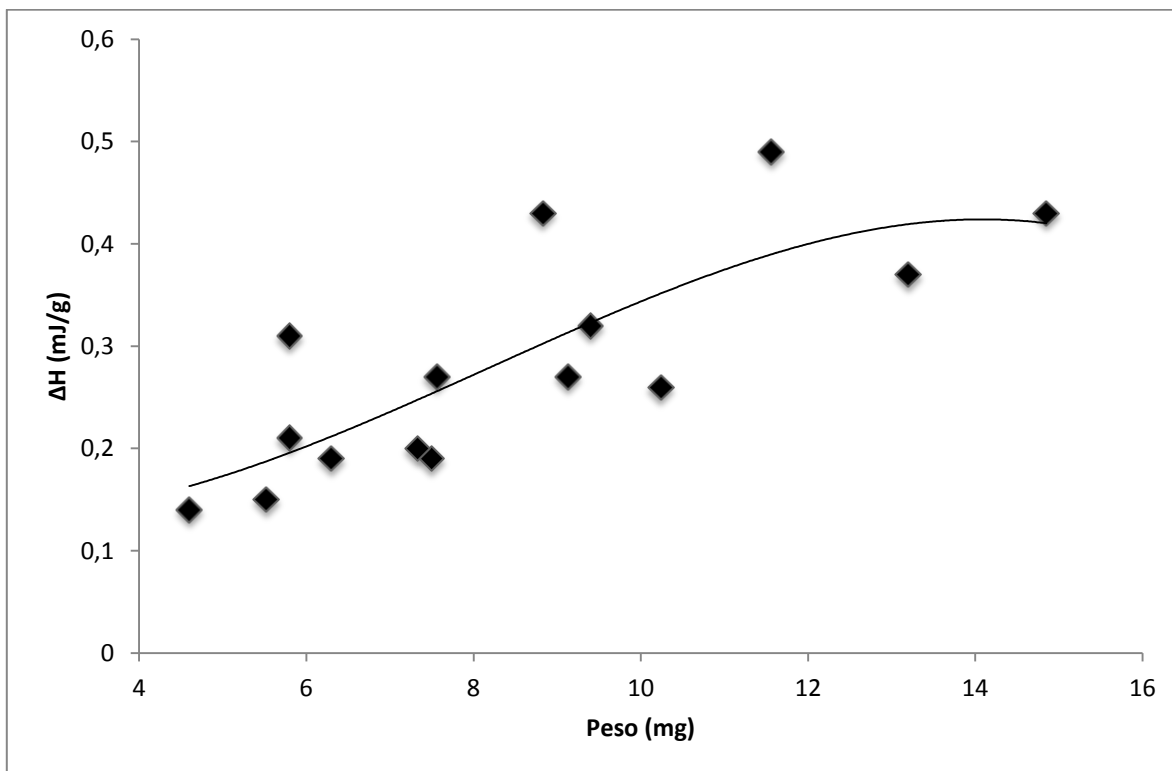


Figura 5.2. Relación de incremento del peso con la entalpia del primer pico de las transiciones térmicas de *E. coli*.

5.2. Medición de la actividad metabólica y crecimiento bacteriano por DSC.

Otro tipo de estudios que se realizaron previo al estudio del estado VNC de los microorganismos con calorimetría, fue determinar si con el calorímetro era posible detectar actividad metabólica de las células. Para este tipo de estudios se trabajó nuevamente sólo con *E. coli*. En estos estudios se trabajó con 4 niveles de inoculo inicial; con caldo soya tripticaseína, a una sola temperatura de incubación y paralelamente se monitoreo el comportamiento de *E. coli* en caldo de cultivo mediante DSC y con la cuenta en placa.

Se encontró que sí es factible monitorear actividad metabólica de *E. coli* con DCS (Figura 5.3). Se obtuvo respuesta del desarrollo de *E. coli* en el caldo de cultivo respecto al tiempo de incubación el cual fue detectado por el calorímetro, y esta actividad se expresó en los termogramas en los que se registraron picos exotérmicos (Figura 5.3). Los termogramas ilustran el crecimiento de *E. coli* mediante la generación de una curva con tres puntos principales: inicio del pico, máximo del pico y de detección de la señal final del pico (Figura 5.3). En los termogramas, el inicio de la señal está relacionado con la generación de calor, el cual puede estar asociado con la actividad microbiana. Las muestras con diferentes concentraciones de células iniciales produjeron diferentes respuestas; con la concentración más alta, la detección de la generación de calor fue mucho más rápida (Figura 5.3). Cabe señalar que en los crisoles de aluminio sellados en donde se monitoreó el crecimiento de *E. coli* por DSC la concentración o cantidad

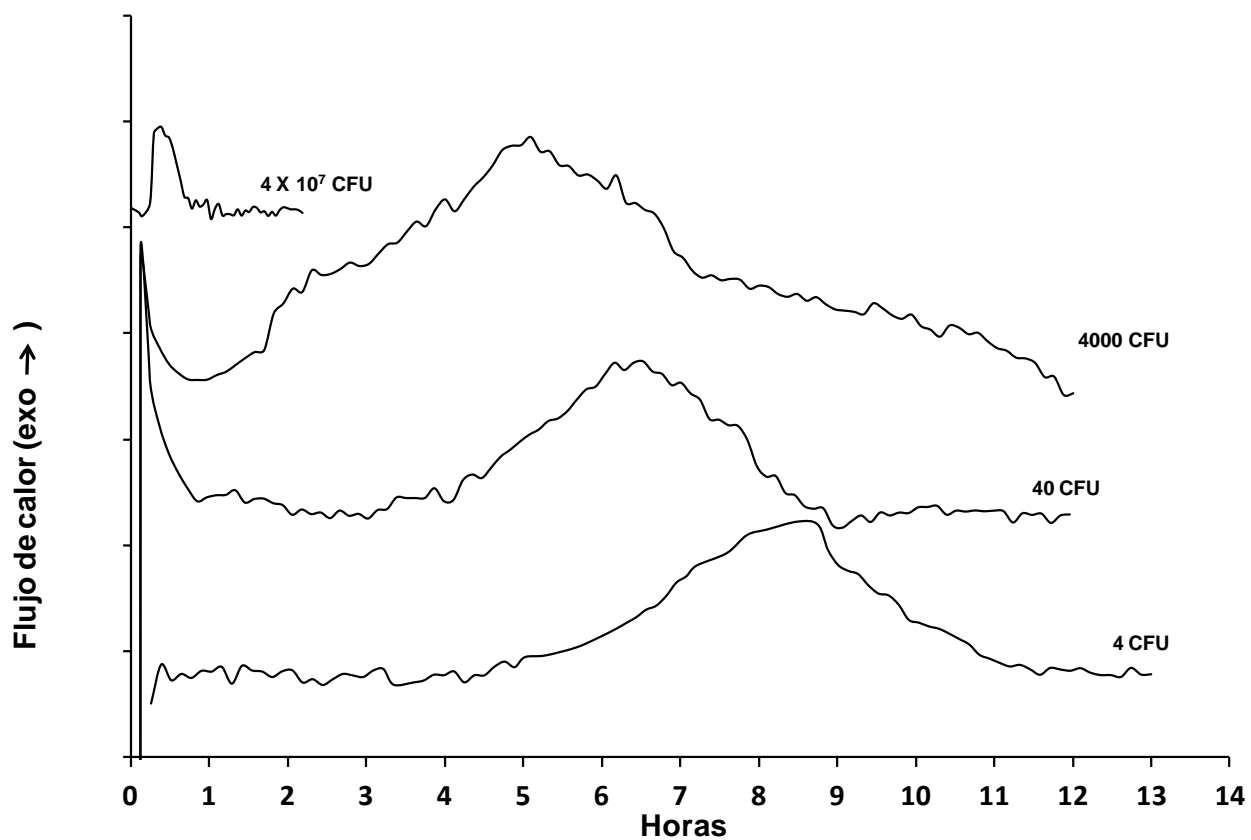


Figura 5.3. Termogramas de DSC de la actividad metabólica de *E. coli* para cuatro concentraciones diferentes de inóculo inicial en CST a 35 °C y pH 7.

de oxígeno es más baja comparado con el desarrollo en un medio de cultivo sólido en caja de cultivo o bien en medios de cultivo líquido en tubos de ensayo o frascos. No obstante, el microorganismo creció adecuadamente en el caldo de cultivo contenido en los crisoles de aluminio a niveles bajos de oxígeno, ello puede deberse al carácter de anaerobio facultativo de éste microorganismo. Bajo estas condiciones, los termogramas de la actividad de *E. coli* mostraron un patrón de crecimiento hiperbólico (Figura 5.3). Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Boe y Lovrien, 1990 sobre el crecimiento *E. coli* el cual fue monitoreado con una bomba calórica durante el crecimiento del microorganismos usando como sustrato glucosa donde también se observó un comportamiento hiperbólico.

El comportamiento hiperbólico también se puede apreciar en los resultados de la tabla 5.2; se observa que para una concentración inicial de 4 UFC, la aparición del pico estuvo en 4.83 ± 0.33 h, mientras que para 40 UFC fue de 3.88 ± 1.19 h, y con 4,000 UFC fue de $2.27 \pm 0,4$ h y para 4×10^7 UFC fue de $0,23 \pm 0.005$ h. Como se mencionó anteriormente, una concentración inicial más alto produce una respuesta térmica más rápida, probablemente debido a una mayor actividad metabólica (Tabla 5.2). Además, el tiempo final se presentó más rápido (0.71 ± 0.02 h) a la concentración inicial más alta (4×10^7), mientras que en el más bajo (4 UFC; 11.55 ± 0.51 h).

No existen reportes anteriores sobre el uso de DSC para realizar la medición del crecimiento de las bacterias para poder comparar los datos obtenidos con el DSC

Tabla 5.2. Tiempo (minutos) de detección del inicio de las señales exotérmicas (inicio del pico), máximo y final del pico y cantidad de calor total generado durante el crecimiento de E. coli a partir de cuatro concentraciones iniciales de inóculo.

Concentración inicial (CFU)	Inicio (min)	Pico (min)	Final (min)	Calor generado (Integral [mJ])
4	*290 ± 20 ^{a1}	522 ± 28 ^a	693 ± 31 ^a	163 ± 13 ^a
40	233 ± 72 ^b	437 ± 26 ^b	581 ± 11 ^b	150 ± 71 ^a
4000	136 ± 24 ^c	297 ± 14 ^c	450 ± 12 ^c	113 ± 29 ^a
4x10 ⁷	14 ± 0.3 ^d	28 ± 6 ^d	43 ± 1 ^d	8 ± 2 ^b

* Media ± SD de tres repeticiones, ¹ Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (p <0.05)

del monitoreo de la actividad metabólica de *E. coli*. Sin embargo, si hay datos obtenidos con microcalorimetría sobre la actividad metabólica de *E. coli*. Aunque una comparación directa entre DCS y microcalorimetría no es posible, es útil disponer de los resultados del estudio anterior con microcalorimetría como referencia.

La calorimetría implica el uso de un sensor térmico para medir directamente el calor emitido o absorbido por un material. La microcalorimetría y la DSC se basan en la respuesta térmica del material y se han utilizado para estudiar algunos aspectos de los microorganismos. Ellos se distinguen generalmente por el tamaño de muestra a analizar y el equipo (calorímetro) de medición (von Stockar y Marison, 1989). La microcalorimetría se ha utilizado para medir el metabolismo bacteriano (Braissant y col, 2010a; 2010b) mientras que la técnica de DSC se ha utilizado para medir la muerte térmica microbiana (Lee y Kaletunç, 2002; Honglin y col., 1993). Con la microcalorimetría se pueden medir los cambios en el calor liberadas y/o absorbidos durante el crecimiento bacteriano (Boe y Lovrien , 1990; Braissant y col, 2010a; 2010b; Von y col, 2009), y ha sido utilizada para monitorear el crecimiento de *E. coli* en caldo de cultivo bajo diferentes condiciones de cultivo. La degradación de los azúcares, que contiene un medio de cultivo, durante el crecimiento de *E. coli* genera calor que puede ser medida por el sensor de un microcalorímetro, produciendo termogramas con picos exotérmicos (Belaich y Belaich, 1976a; 1976b; Dermoun y Belaich, 1979; 1980; Braissant y col., 2010a; 2010b). No obstante, una clara desventaja de la microcalorimetría es que se requieren grandes volúmenes de muestra para los estudios. Además

generalmente se requieren niveles elevados de células iniciales (10^5 - 10^6 células) para que las mediciones sean reproducibles (Braissant y col., 2010a). Por otro lado, en la mayoría de los casos, con la microcalorimetría se requiere un tiempo de equilibrio inicial de 1 h, durante la cual los datos no pueden ser registrados (Braissant y col., 2010a).

A diferencia de la microcalorimetría, la técnica de DSC ofrece un método más sensible para el estudio del metabolismo celular en las células vivas. En un calorímetro se requieren volúmenes bajos de muestra (microlitros); la muestra está contenida en un crisol o charola de aluminio, y paralelamente se corre una muestra de referencia adecuada (en otro crisol); ambos crisoles son calentados simultáneamente en cámaras separadas a una velocidad constante. Un sistema de retroalimentación mantiene una diferencia de temperatura esencialmente de cero entre las cámaras y proporciona la diferencia de calor entre una cámara y otra. El DSC requiere sólo de segundos para equilibrar la temperatura de ambos crisoles.

Aunque claramente existen diferencia entre el DCS y un microcalorímetro, como se mencionó, al carecer de información respecto al monitoreo del metabolismo de los microorganismos con DSC y asumiendo las restricciones pertinentes, emplearemos la información publicada con microcalorimetría para comparar nuestros datos obtenidos con el DSC.

Nuestros resultados son semejantes a los resultados obtenidos con microcalorimetría sobre el desarrollo de *Lactococcus lactis* en caldo de cultivo

donde se observó que las señales de inicio de la actividad metabólica (inicio del pico) como las del final, ocurrieron más rápidamente cuando se emplearon concentraciones iniciales más altas del microorganismo (Kobanova y col., 2012). También, nuestros resultados están de acuerdo con los estudios realizados por Maskow y col. (2012), quienes observaron que la generación de calor depende de la concentración inicial del inóculo.

Por otro lado, se ha encontrado que en un microcalorímetro, el calor liberado por los cultivos microbianos durante su crecimiento se correlaciona cuantitativamente con la generación de biomasa y con el consumo de sustratos o de oxígeno (Birou y col., 1987). Los eventos metabólicos, tales como cambios de un sustrato a otro, agotamiento de nutrientes y/o inhibiciones en el metabolismo causarían cambios característicos en las curvas de generación de calor (Braissant y col., 2010b; Von Stockar y van der Wieler, 1997; Yi y col., 2000). Es posible que durante el crecimiento de *E. coli* en los crisoles sellados de aluminio del DSC ocurran cambios en la concentración de oxígeno y estos afecten el comportamiento del microorganismo, la generación de biomasa y el calor liberado. Sin embargo, en el presente estudio no se evaluó el efecto de los cambios en la concentración de oxígeno en el comportamiento de *E. coli*.

También se observó que la concentración inicial de *E. coli* afectó significativamente ($p < 0.05$) la detección de las señales exotérmicas de inicio y final del pico generado por la actividad metabólica de *E. coli*. (Figura 5.3). Sin embargo, a excepción de la concentración inicial de 4×10^7 UFC, no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en el calor total detectado con los inóculos iniciales de 4, 40 y 4000 UFC

iniciales (Tabla 5.2). Esto coincide con un reporte de Kobanova y col. (2012), quienes también no observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el calor total detectado por microcalorimetría entre concentraciones iniciales de *L. lactis* que fueron desde 10^2 a 10^4 UFC. Sin embargo, los valores totales de calor después del desarrollo fueron significativamente menores ($p < 0.05$) tanto a muy bajas concentraciones iniciales de células (10^0 - 10^1 UFC) como a concentraciones muy alta (10^5 - 10^6 UFC) en comparación con aquellos registrados con inóculos iniciales de entre 10^2 - 10^4 UFC (Kobanova y col., 2012).

En nuestro caso, el calor total detectado a la concentración de 4×10^7 UFC, frente a las otras concentraciones iniciales, sugieren que la multiplicación celular fue mínima en el CST contenido en los crisoles durante la incubación a 35°C , y que la liberación rápida de calor que se observó bajo estas condiciones (0.23 h) está probablemente relacionado con una alta actividad enzimática, por ejemplo, debido a la degradación de azúcar, en lugar de la multiplicación celular. De hecho, se sabe que durante la fase Lag del desarrollo microbiano ocurren una serie de reacciones bioquímicas las cuales pueden conducir a la generación de calor (Zhang y col., 1993). Por lo que es probable que la concentración inicial muy alta de *E. coli* (4×10^7) generó desde los primeros minutos una elevada cantidad de calor que fue detectada por el calorímetro. Esta hipótesis se sustenta en un estudio realizado con una bomba calorimétrica en el que se analizó la producción de calor por una población de *E. coli* cultivada en caldo de cultivo a 25°C y en la que el inóculo inicial del microorganismos fue muy elevado (Boe y Lovrien, 1990).

Los autores afirman que el rendimiento calórico es una medida de la actividad metabólica, la que a su vez depende de número inicial de células.

Para estimar el incremento en la concentración de células de *E. coli* en el CST contenido en los crisoles de aluminio durante los estudios en el calorímetro (Figura 5.3), paralelamente se determinó el crecimiento de *E. coli* en CST (por la técnica de conteo en placa) usando las mismas concentraciones iniciales de células de *E. coli* que las usadas en los estudios del calorímetro. En estos estudios se observó que independientemente de la concentración inicial de células de *E. coli* en el caldo de cultivo, después del desarrollo la concentración final que alcanza el microorganismo en el medio no difiere significativamente (Figura 5.4). No obstante, a concentraciones celulares iniciales más altas, la concentración celular máxima de crecimiento microbiano se alcanzó más rápidamente (Figura 5.4). Esto indica que la tasa de crecimiento fue menor a mayor concentración inicial. La concentración del inóculo inicial de 4×10^7 UFC exhibió la tasa de multiplicación más baja, apoyando la hipótesis propuesta anteriormente para explicar el comportamiento térmico de este inóculo. De hecho, la producción de calor en los cultivos bacterianos se vincula directamente a la multiplicación de los microorganismos (Marison y Stockar, 1985).

Para estimar las concentraciones de células de *E. coli* en el inicio del pico, en el pico y al final del pico así como el calor total generado, los valores del número de células (obtenidos por los conteos en el medio de cultivo) se relacionaron con los termogramas sobre la base de la concentración del inóculo inicial (Tabla 5.3). Para

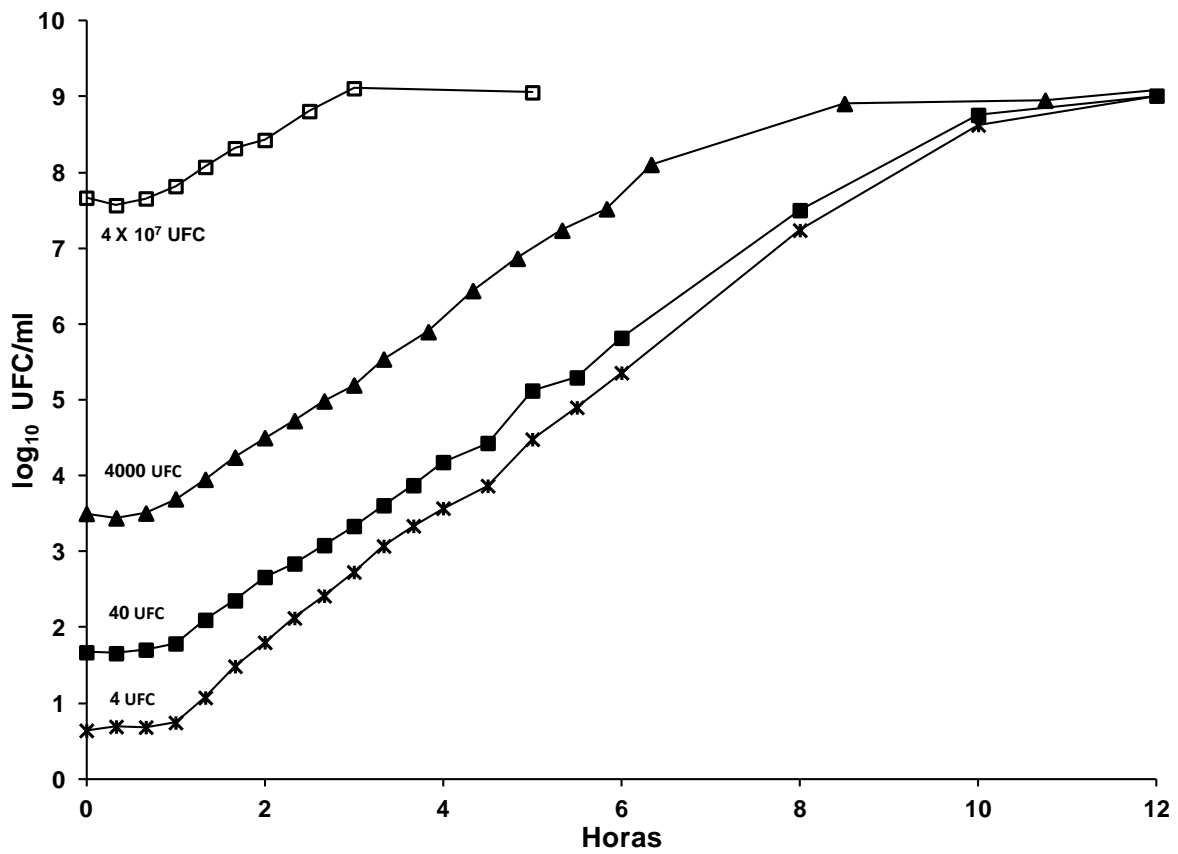


Figura 5.4. Desarrollo de *E. coli* monitoreado mediante cuanta en placa a partir de cuatro concentraciones diferentes de inóculo inicial en CST a 35 °C y pH 7.

Tabla 5.3. Concentración de células alcanzada al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de *E. coli*.

Inoculo inicial (UFC)	Concentración de células detectada (Log ₁₀ UFC)		
	Inicio	Pico	Fin
4	4.3 ¹ ± 0.3 a ²	7.20 ± 0.4 a	8.79 ± 0.2 a
40	3.9 ± 0.5 a	6.86 ± 0.2 ab	8.52 ± 0.5 a
4000	4.7 ± 0.2 ab	6.92 ± 0.6 ab	8.60 ± 0.3 a
4x10 ⁷	7.6 ± 0.07 b	7.6 ± 0.1 ac	7.51 ± 0.4 b

² Letras distintas dentro de las columnas indican diferencia significativa con probabilidad (p ≤ 0.05) con prueba de Duncan.

las concentraciones iniciales de 4, 40 y 4000 UFC, el inicio del pico se detectó cuando *E. coli* habían comenzado a crecer y habían alcanzado una concentración de $4 \log_{10}$ a $4.5 \log_{10}$ UFC, pero esto ocurrió en diferentes momentos según el inoculo inicial. Lo destacable de éstos resultados es que se pudo determinar el límite de detección del desarrollo de *E. coli* por el calorímetro cuando se parte de inoculos iniciales bajos (4-4000 UFC), el cual fue de $4.3 \pm 0.4 \log_{10}$ UFC de *E. coli* (Tabla 5.3). Cabe señalar que el límite de detección del microcalorímetro es superior (entre 5 a $6 \log_{10}$ UFC). Por ejemplo, en un estudio sobre el crecimiento de *L. lactis* en caldo de cultivo monitoreado por microcalorimetría se encontró que el límite de detección de desarrollo fue de 10^5 células (Kobanova y col., 2012).

La técnica de DSC monitoreó eficazmente el crecimiento en *E. coli* a diferentes concentraciones iniciales de inóculo. Por lo que la DSC es una técnica alternativa prometedora para el monitoreo en tiempo real de crecimiento bacteriano y tiene el potencial para registrar diferentes parámetros relacionados con el crecimiento. Finalmente, los datos muestran que la técnica de DSC tiene potencial uso para el estudio del estado VNC de los microorganismos.

5.3. Inducción al estado VNC de las bacterias de estudio por CD y CDV

El criterio más comúnmente utilizado para señalar que una bacteria se encuentra en estado VNC, es que ésta no desarrolle en medios de cultivo simples pero que manifieste viabilidad al aplicar técnicas como la cuenta directa viable (CDV) diseñada por Kogure (1979a). La temperatura y escasez de nutrientes son dos

factores que inducen a los microorganismos a tal fase VNC. Se ha observado que cuando una bacteria no esporulada como *V. cholerae* es suspendida en agua de mar artificial y almacenada en refrigeración, en 30-50 días toda la población entra en estado VNC. Situación semejante puede observarse con otras bacterias (Hug y Colwell, 1996).

En nuestro caso, el tiempo de inducción al estado VNC para células de *V. cholerae* fue de 25 días bajo condiciones de ausencia de nutrientes, refrigeración y suspendidas en agua artificial de mar (AAM) (Figura 5.5). En términos generales se observó que la población del microorganismo comenzó a disminuir desde el primer día de almacenamiento hasta que después de los 25 días ninguna célula de *V. cholerae* creció en los medios de cultivo, no obstante, la cuenta directa viable mostró que todas las células de las suspensiones seguían viables (Figuras 5.6-5.8). Estos resultados concuerdan con lo observado por Hug y Collwel (1996) para *V. cholerae*, ellos observaron un comportamiento semejante del patógeno en agua de mar y un tiempo de entrada al estado VNC semejante al que nosotros registramos. No obstante, se ha reportado que otros patógenos como *V. vulnificus* suspendidos en agua de mar almacenada en refrigeración, pueden entrar al estado VNC en la mitad del tiempo del que nosotros registramos (Oliver, 2005).

Un comportamiento semejante se observó con los otros dos microorganismos de estudio, con diferencias en el tiempo en el que se presentó el estado VNC en la totalidad de la población (Figura 5.9-5.10). Se observó que tanto la población de *S. Typhimurium* como la de *E. coli* tardaron aproximadamente 110 días en ingresar

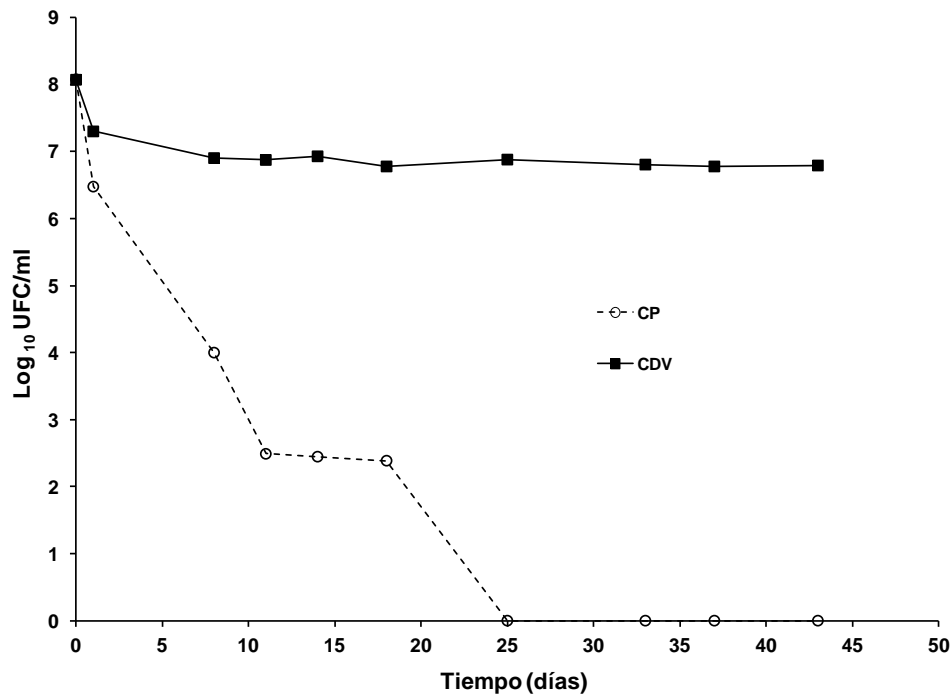


Figura 5.5. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de *V. cholerae* suspendidas en agua estéril de mar a 5 °C durante 45 días.

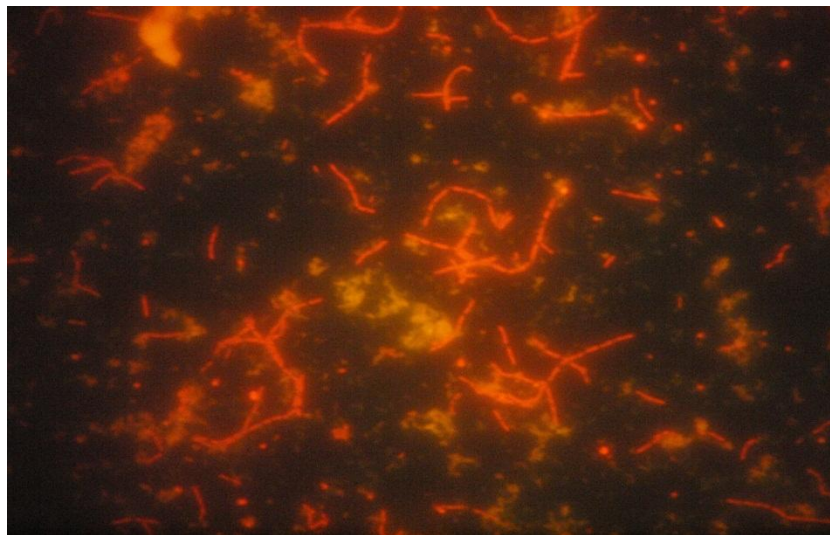


Figura 5.6. Células viables no cultivables de *V. cholerae* (naranjas) tenidas por la técnica de CDV después de 56 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia

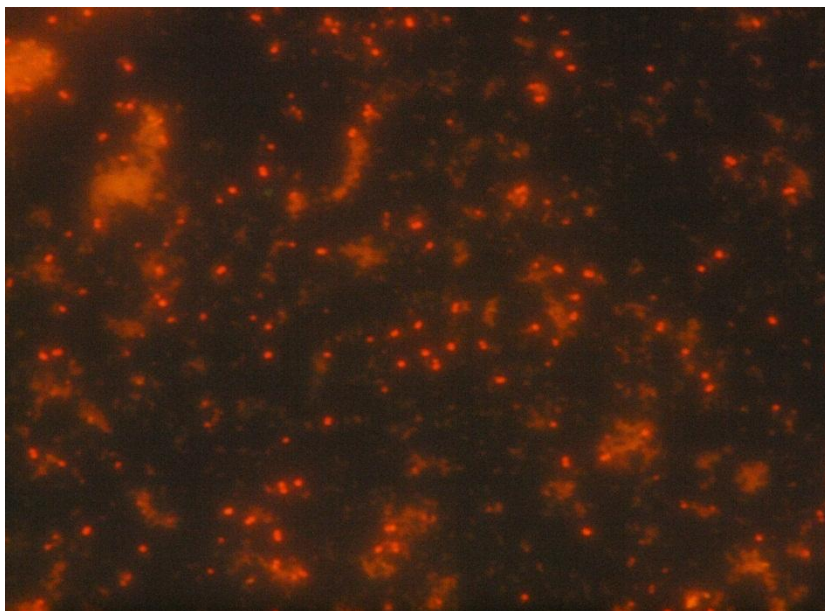


Figura 5.7. Células viables no cultivables de *Salmonella* (naranjas) teñidas por la técnica de CDV después de 110 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia.

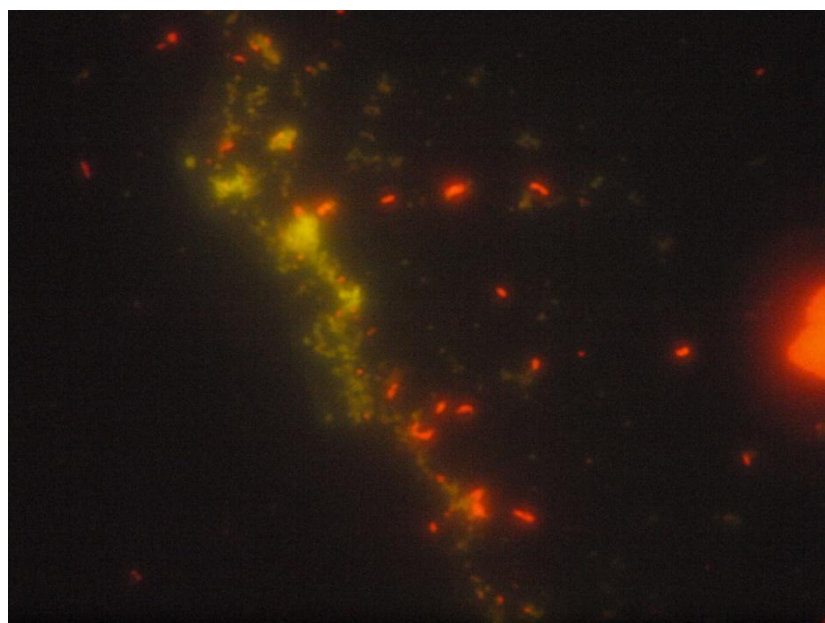


Figura 5.8. Células viables no cultivables de *E. coli* (naranjas) teñidas por la técnica de CDV después de 110 días de estar suspendidas en agua de mar a 3-5°C. Fotografía obtenida mediante microscopia de epifluorescencia

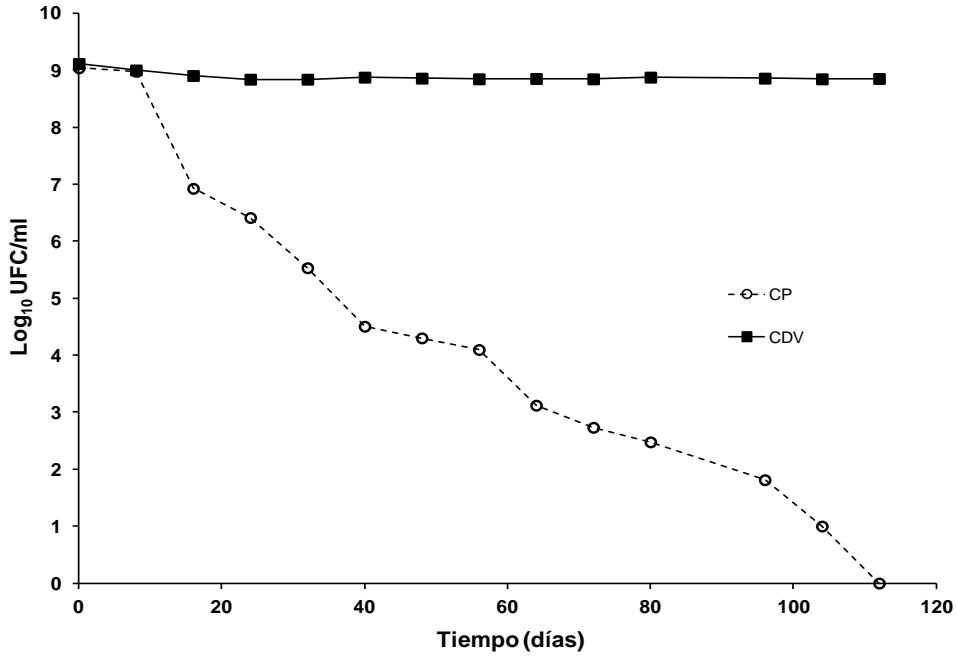


Figura 5.9. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de *Salmonella* en agua estéril de mar a 5°C durante 120 días.

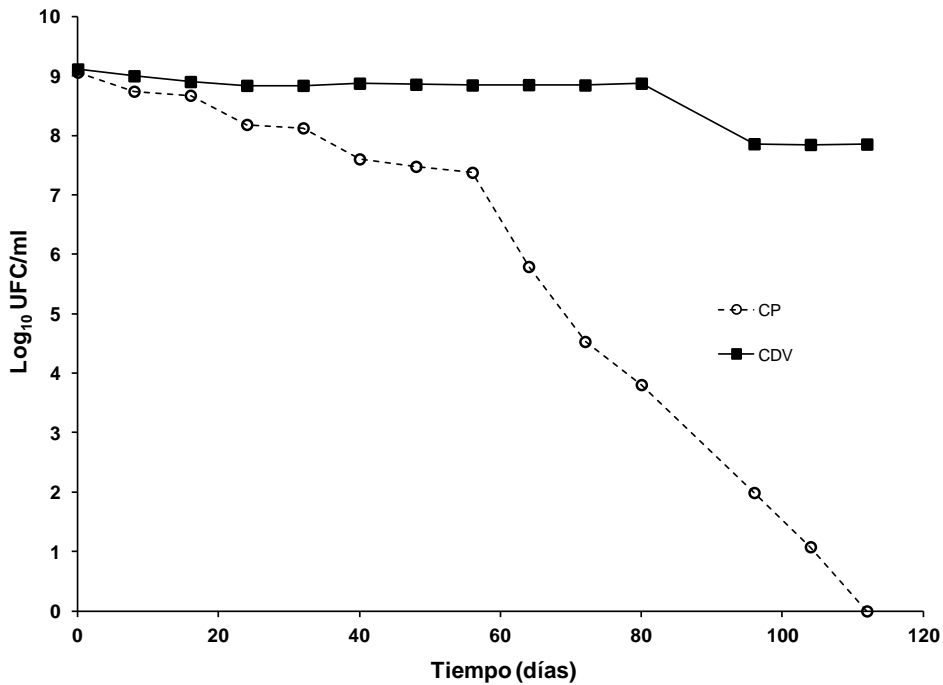


Figura 5.10. Cuenta en placa (CP) y cuenta directa viable (CDV) de una suspensión de células de *E. coli* en agua estéril de mar a 5°C durante 120 días.

completamente a dicho estado, esto puede deberse al hecho de que el agua salada no es el medio natural de estos 2 microorganismos (como ocurre con *V. cholerae*) y por lo tanto es posible que esto influya en el desarrollo de dicho estado, retrasándose el ingreso de toda la población al estado VNC. No obstante, cabe señalar que para el caso de *Salmonella* se ha reportado gran variabilidad en el tiempo en el que la totalidad de población entra al estado VNC de tal forma que se han reportado tiempos que van desde 48 h (Roszak y col. 1984) hasta más de 200 días (Gupte y col. 2003). Diferentes factores pueden estar influyendo en esta variabilidad, tales como el tipo y origen de la cepa bacteriana así como de las condiciones en las que se presenta la inducción al estado VNC.

Diferentes autores señalan que las bacterias en general han desarrollado mecanismos de adaptación que les permiten mantenerse viables durante largos periodos y sobrevivir en ambientes con baja concentración de nutrientes (Baker y col., 1983; Kjelleberg y Hermansson, 1984; Smigielski, y col., 1990). Ciertas bacterias acuáticas por ejemplo, cuentan con un sistema de proteínas de transporte (localizadas en la membrana) que produce ATP mediante un gradiente de protones cuando escasean los nutrientes. El gradiente de protones puede ser generado simplemente por una ligera disminución en el pH del medio (Sjogren y Gibson, 1981).

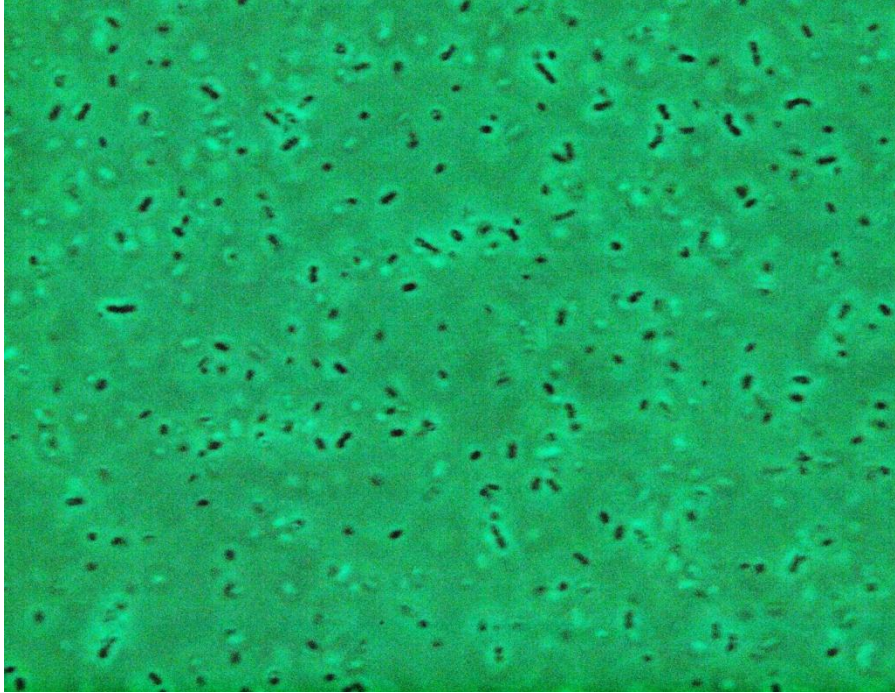
Muchas bacterias al encontrarse en un medio bajo en nutrientes (inanición) para generar energía utilizan primariamente reservas intracelulares como gránulos de almidón (McCann y col., 1992). Si el tiempo en inanición se prolonga, el microorganismo comienza a degradar algunas proteínas, carbohidratos, lípidos o enzimas que forman parte de su pared o membrana, o que se encuentran en el

citoplasma, pero que no son vitales para su sobrevivencia. Posteriormente, utilizará proteínas de los ribosomas, el ARN y finalmente actuará sobre su ADN (McCann y col., 1992). En todo este proceso la célula bacteriana experimenta cambios morfológicos y fisiológicos (Morita, 1992); dentro de ellos el más notable es la reducción del tamaño celular (Baker y col., 1983).

En nuestros estudios además de monitorear la condición VNC y la capacidad para formar colonias en el medio de cultivo, en algunos casos observamos cambios en la morfología celular y colonial de cepas bajo inanición (suspendidas en agua de mar). Tanto las células de *V. cholerae*, como de *Salmonella* y *E. coli* adquirieron formas cocoides algo menores a una micra de diámetro (Figuras 5.11 A y B). Estos cambios comenzaron a evidenciarse partir de la tercera semana de almacenamiento en refrigeración. En todos los casos se observaron mezclas de células con morfología cocoide y bacilar (Figuras 5.11 A y B). Cuando a totalidad de la población había entrado al estado VNC, el 100% de las células viables presentaban morfología cocoide. Todas estas observaciones se registraron en el agua bajo condiciones de esterilidad. Baker y col., (1983) señalan que la disminución en el tamaño de la célula, forman parte de los mecanismos de sobrevivencia de *V. cholerae* O1 en medios con deficiencia de nutrientes.

Cabe señalar que se observaron también cambios en la morfología colonial de la cepa de *V. cholerae* suspendida en agua estéril de mar, después de ser sometida a reanimación en CST y a 35°C. A partir de los 20 días de almacenamiento, el patógeno comenzó a formar colonias rugosas en el medio de cultivo (1-5 % de la

A



B

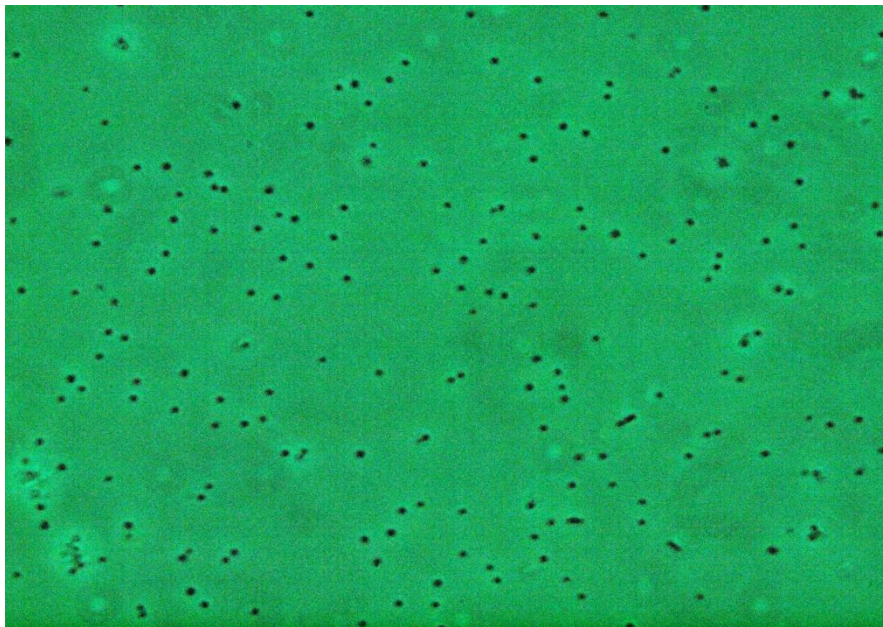


Figura 5.11. Morfología celular de *V. cholerae*, **A** cultivo fresco de 24 h de desarrollo, **B** células después de 56 días suspendidas en agua de mar a 3°C horas. Fotografía obtenida mediante microscopía de contraste de fases.

población). Y hacia los 30 días, alrededor del 90 % de la población formaron colonias rugosas con diferente grado de rugosidad. Se ha reportado que cuando *V. cholerae* se encuentra por tiempo prolongado en un medio bajo en nutrientes, puede desarrollar colonias rugosas sobre el medio de cultivo (Wai y col., 1998). Varios investigadores señalan que la formación de estas variedades es un mecanismo de sobrevivencia del *V. cholerae* al encontrarse en condiciones de estrés ambiental (Rice y col., 1992). La forma rugosa de *V. cholerae* fue descrita por primera vez en 1938 por Bruce quien reconoció que puede ser una variante que permite al microorganismo sobrevivir en el medio ambiente (White, 1938). Rice y col. (1992), sugieren también que el fenotipo rugoso de *V. cholerae* es una forma de sobrevivencia de las cepas virulentas del patógeno en el medio ambiente. Señalan además, que puede sobrevivir a las concentraciones de cloro comúnmente empleadas en aguas para el consumo humano, siendo ineficaz esta acción para controlar el cólera. Morris y col. (1996), han observado que las variantes rugosas de *V. cholerae* mantiene su potencial patógeno y producen un exopolisacárido (EPS) que promueve la agregación celular. Se ha sugerido que ésta agregación protege a las células individuales contra desinfectantes como el cloro o la lisis por el complemento (Morris y col., 1996). Es importante enfatizar que a diferencia de *V. cholerae* las formas rugosas de las colonias no fueron observadas en *Salmonella* ni *E. coli* provenientes de los microcosmos mantenidos en refrigeración.

5.4. Estudios de DSC de las células de *V. cholerae*, *Salmonella* y *E. coli* durante el desarrollo del estado VNC.

Paralelamente al monitoreo de la inducción al estado VNC de los patógenos de estudio con cuenta en placa (CP) y la técnica de CDV, se realizaron determinaciones de DCS para conocer si ocurrían cambios en la respuesta térmica de la población durante su ingreso al estado VNC; para ello, se tomaron alícuotas de los mismos microcosmos que estaban siendo monitoreados por CP y CDV. En la Figura 5.12 se muestran los termogramas obtenidos para las células viables y cultivables (cultivos jóvenes de 18 h) de *V. cholerae*, *S. Typhimurium* y *E. coli*. Cabe señalar que estas son poblaciones celulares no sometidas a estrés y por lo tanto no hay presencia de células no cultivables. En la figura se observa que para *V. cholerae* se presentaron 2 picos pequeños y uno grande, el primero se presentó alrededor de 60 °C y el segundo a 70 °C, los cuales están relacionados con la desnaturalización de los ribosomas en las bacterias, según lo reportado por Mackey y col. (1991). El mayor de los picos se presentó alrededor de 80 °C, el cual se relaciona con la fusión de ADN (Lee y Kalentunc, 2002), mientras que para *S. Typhimurium* se observaron dos picos claramente definidos a 65 °C y 93 °C (Figura 5.12) similares a los reportados por Lee y Kalentunc (2010) para *S. enteritidis*. *E. coli* también presentó dos picos (Figura 5.12), el primer pico está relacionado con la desnaturalización de los ribosomas, el segundo pico se relaciona con daño y desnaturalización del DNA de acuerdo a lo observado por Mackey y col. (1991) y por Lee y Kalentunc (2002).

Este comportamiento térmico, por otro lado, muestra la naturaleza de los distintos microorganismos. Miles y col. (1986), señalan que el inicio de la primera

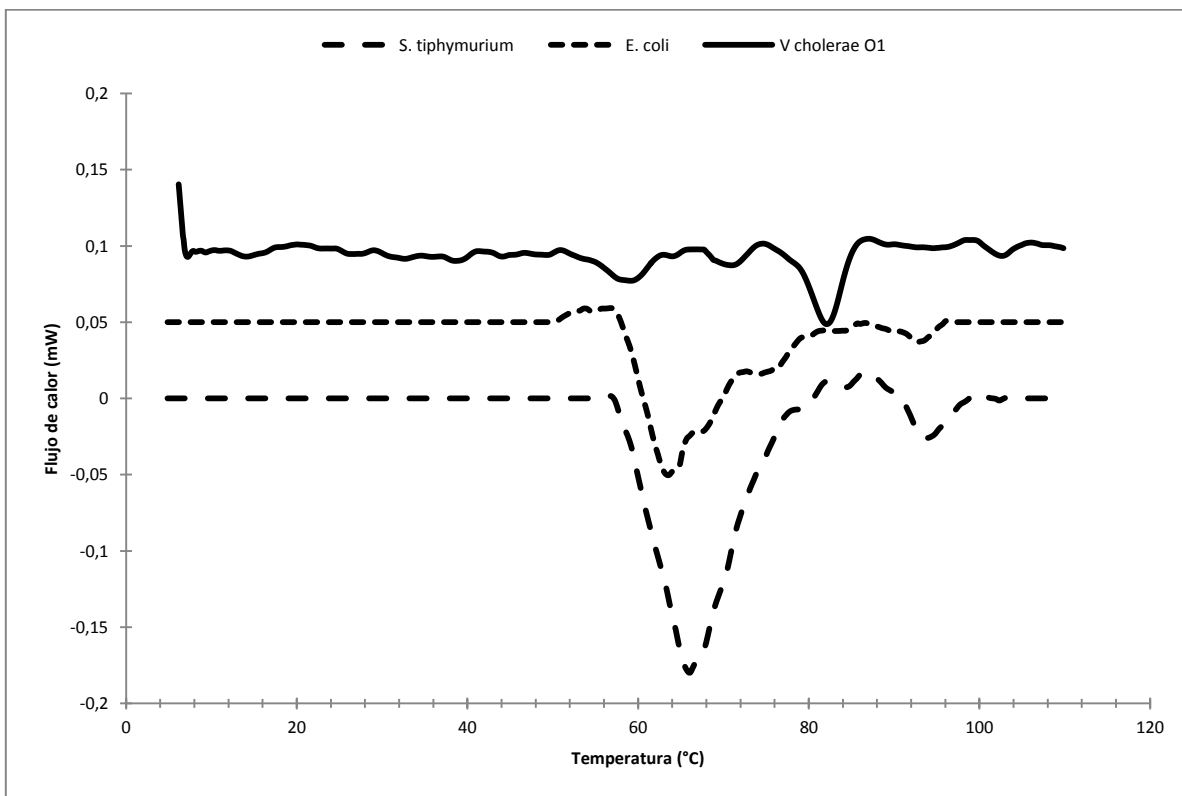


Figura 5.12. Termogramas de células viables cultivables *V. cholerae*, *S. Typhimurium* y *E. coli* obtenidas por DSC.

desnaturalización o transición térmica está fuertemente relacionada con la tolerancia térmica del organismo estudiado, ya que al ser microorganismos mesofilos, su temperatura ideal de crecimiento está por debajo de la primera transición térmica (50 °C aproximadamente), indicando que por arriba de ésta las células empiezan a sufrir daños en su estructura llevándolas a la desnaturalización y muerte de la misma, corroborando su naturaleza mesofílica.

Durante el desarrollo del estado VNC de los tres tipos de microorganismos, se observó que las poblaciones de células presentaron respuestas distintas al tratamiento térmico (Figuras 5.13, 5.14, 5.15). Para el caso de *V. cholerae* (Figura 5.13), se observó que conforme la población de células desarrolló el estado VNC se requirió una mayor temperatura, con respecto a las células viables cultivables para provocar la desnaturalización de los ribosomas y daño en el ADN, observandose desplazamiento de los picos endotérmicos hacia la derecha. Este hecho sugiere que éste patógeno adquiere mayor resistencia térmica durante su ingreso a dicho estado. En otras palabras, los resultados indican que el estado VNC confiere resistencia a las células de *V. cholerae* a altas temperaturas.

Éste resultado estaría de acuerdo con una de las hipótesis sobre el estado VNC la cual señala que este estado es una forma de resistencia que confiere protección a las células no esporuladas bajo condiciones desfavorables (Huq y col., 1983).

Sin embargo, en *S. Typhimurium* se observó un efecto contrario (Figura 5.14), se observó que conforme la población del patógeno desarrollaba el estado VNC

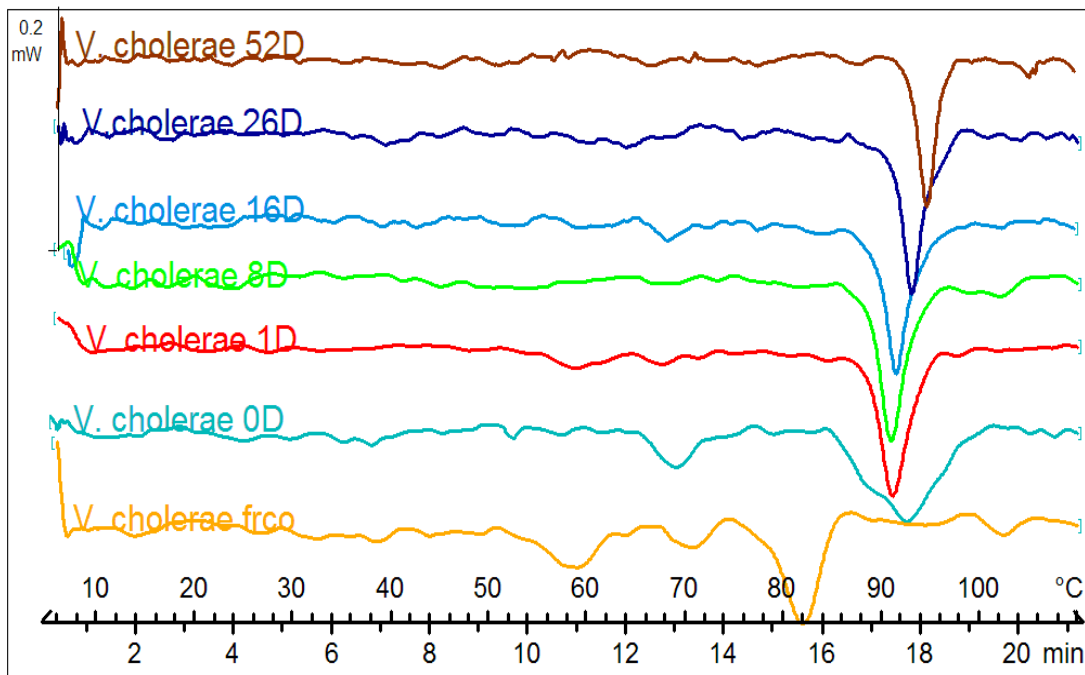


Figura 5.13. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de *V. cholerae*. D= días de almacenamiento en agua de mar y refrigeración de la cepa al momento del análisis.

ocurrió una disminución en la temperatura a la cual se presentaron los picos; la disminución observada fue de alrededor de 10 °C en el primer pico y de 25 °C en el segundo. En otras palabras, los resultados sugieren que el estado VNC no le confiere resistencia a las células de *S. Typhimurium* a altas temperaturas, por el contrario en este estado la célula es más sensible a la temperatura, con respecto a las células viables cultivables.

En *E. coli*, por otro lado, se presentaron cambios en cuanto a la forma de los picos, los cuales se van atenuando sin afectar en gran medida la temperatura y entalpia del primer pico (Figura 5.15). Es decir, los datos sugieren que el estado VNC no afecta la resistencia de las células de *E. coli* a la alta temperatura.

Como se observa en la figuras 5.13 a 5.15, tanto el desplazamiento de los picos con respecto a la temperatura, como la desaparición de algunos de estos muestra la sensibilidad, resistencia y muerte respectivamente a los tratamientos a los que las células bacterianas son sometidas. Lee y Kalentuc, (2010) evaluaron mediante DSC el efecto de la nisina y presión hidrostática alta en la viabilidad de *S. Typhimurium* . Los investigadores reportaron diferentes termogramas relacionados con los daños que sufre la célula. También se ha evaluado mediante DSC los daños que sufre *Listeria monocytogenes* bajo el efecto del NaCl (Anderson y col., 1991), por choque térmico por frío (Bayles y col. 2000). El DSC también se ha utilizado para estudiar los daños sobre las esporas por la alta temperatura (Belliveau y col. 1992) y para *Leuconostoc mesenteroides* cuando es sometido a alta presión hidrostática (Lee y Kalentuc, 2004) entre otros.

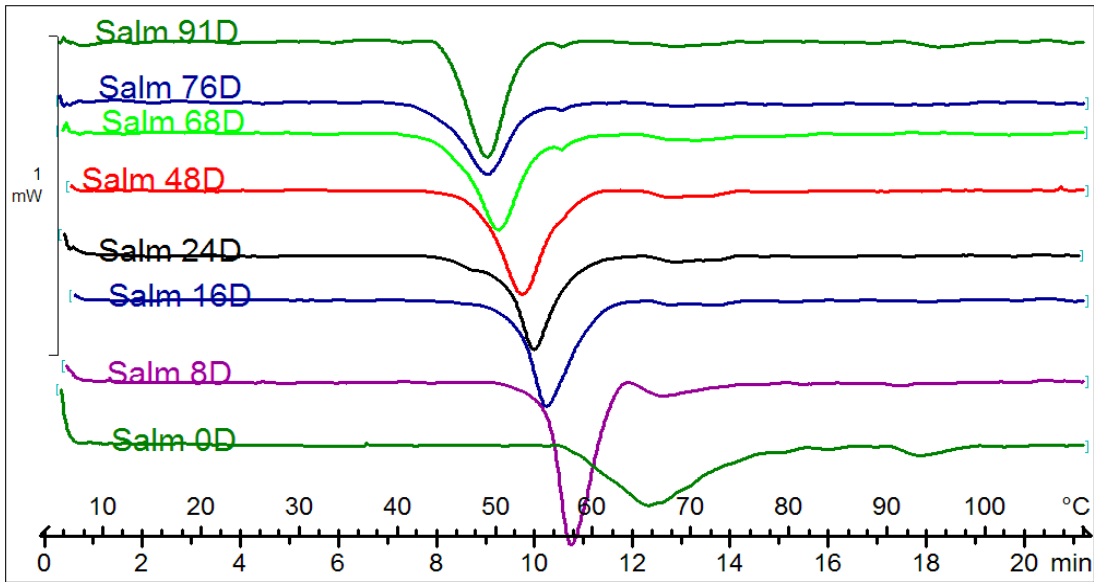


Figura 5.14. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de *S. Typhimurium* . D= días de almacenamiento en agua de mar y en refrigeración de la cepa al momento del análisis

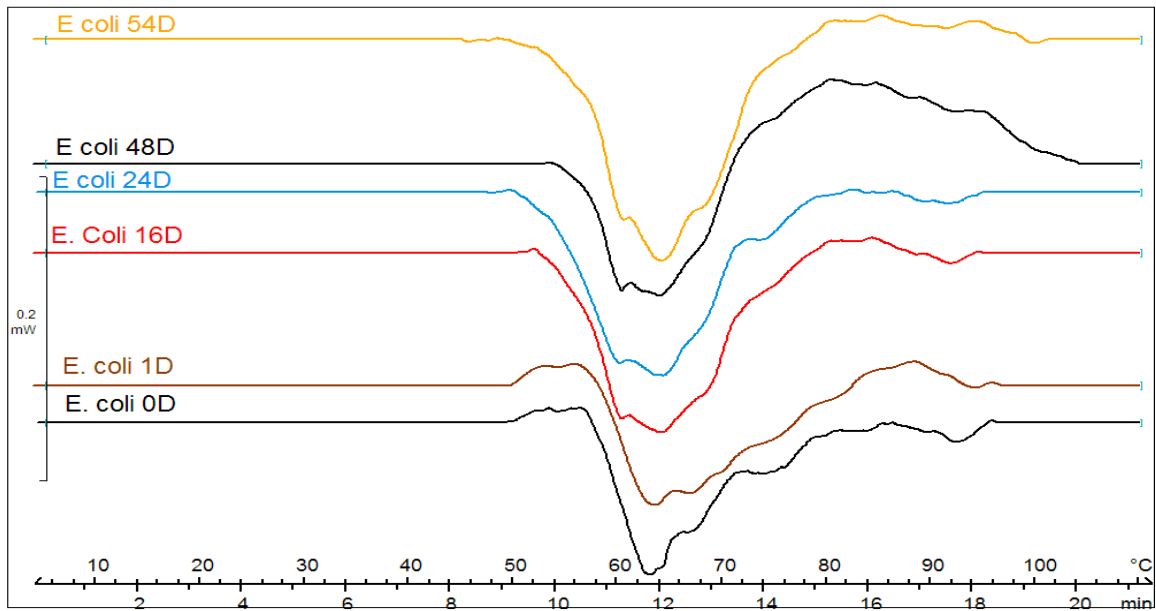


Figura 5.15. Seguimiento por DCS de la inducción al estado VNC de células de *E. coli*. D= días de almacenamiento en agua de mar y en refrigeración de la cepa al momento del análisis

Según lo observado en los termogramas, conforme transcurre el tiempo de almacenamiento y disminuye el conteo de viables, las transiciones térmicas para *S. Typhimurium* se presentan a más baja temperatura y por el contrario para *V. cholerae* se observan a temperaturas más elevadas lo cual indica que se requiere para el caso de *V. cholerae* de una mayor energía para desnaturalizar los distintos constituyentes celulares (ribosomas y ADN) mostrando de esta manera un incremento en la resistencia térmica en contraste la energía para realizar la desnaturalización de *S. Typhimurium* es menor indicando una disminución en la resistencia térmica y haciéndola de esta manera más sensible térmicamente al entrar al estado VNC. Por otro lado como ya se observó, *E. coli* mantiene su viabilidad y su estabilidad térmica normal al entrar al estado VNC, sin embargo, se observan cambios en los distintos constituyentes, lo que indica desnaturalización de la célula evidenciando una disminución en la viabilidad o posible desnaturalización de la misma, no obstante, los cambios no son significativos, por lo que se concluye que el estado VNC no la afecta por lo cual no se observa disminución en su resistencia térmica.

5.5. Estudio del estado viable no cultivable mediante IR

En la figura 5.16 se muestran los espectros de IR de células viables cultivables de *V. cholerae* y *S. Typhimurium*. Estas células fueron obtenidas de cultivos jóvenes de 18 h y fueron lavadas 2 veces en SSI. Para ambos microorganismos se observaron bandas similares en tamaño y forma; no obstante, se presentaron diferencias muy pequeñas entre los espectros de ambos microorganismos en

cuanto a la concentración de algunos compuestos (Figura 5.16). Los espectros se dividieron en 4 regiones.

La región 1 que comprende entre 4000 y 2400 cm^{-1} , donde se observan bandas espectrales muy amplias resultado de los estiramientos de $-\text{OH}$ (3400cm^{-1}) y N-H (amida A $\sim 3300\text{cm}^{-1}$ y amidas B $\sim 3030\text{cm}^{-1}$); entre 3100 y 2800 cm^{-1} exhibe las vibraciones de estiramiento de los grupos funcionales $-\text{CH}_3$ y $>\text{CH}_2$ y por lo tanto está dominado generalmente por las características espectrales de las cadenas de ácidos grasos de las membranas ambifílicas (por ejemplo, fosfolípidos) y por algunas vibraciones de la cadena lateral de aminoácidos. Región 2 entre 1800 y 1300 cm^{-1} , se observan amidas I (1655 cm^{-1}) y II (1548 cm^{-1}); entre 1500 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} derivado de los enlaces $>\text{CH}_2$ y $>\text{CH}_3$ de lípidos y proteínas. En la región de 1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , alrededor de 1230 cm^{-1} se observan bandas superpuestas típicas de diferentes dobles enlaces asimétricos vibracionales de estiramiento de fosfodiéster, así como grupos funcionales de fosfato libre y fosfato monoéster; así también está dominada por vibraciones de tensión simétricas de grupos fosfato en los ácidos nucleicos y una secuencia compleja de picos debido a C-O-C y C-O-P de vibraciones de estiramiento de varios oligopolisacáridos. La región 4 se considera 900 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , esta región puede contener bandas débilmente expresadas derivados de las vibraciones de anillo aromático de la fenilalanina, tirosina, triptófano y los diversos nucleótidos. Con base en lo anterior,

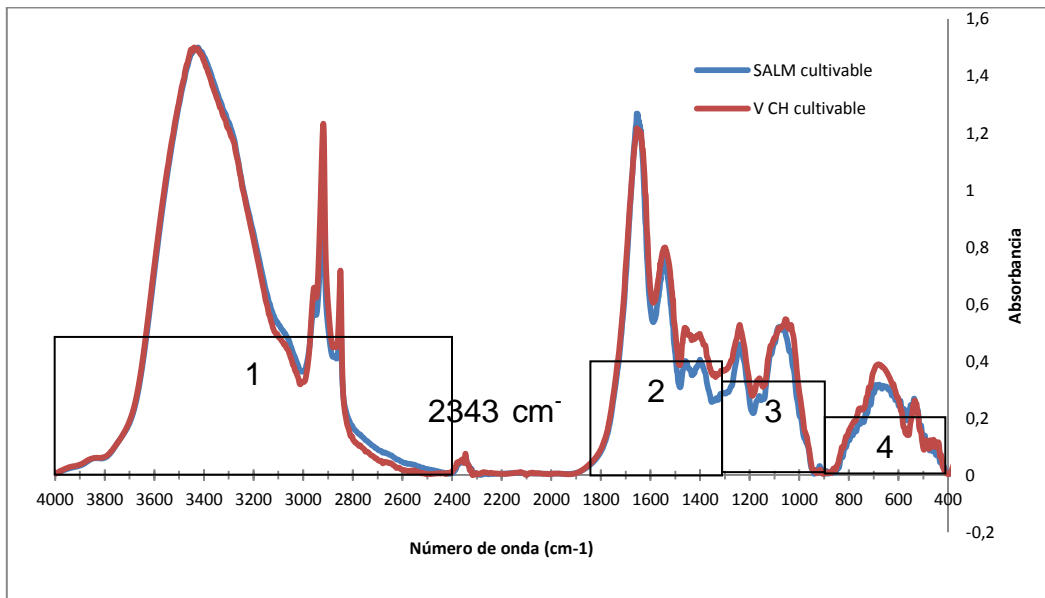


Figura 5.16. Espectros de IR de *S. typhimurium* y *V. cholerae* en estado cultivable. los espectros están dividido en las 4 regiones de estudio.

a partir de los espectros obtenidos de las células cultivables de los microorganismos de estudio, se asignaron tentativamente las estructuras para algunos picos de interés para el estudio (Tabla 5.4).

En la figura 5.17 (a y b) se muestran los espectros de *V. cholerae* y *S. Typhimurium* respectivamente tanto en estado cultivable como VNC. Interesantemente se observó un pico de particular interés que estaba ubicado en una zona que no presenta interferencia de ninguna otro compuesto orgánico a 2343 cm^{-1} ; se ha reportado que éste pico se debe a la presencia del CO_2 liberado como producto de la actividad metabólica de los microorganismos (Schultz y col., 1996). En otras palabras, este pico indica que tanto las células de *V. cholerae* como *S. Typhimurium* están vivas o viables. Cabe destacar, que este pico se observó tanto en los espectros obtenidos a partir de las células jóvenes-viables-cultivables, como en los obtenidos a partir de las células en estado VNC, confirmando con ello la viabilidad de las células en estado VNC o que en verdad las células en estado VNC están vivas; corroborando con ello los resultados de la técnica de CDV.

Por lo tanto, el pico a 2343 cm^{-1} es producto del metabolismo en ambas bacterias; no obstante, debido a que las células en estado VNC estaban suspendidas en agua de mar sin nutrientes se podría esperar que dicho pico estuviera ausente, sin embargo, al estar presente esto indica que tales células aún conservan su actividad metabólica, posiblemente producto de sus reservas energéticas.

Tabla 5.4. Asignación tentativa de bandas en el espectro de infrarrojo de células bacterianas

Numero de onda (cm ⁻¹)	Asignación de grupo funcional	Posible contribución de algunas biomoléculas
3400	O-H, N-H	Amidas A, Peptidoglucano (Naumman y col, 1982)
2918	v(CH ₂) asimétrico	Ácidos grasos
2852	v(CH ₂) asimétrico	Ácidos grasos
1655	Amida I estructuras Alfa-helicoidal	Proteínas
1548	Amida II	Proteínas
1250-1220	v(P=O) asimétrico	Fosfolípidos, ADN y ARN
1076	v(CC) conformación cis	columna de ADN y ARN
680	C=C	

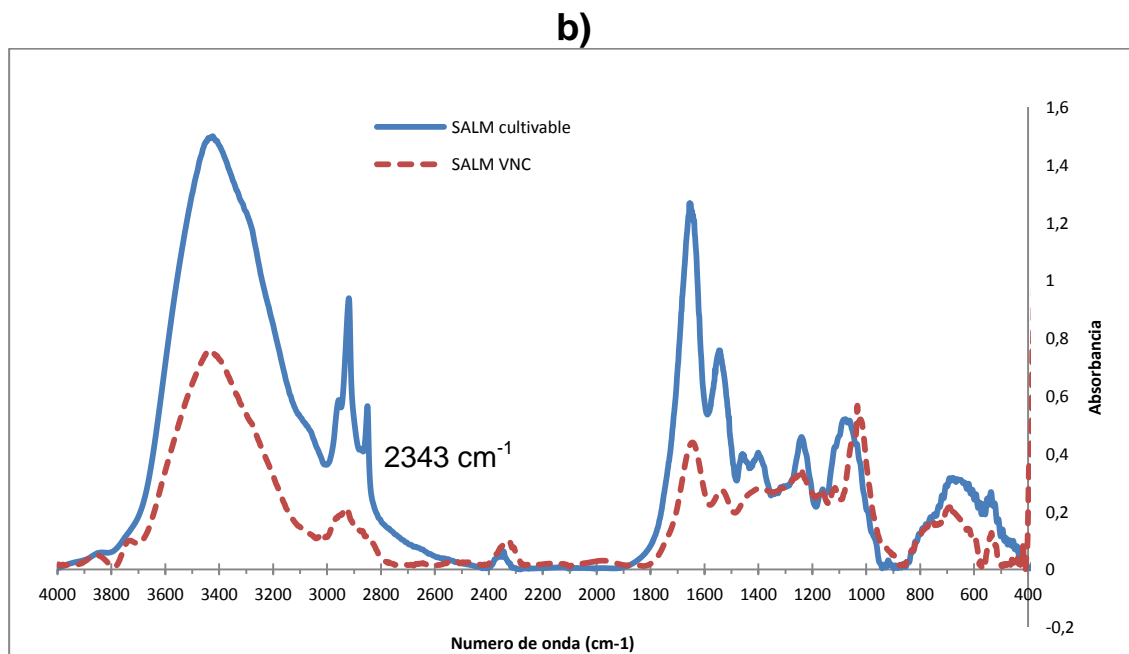
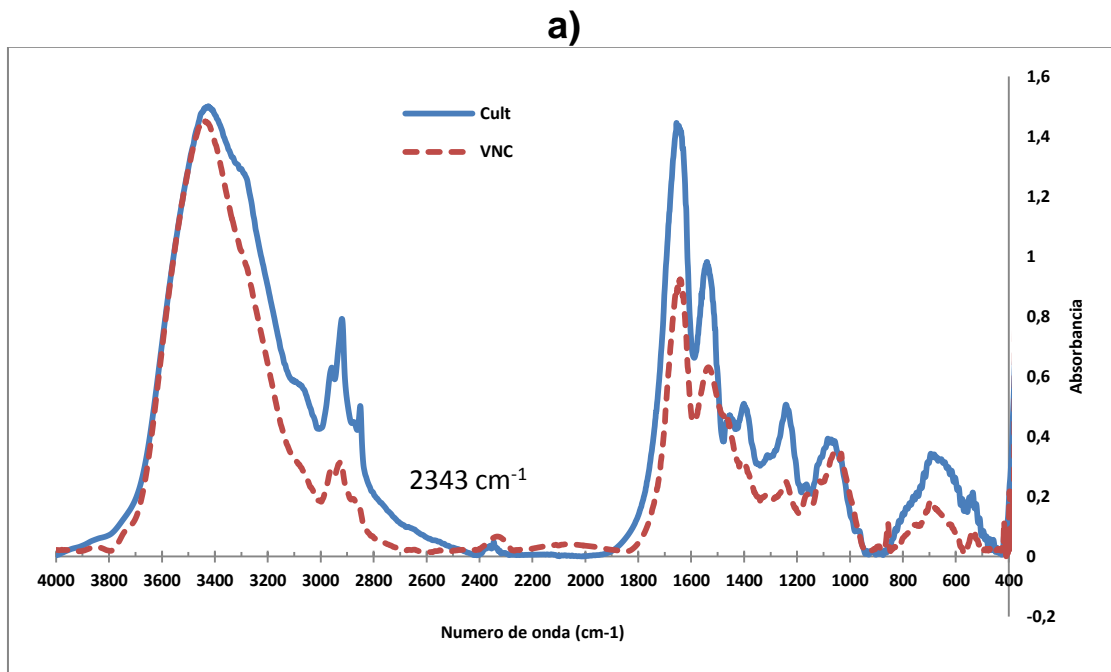


Figura 5.17. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC de a) *V. cholerae* y b) *S. typhimuirum*.

Por otro lado, en los espectros obtenidos de las células en estado VNC se puede observar en lo general que existen diferencias en los picos de cada una de las 4 regiones para cada patógeno comparando los espectros de las células viables-cultivables con los de las células en estado VNC. Esto sugiere que el estado VNC afecta de manera distinta a cada microorganismo, tal como ya lo observamos en los estudios correspondientes a la resistencia térmica de las células en estado VNC. Al comparar los espectros entre las células viables-cultivables contra los de las células en estado VNC del mismo microorganismo, se observa que mientras para *V. cholerae* la diferencia en altura de los distintos picos es pequeña entre los espectros de las células viables-cultivables y las que están en estado VNC, para *S. Typhimurium* estas diferencias se ven significativamente incrementadas, observándose una mayor afectación en los componentes de la célula para *S. Typhimurium* que para *V. cholerae*.

En la figura 5.18 se observan los espectros de *V. cholerae* y *S. Typhimurium* respectivamente en estado viable-cultivable y VNC de la región 1 que comprende de 4000 cm^{-1} a 2400 cm^{-1} , en esta región se observa un pico sobre 3450 cm^{-1} el cual puede relacionarse con el estiramiento del enlace O-H de los grupos hidroxilo, mientras que los que se presentan alrededor de 3300 cm^{-1} y 3090 cm^{-1} se relacionan con el estiramiento del enlace N-H de amidas A y B respectivamente pertenecientes al peptidoglucano según lo reportado por Naumman y col. (1982). Tanto para *V. cholerae* como para *Salmonella*, la altura de estos picos se ven disminuidas cuando entran al estado VNC, lo que indica que la integridad celular

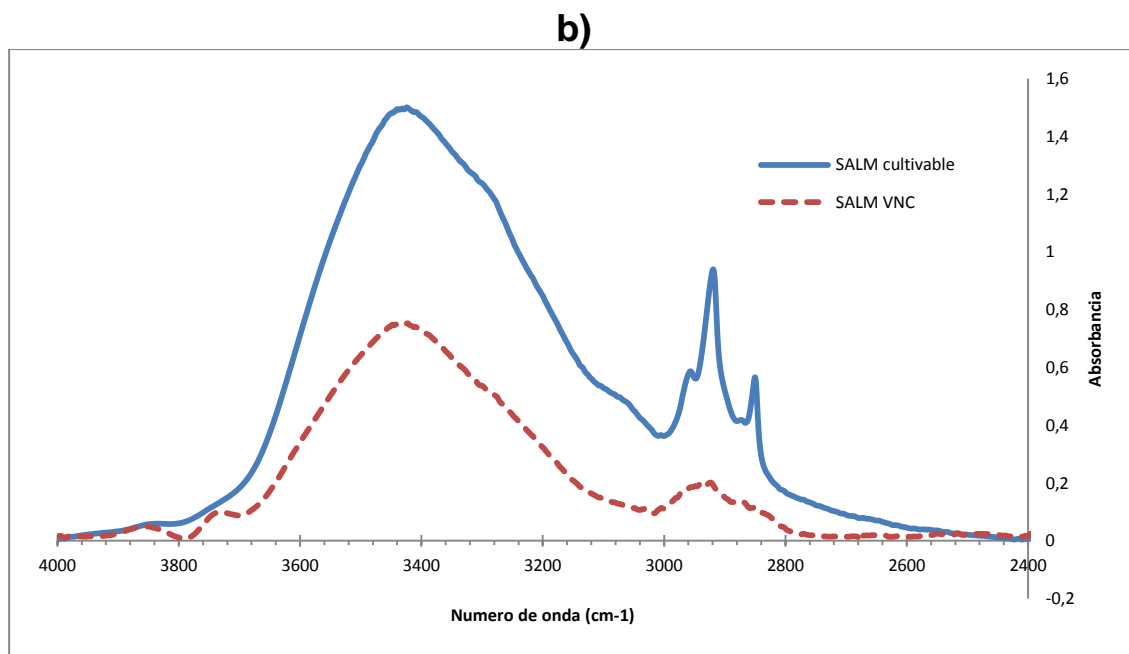
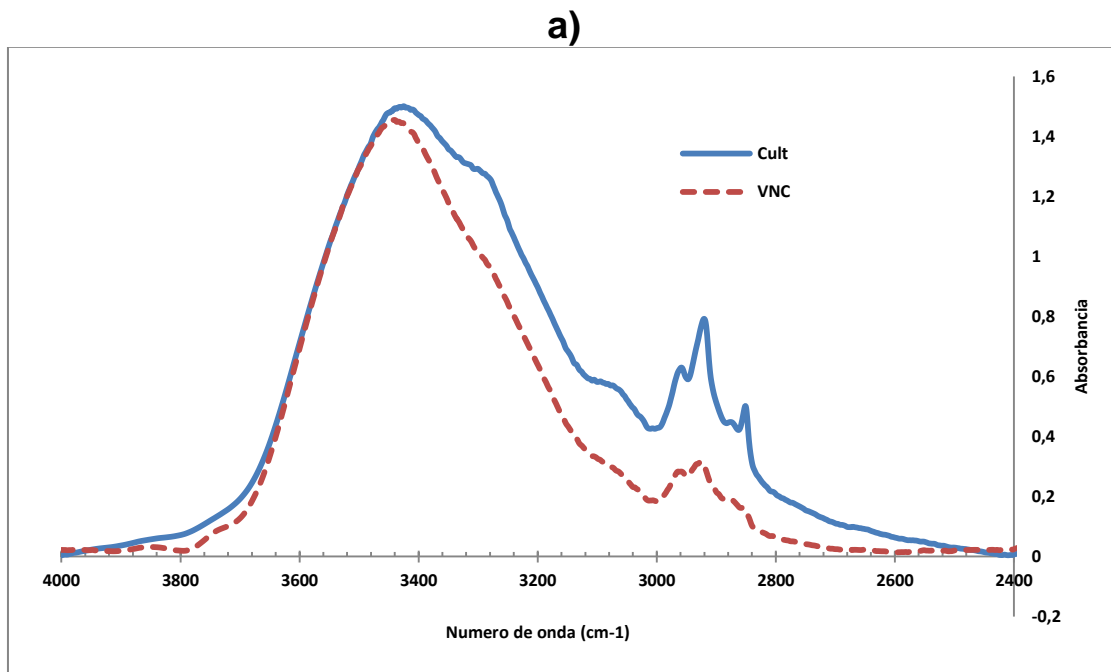


Figura 5.18. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 1 (4000-2400cm-1) de a) *V. cholerae* y b) *S. Typhimurium* .

se ve disminuida al entrar a este estado. Cabe señalar que la mayor reducción se observa para *S. Typhimurium*, lo cual concuerda con lo observado en DSC donde se observó que la resistencia térmica de las células en estado VNC de *S. Typhimurium* disminuyó significativamente; los datos sugieren que esta disminución a la resistencia térmica podría ser debido, en parte, a la pérdida significativa del peptidoglicano. Lo cual no se observó en *V. cholerae*.

Por otro lado en la figura 5.19 podemos observar los espectros de *S. Typhimurium* y *V. cholerae* en la región 2 que comprende de 1800 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , en la cual se observa la banda de la amida I alrededor de 1650 cm^{-1} que representa las vibraciones de estiramiento del enlace C=O de grupos amida de proteínas y alrededor 1540 cm^{-1} se observa la banda relacionada a la amida II representando la deformación del enlace N-H y estiramiento del enlace C-N y los modos de flexión de los grupos CH_3 y CH_2 presentes en todas las biomoléculas. Se observan también, la presencia de picos relacionados con lípidos y carbohidratos y proteínas.

En esta región se observa nuevamente como la entrada al estado VNC afecta la integridad celular al afectar la concentración de polisacáridos de la pared celular del peptidoglicano, lo que en el caso de *S. Typhimurium* muy probablemente provoca daño subletal disminuyendo con ello su resistencia térmica. Por otro lado, aunque *V. cholerae* también muestra una ligera disminución en la intensidad de estas bandas, su resistencia térmica se incrementa según lo observado por DSC.

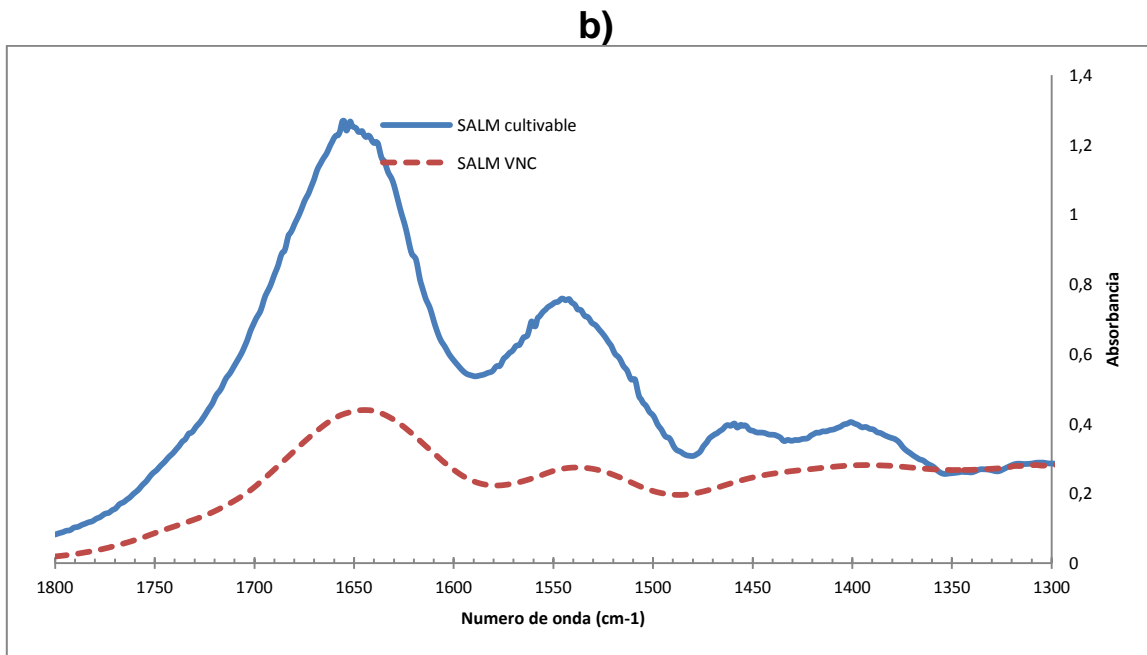
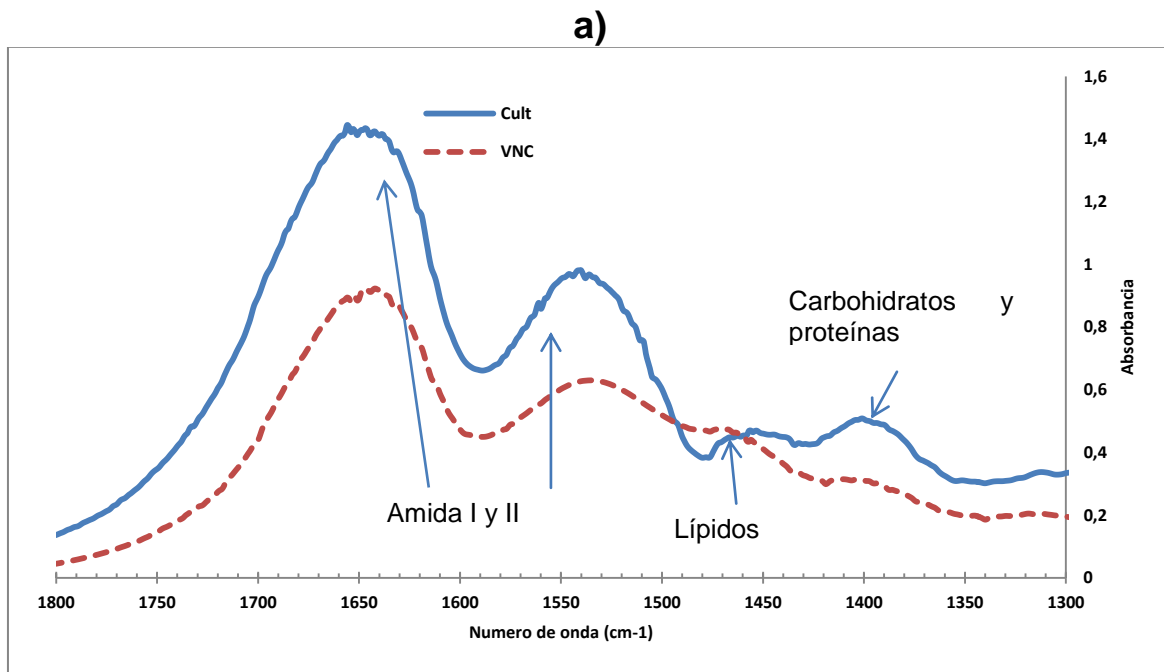


Figura 5.19. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 2 ($1800\text{-}1300\text{cm}^{-1}$) de a) *V. cholerae* y b) *S. Typhimurium*.

La región espectral entre 1300 y 900 cm^{-1} (Figura 5.20) se define por las características de vibración de las proteínas celulares, ácidos nucleicos, membrana celular, y componentes de la pared celular (Goodacre y col. 1996). Las principales bandas en esta región incluyen los estiramientos antisimétrica (1242 cm^{-1}) y simétrica (1080 cm^{-1}) del grupo P=O de la columna vertebral de fosfodiéster de los ácidos nucleicos y las vibraciones de estiramiento de C-O-C de los polisacáridos (1200-900 cm^{-1}) en la capa de peptidoglucano de la pared celular y el prospecto lipopolisacárido exterior (Al Qadiri y col. 2008). En este intervalo como en los dos anteriores también se observa un cambio en las concentraciones de las distintas bandas de ambos microorganismos y de la misma forma el espectro de *S. Typhimurium* muestra una mayor afectación que *V. cholerae*. Sin embargo en esta región se observa incremento, ligero en el caso de *V. cholerae* y drástico en el caso de *S. Typhimurium*, en la banda correspondiente a los carbohidratos, de tal manera que esta banda parece definirse o dividirse hasta en 4 bandas diferentes (~1116, ~1053, ~1034 y ~1024 cm^{-1}) lo que indica la ruptura de los distintos polisacáridos que se encuentran en el peptidoglucano de la pared celular ya que en el intervalo de 1200-900 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de estiramiento de C-O-C de los polisacáridos. Esto explica de nueva cuenta el efecto que tiene sobre la estabilidad térmica de ambos microorganismos.

De esta manera los resultados de los espectros de IR de las distintas células comparados con lo observado en DSC pueden indicar por una lado los cambios

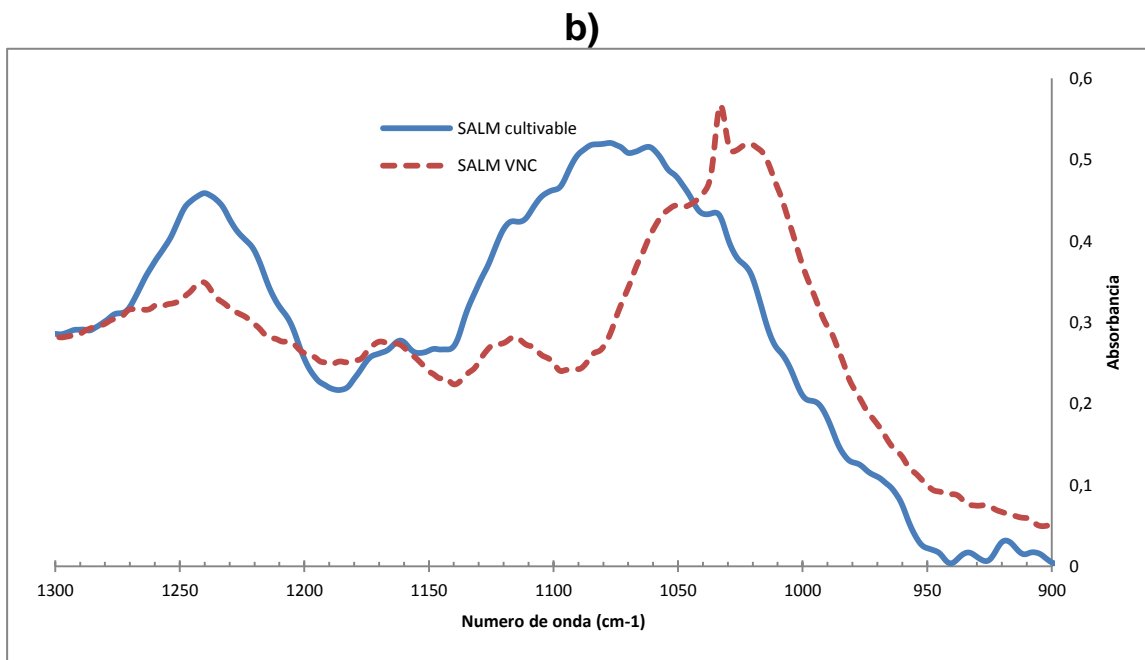
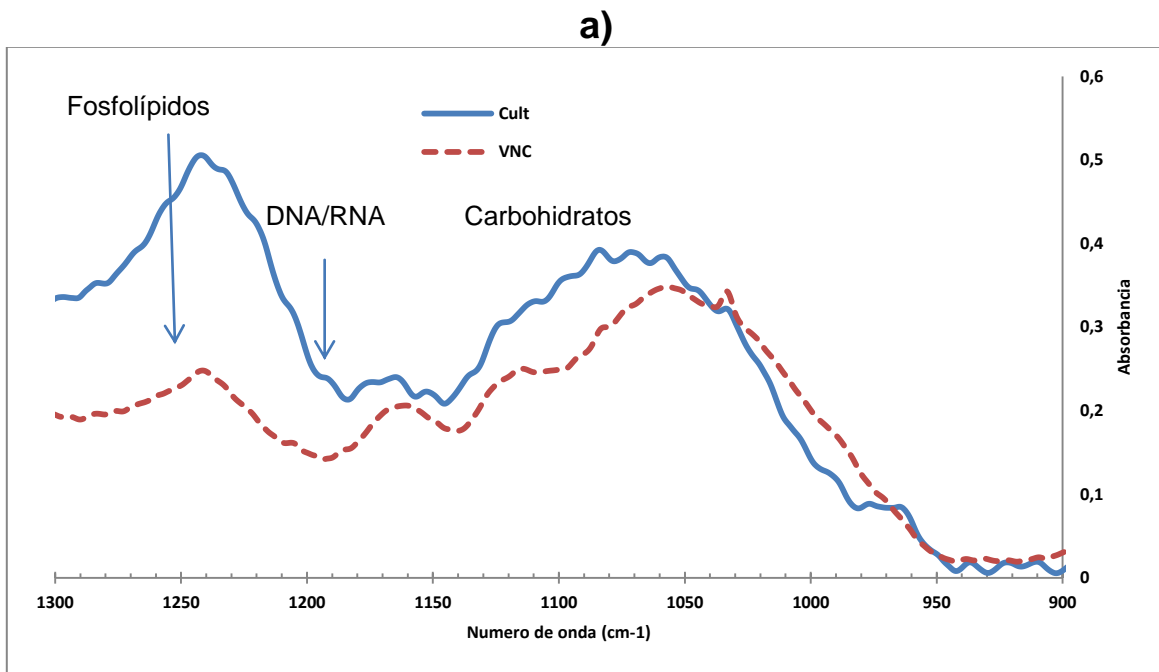


Figura 5.20. Espectros de IR de células en estado viable-cultivable y en estado VNC en la región 3 ($1300-900\text{cm}^{-1}$) de a) *V. cholerae* y b) *S. typhimurium*.

que las células experimentan durante el proceso de inducción al estado VNC donde a pesar de que *V. cholerae* tiene una mayor resistencia térmica su composición celular está siendo menos afectada mientras que *S. Typhimurium* que presenta una menor resistencia térmica y un cambio significativo en su composición celular, lo que puede explicar la susceptibilidad de *Salmonella* al tratamiento térmico observada en DSC.

5.6. Pruebas de resistencia térmica en células bacterianas en estado VNC

Se realizaron pruebas de resistencia térmica a células de *V. cholerae* y *S. Typhimurium* tanto en estado normal (viable y cultivable) como en estado VNC, mediante un protocolo de calentamiento del pellet a una temperatura isotérmica en el DSC y un posterior calentamiento en el mismo para observar los cambios en las transiciones por efecto del calentamiento previo. Como se ha mencionado, el objetivo de este estudio fue conocer si el estado VNC le confería resistencia a las células bacterianas frente a las altas temperaturas tal como se ha sugerido en diferentes artículos (Colwell et al., 1985). Si el estado VNC confiere protección a la célula, al someter células en este estado a temperaturas cercanas a la de pasteurización, es de esperar que tales células soporten mejor o mayormente el efecto de la temperatura que las células normales o viables-cultivables, de tal manera que al estudiar mediante DSC estas células (VNC y viables-cultivables) que fueron sometidas a tratamientos térmicos, se pueda determinar si hubo o no efecto de la temperatura, y en qué grado, sobre las células después del tratamiento térmico. Si el EVNC "protege" o confiere resistencia a la célula es de esperar que en los termogramas se observen transiciones de fases o picos a

mayores temperaturas en las células en EVNC que las que se observen sobre las células viables-cultivables. Por el contrario, si tal EVNC no protege a la célula es de esperar que dichas transiciones de fases o picos se presenten a más bajas temperaturas; e inclusive, si no existe protección, es posible que no se observen ya transiciones de fases en los termogramas de las células en EVNC debido a que el tratamiento térmico daña por completo a la célula bacteriana (Miles y col., 1986; Anderson y col., 1991; Mackey y col., 1991; Belliveau y col., 1992; Mohacsi-Farkas y col., 1999; Kaletunc, 2001).

En la figura 5.21 se observan los termogramas de las células de *V. cholerae* en estado (a) cultivable-cultivable y (b) VNC sometidas a 55°C, 65°C, 70°C y 75°C; para el caso de las células viables-cultivables en las gráficas el control está denominado como *V. ch.* Este es un termograma obtenido de las mismas células de *V. cholerae* pero que no fueron sometidas previamente a un tratamiento térmico. El termograma de *V. cholerae* control presenta las distintas transiciones de fase o picos característicos, ya analizados y discutidos previamente, de los cuales las transiciones que se presentan a 60-70 °C y 90-100 °C son las que nos interesan, como ya se ha discutido previamente, y son las que tomaron como referencia para el análisis de los termogramas. Se observó que la temperatura tiene efecto en la estructura de *V. cholerae* [Figura 5.21 (a)], aun a temperaturas (55° C, por ejemplo) no consideradas letales para éste microorganismo (Fernández, 2000); en los termogramas se observa que conforme el tratamiento térmico va siendo más severo, las transiciones principales que se observan a 60°-70° C (relacionadas con desnaturalización de ribosomas y muerte celular) y a 90°

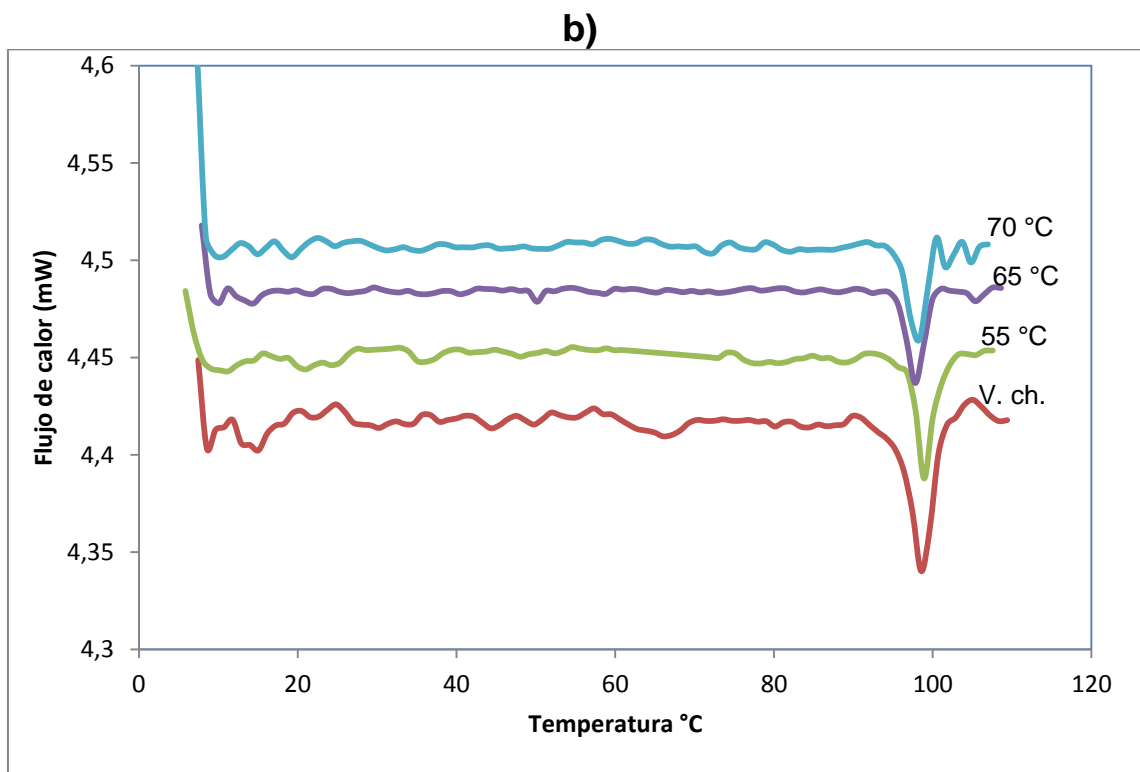
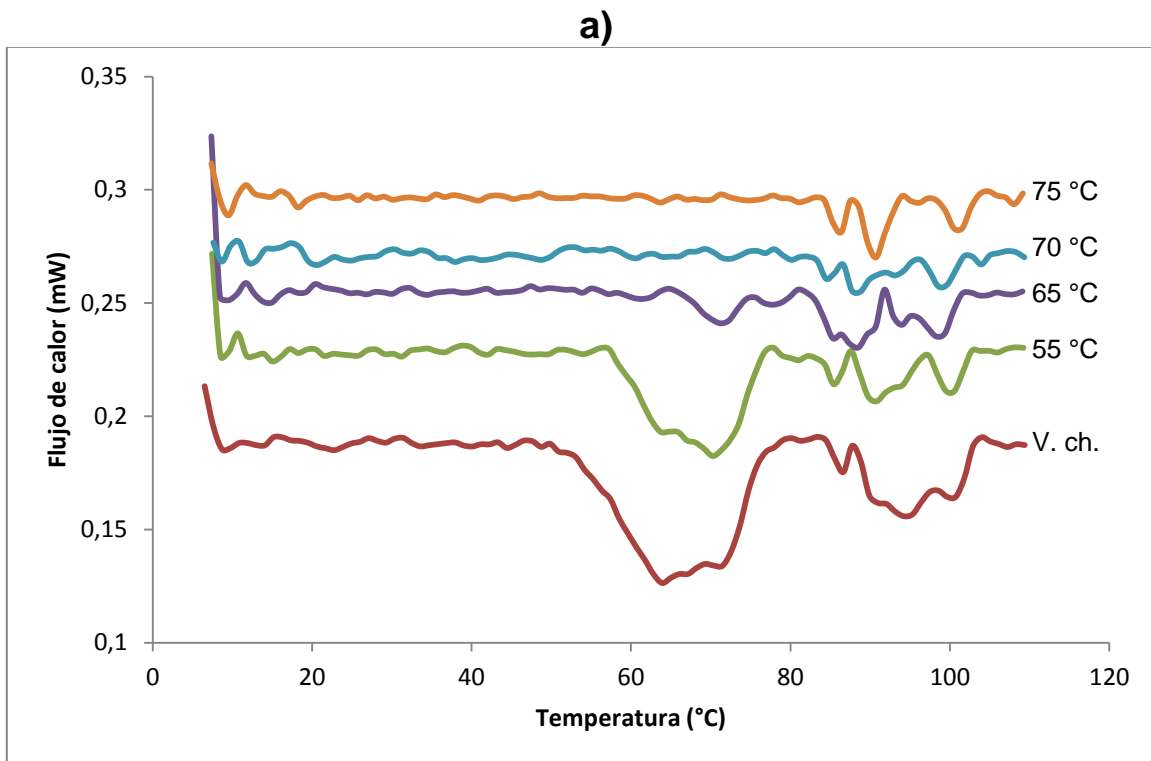


Figura 5.21. Transiciones de *V. cholerae* sometidas a inactivación térmica a 55, 65 y 70°C a) viables – cultivables; b) VNC

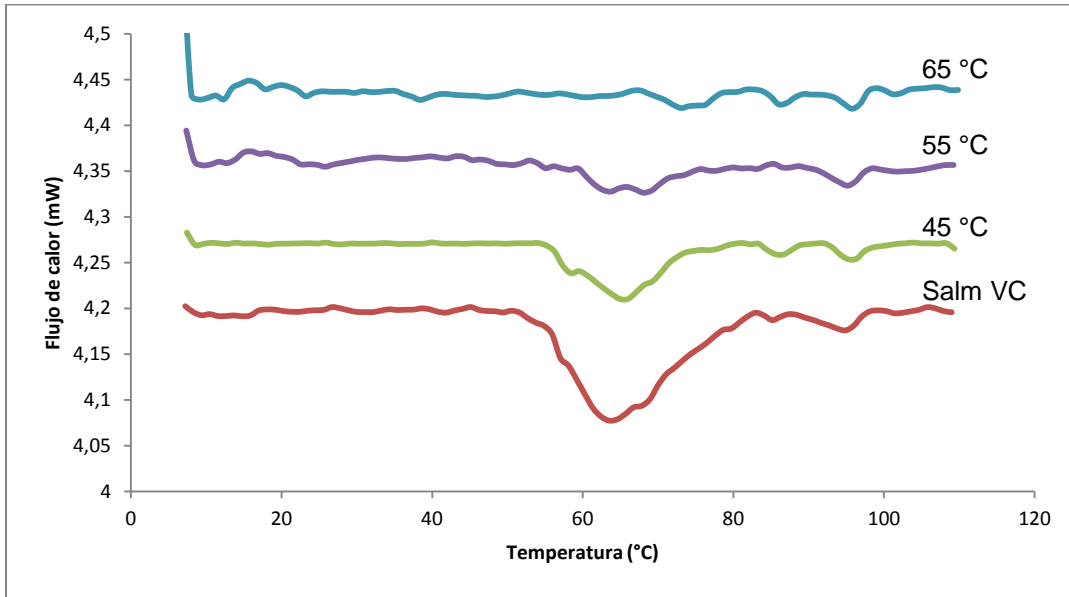
C (relacionadas con desnaturalización del ADN y daño en la pared) empiezan a desaparecer, disminuyendo incluso los picos de tamaño hasta su total desaparición cuando las células son calentadas a 70 °C, lo que sugiere que el tratamiento térmico previo afectó, de manera creciente con la temperatura, las estructuras celulares hasta un punto tal que el tratamiento previo a 70 °C provocó la desaparición casi completa de los picos relacionados con la desnaturalización de ribosomas, muerte celular, desnaturalización del ADN y con el daño en la pared celular (Mackey y col., 1991; Mackey y col. 1993; Teixeira col., 1997; Kaletunc, 2001). En otras palabras, los datos sugieren que con un tratamiento térmico de 70 °C se logró la inactivación o destrucción total de las células de *V. cholerae* O1 "normales" o viables-cultivables, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Fernández, 2000).

Por el contrario, para el caso de las células en estado VNC se presentó un efecto distinto al observado con las células viables-cultivables. Los termogramas sugieren que las células en estado VNC resisten más el efecto de la alta temperatura que las células viables-cultivables [Figura 5.21 (b)]. Como se discutió anteriormente en el apartado 5.4 para la figura 5.13: se observó que después de 25 días de almacenamiento en agua de mar toda la población de células viables de *V. cholerae* había entrado al estado estado VNC (Figura 5.13); en este tiempo y para esta población de células el análisis térmico mostró que habían desaparecido los picos relacionados con la estabilidad de los ribosomas, y solo permanecía un pico que se relacionó con la viabilidad, con la pared y con la desnaturalización del ADN; además de que éste pico en esta población se había desplazado o

aparecido a una temperatura más alta que en las células viables-cultivables (Figura 5.13). Cuando esta población de células en estado VNC se sometió a las mismas altas temperatura que las utilizadas para las células viables-cultivables, se observaron ligeros cambios en el pico, con respecto al control no tratado [Figura 5.21 (b)], lo cual sugiere que el estado VNC le confiere protección a las célula de *V. cholerae*. Un análisis de viabilidad mediante la técnica de cuenta directa viable realizado por epifluorescencia y efectuado a estas poblaciones de células en estado VNC tratadas, confirmó los resultados. Las células sometidas a los tratamientos térmicos permanecían viables; lo que no ocurrió con las células viables-cultivables. Hasta el momento los resultados sustentan la hipótesis sobre que el estado VNC confiere resistencia a *V. cholerae* O1, al menos frente a altas temperaturas.

Por otro lado, para el caso de *S. Typhimurium* se observó una menor resistencia térmica (figura 5.22a) que la presentada por *V. cholerae*; las células viables-cultivables de *Salmonella* se inactivaron térmicamente a sólo 65 °C (Figura 5.22a), es decir, al someter a las células viables-cultivables de *Salmonella* a una temperatura previa de 65 °C con el posterior análisis térmico de estas células se encontró que los picos relacionados con la estabilidad de los ribosomas y la viabilidad, desaparecen ya en estas células que fueron tratadas a 65 °C. No obstante, las transiciones o picos relacionados con la estabilidad del ADN (pico que se observa a 90°-95° C) se conservan (Figura 5.22a).

a)



b)

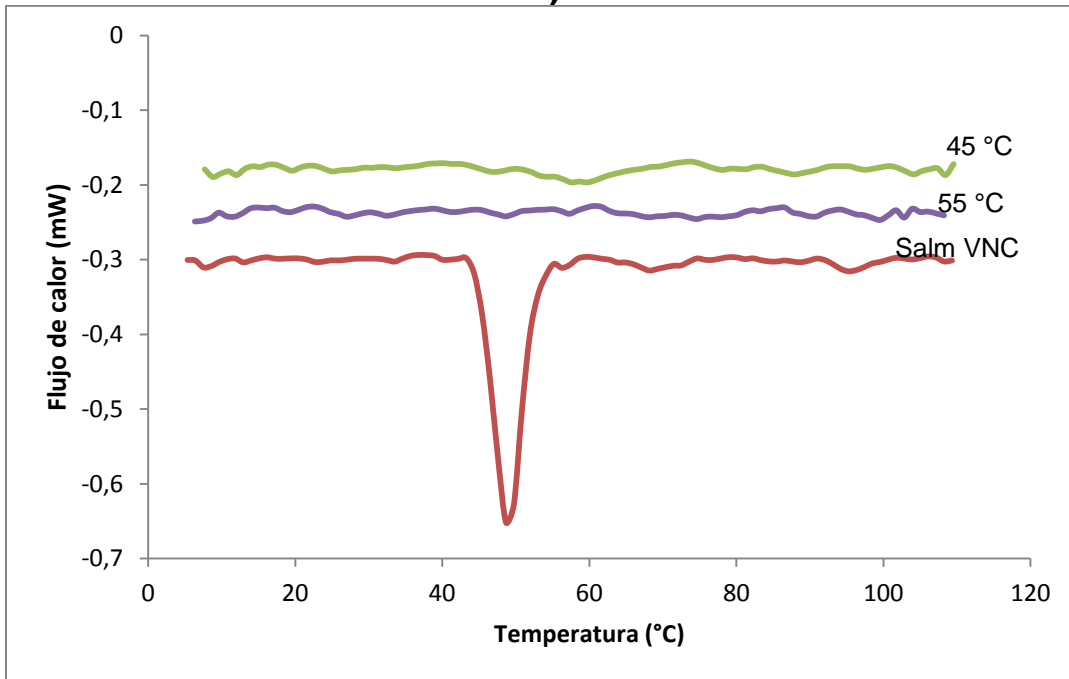


Figura 5.22. Transiciones de células en estado a) viable y b) VNC de *S. Typhimurium* sometidas a inactivación térmica a 45, 55 y 65°C durante 10 min.

Sin embargo cuando las células de *S. Typhimurium* en estado VNC fueron sometidas al mismo tratamiento térmico, se observó que después de los tratamientos éstas células ya no presentaron ninguna transición o no se observó ya ningún pico en los termogramas aun con un tratamiento tan bajo como el de 45°C (Figura 5.22b). Es decir, el pico o transición que se observa en las células de *Salmonella* en estado VNC no tratadas o control, desaparece en las células tratadas, lo cual se relaciona con muerte de la bacteria. Un análisis de viabilidad mediante la técnica de cuenta directa viable efectuado a estas poblaciones de células en estado VNC tratadas, confirmó los resultados, es decir las células sometidos a los tratamientos térmicos se inactivaron o murieron a 45° C. Estos resultados sugieren que, a diferencia de *V. cholerae* O1, para *S. Typhimurium* el estado VNC no le confiere resistencia a la células, por el contrario el estado VNC la hace más sensible a la alta temperatura.

5.7. Efecto del hipoclorito en células en estado VNC

Para conocer ahora la sensibilidad o resistencia de las células de *V. cholerae* y *Salmonella* a otro factor antimicrobiano, se trabajó con hipoclorito de sodio, del cual se conoce ampliamente su efecto antimicrobiano, aun a tan bajas concentraciones como 2 ppm en agua potable (Fernández, 2000). Para estos estudios se trabajó tanto con células viables-cultivables como en estado VNC. En estos experimentos, se sometió a las células de *V. cholerae* y/o *Salmonella* al efecto de 2 concentraciones de hipoclorito: 5 y 10 ppm. Se incluyeron poblaciones controles de ambos microorganismos en los dos tipos de estados (viable-cultivable y VNC) las cuales no fueron tratadas con hipoclorito. Después de los tratamientos,

se realizó el análisis térmico de las células para conocer los posibles cambios estructurales provocados por dichos tratamientos. En la figura 5.23 se presentan los termogramas obtenidos para *V. cholerae* viable-cultivable; como observa, desde la concentración de 5 ppm las células empiezan a verse afectadas ya que en el termograma desaparecen las principales transiciones relacionadas con el ADN y las fracciones ribosomales, además de que por este tratamiento los picos disminuyen de altura, lo cual también se relaciona con daño o efecto sobre la estructura de la célula. Algo más acentuado ocurrió con el tratamiento de 10 ppm de hipoclorito de sodio (Figura 5.23); en donde los picos relacionados con las transiciones casi han desaparecido. Al realizar la cuenta en placa de estas células viables-cultivables tratadas tanto con 5 ppm como a 10 ppm, se observó que al menos el 1 % de la población permaneció viable-cultivable al formar colonias en el medio de cultivo, lo cual ya no ocurrió en las tratadas con 10 ppm de hipoclorito. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura en donde se describe que concentraciones de hipoclorito tan bajas como 2 ppm pueden tener un efecto bactericida letal (Fernández, 2000). No obstante, cabe señalar que esto ocurre en agua potable y libre de materia orgánica; ya que también es bien sabido que conforme la concentración de bacterias se incrementa o existe presencia de materia orgánica en el agua, la efectividad del hipoclorito disminuye incrementándose la probabilidad de que parte de la población bacteriana sobreviva al tratamiento de desinfección (Fernández, 2000). Muy posiblemente por ello se observó sobrevivencia de una parte de la población de *V. cholerae* en el tratamiento de 5 ppm de hipoclorito.

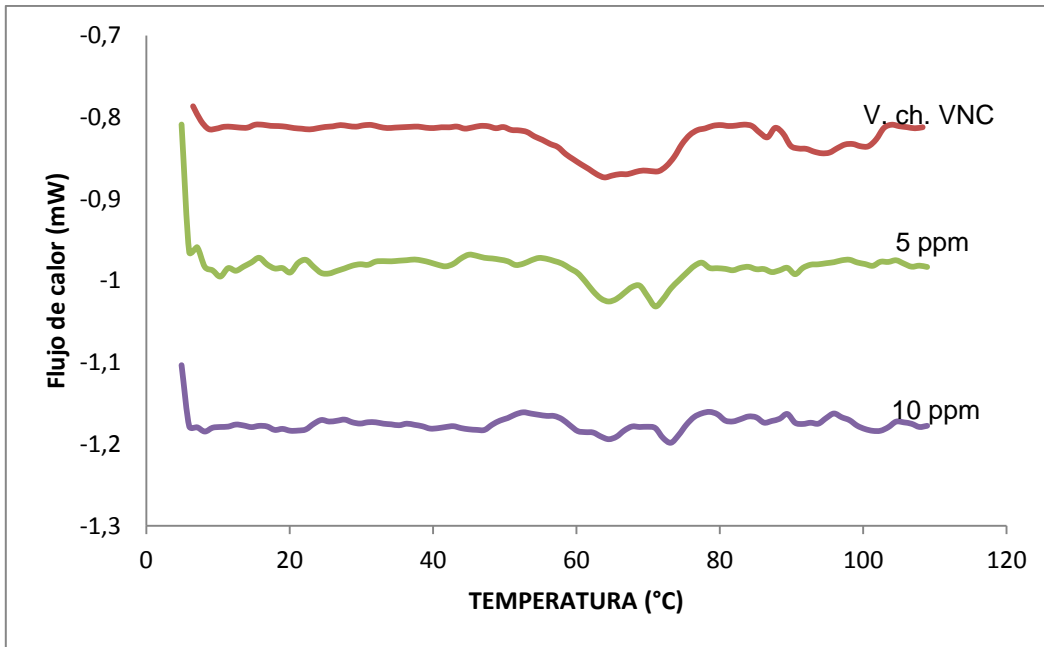


Figura 5.23. Efecto del hipoclorito en las células de *V. cholerae* en estado viable a 5 ppm y 10 ppm.

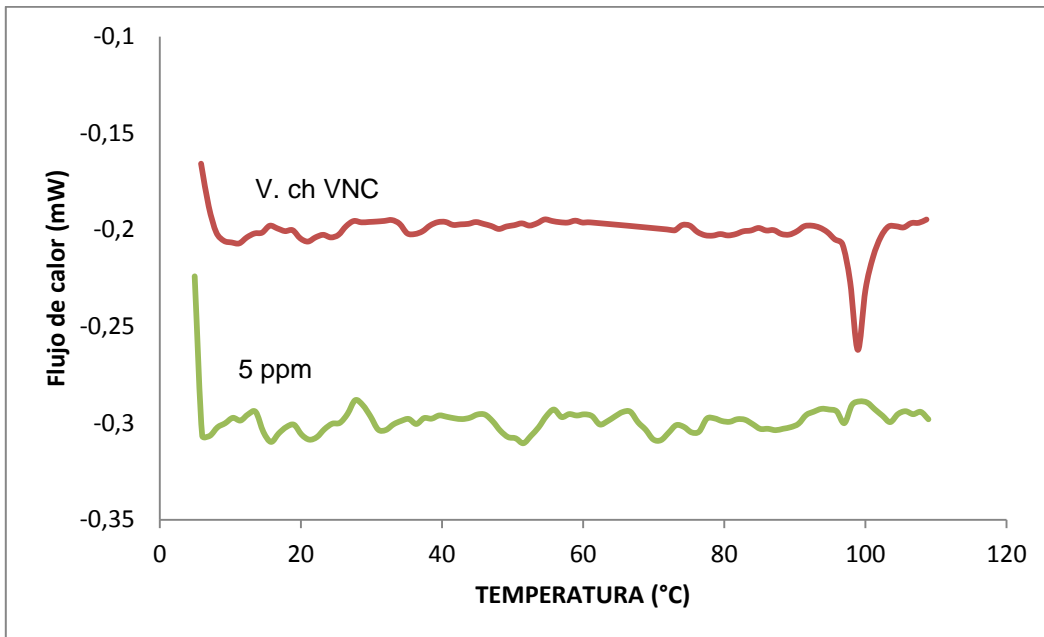


Figura 5.24. Efecto del hipoclorito en las células de *V. cholerae* en estado viable no cultivable a 5 ppm y 10 ppm.

Por otro lado, cuando las células de *V. cholerae* en estado VNC fueron sometidas a las mismas concentraciones de hipoclorito, desde la concentración de 5 ppm se provocó un gran efecto en la estructura de la célula de tal manera que desapareció el pico en el termograma, o bien, ya no se observaron transiciones de fases en estas células tratadas (Figura 5.24); lo cual se puede relacionar con muerte de la bacteria. Un análisis de viabilidad mediante la técnica de cuenta directa viable efectuado a estas poblaciones de células en estado VNC tratadas con hipoclorito, confirmó los resultados, es decir las células tratadas con 5 ppm de hipoclorito se inactivaron o murieron. Estos resultados sugieren que dicho estado no le confiere resistencia a las células *V. cholerae* contra el hipoclorito de sodio, por el contrario al parecer tal estado la hace más sensibles al hipoclorito.

Con respecto a *Salmonella* se observó un efecto similar al ocurrido para *V. cholerae*. El hipoclorito tuvo efecto sobre la viabilidad de células viables-cultivables de *Salmonella*; desde una concentración de 5 ppm de hipoclorito las células se ven afectadas desapareciendo la transición correspondiente al ADN y las transiciones de las fracciones ribosomales se ven disminuidas, mientras que para 10 ppm muestra una mayor afectación provocando la degradación en su mayor parte de las fracciones ribosomales (Figura 5.25). No obstante, al igual que para *V. cholerae*, al realizar la cuenta en placa de estas células viables-cultivables tratadas con 5 ppm, se observó que al menos el 1 % de la población permaneció viable-cultivable al formar colonias en el medio de cultivo, lo cual ya no ocurrió en las tratadas con 10 ppm de hipoclorito.

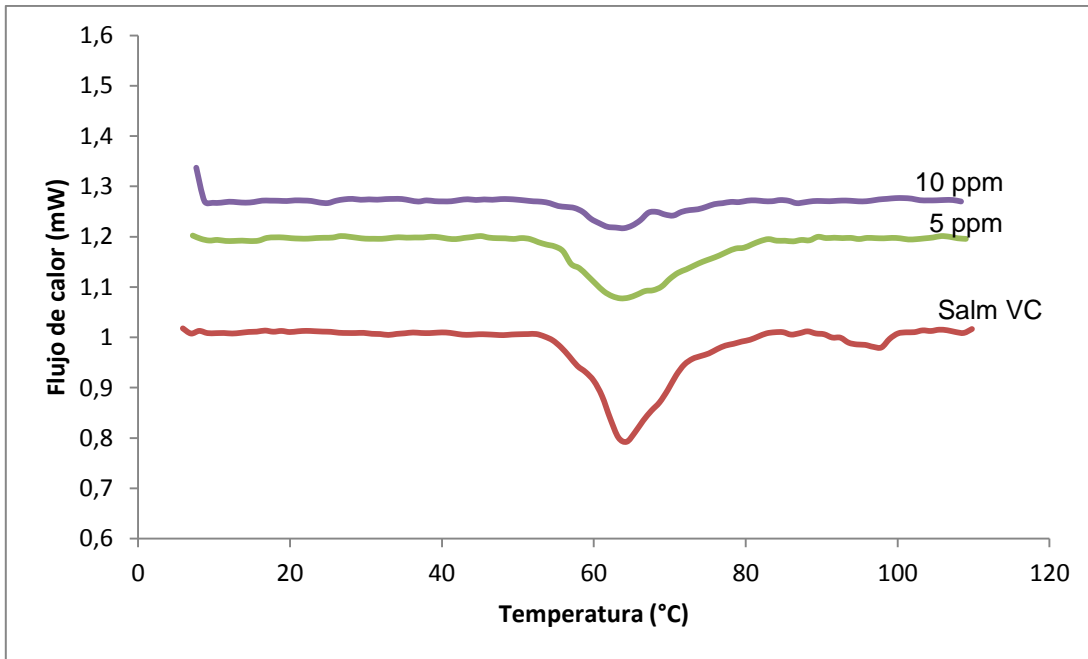


Figura 5.25. Efecto del hipoclorito en células de *S. typhimurium* en estado viable con 5 ppm y 10 ppm

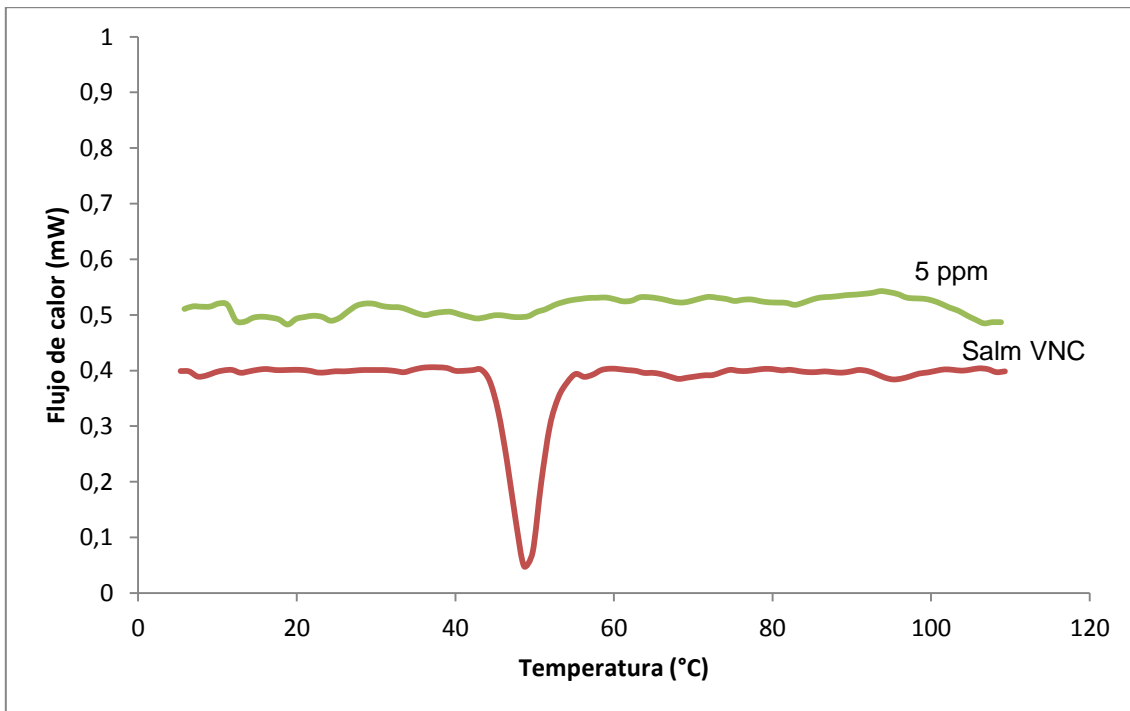


Figura 5.26. Efecto del hipoclorito en células de *S. typhimurium* en estado viable no cultivable con 5 ppm y 10 ppm

Finalmente, cuando las células de *Salmonella* en estado VNC fueron sometidas a las mismas concentraciones de hipoclorito, desde la concentración baja de 5 ppm ya no se observaron transiciones de fases en los termogramas de estas células tratadas (Figura 5.26); lo cual se relaciona con muerte de la bacteria. Un análisis de viabilidad mediante la técnica de cuenta directa viable efectuado a estas poblaciones de células en EVNC tratadas con hipoclorito, confirmó los resultados, es decir las células tratadas tanto con 5 ppm como 100 ppm de hipoclorito se inactivaron o murieron. Estos resultados siguieron que dicho estado no le confiere resistencia a las células *S. Typhimurium* contra el hipoclorito de sodio, por el contrario al parecer tal estado la hace más sensibles al hipoclorito.

6. Conclusiones

1. Se logró estandarizar la técnica de DSC para el estudio térmico de células bacterianas; las condiciones más adecuadas fueron el uso de crisoles de aluminio, vel. 5°C/min, peso promedio de 10 mg.
2. Con la técnica de DSC es posible monitorear la viabilidad o actividad metabólica de las bacterias.
3. La espectroscopia de IR mostro que las estructuras afectadas cuando las bacterias entran al estado VNC se encuentran principalmente en la región I que (3400-3000) relacionadas con amidas A y el péptidoglucano que forma parte estructural de pared celular, así como la región 2 (1700-1600) debidas a amidas I provenientes de proteínas.
4. Con la técnica de IR se pudo evidenciar la producción de CO₂ en las células en estado VNC lo que refuerza los datos obtenidos con la técnica directa viable de que tales células no cultivables se encuentran viables.
5. El estado viable no cultivable le confirió protección a las células de *V. cholerae* contra elevadas temperaturas (55°-70° C).
6. El estado viable no cultivable hizo más sensible a las células de *S. Typhimurium* contra elevadas temperaturas (55°-70° C).
7. El estado viable no cultivable no afectó la resistencia térmica natural de *Escherichia coli* contra elevadas temperaturas (55°-70° C).
8. La técnica de DSC fue posible evaluar el efecto del hipoclorito de sodio en las células bacterianas.

9. El estado VNC no confirió resistencia a las células de *S. Typhimurium* o *V. cholera* al efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio, por el contrario las hizo más sensible.

7. Bibliografía

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

Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu, and G. Kaletunc,. 2003. Evaluation of differential scanning calorimetry of high hydrostatic pressure sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Int. J. Food Microbiol.* 87:229–237.

Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Al-Holy, M,A., Rasco, B.A. 2008. Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Absorbance Spectroscopy and Multivariate Analysis To Study the Effect of Chlorine-Induced Bacterial Injury in Water. *J. Agric. Food Chem.* DOI:10.1021/jf801604p

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. 1975. Diagnóstico de laboratorio de cólera. *Boletín OPS. Organización Panamericana de Salud.* 78: 161-171.

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

Baker, R.M., Singleton, F.L. and Hood, M.A. 1983. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 930-940.

BAM. Bacteriological Analytical Manual, 1998. 8th Edition, Revision A. In: *Methods for Specific Pathogens* .Chapter 4. Revision September 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Chapter 4a. Revision July 2009 Diarrheagenic *Escherichia coli* (Disponible en línea en :<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>) (consultado el 10 de Febrero de 2010).

Baumann, P. y 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.

Bayles, D.O., Tunick, HM., Foglia, T.A., Miller, A.J. 2000. Cold shock and its effect on ribosomes and thermal tolerance in *listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology.* 46(10):4351–4355

Belaich A, Belaich JP (1976a). Microcalorimetric study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: Thermograms in a synthetic medium. *J. Bacteriol.* 125:14-18.

Belaich A, Belaich JP (1976b). Study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: measurement of the affinity of whole cells for various energy substrates. *J. Bacteriol.* 125:19-24.

Belliveau, B. H., T. C. Beaman, H. S. Pankratz, and P. Gerhardt. 1992. Heat killing of bacterial spores analyzed by differential scanning calorimeter. *J. Bacteriol.* 174:4463–4474.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1994. 9th Edition. Edited by John G. Holt. Copyright 1994. Williams & Wilkins, Baltimore.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005. Volume 2. The Proteobacteria. Garrity, George M. (Ed.). 2nd ed., 2005, p. 2816. Originally published by Williams & Wilkins, 1984. Black, R.E. 1986. Cholera: 242-246. En Last, J.M. (ed). Public Health and preventive Medicine. 12th ed. Appleton-Century-Crofts.

Birou, B., Marison, I.W., Con Stockar U. 1987. Calorimetric investigation of aerobic fermentation. *Biotech. Bioeng.* 30:650-660.

Boe, I. and R. Lovrien. 1990. Cell Counting and Carbon Utilization Velocities via Microbial Calorimetry. *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1):1-7.

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.

Bouma MJ, Pascual M (2001) Seasonal and interannual cycles of endemic cholera in Bengal 1891–1940 in relation to climate and geography. *Hydrobiologia* 460:147–156.

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

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

Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B., Daniels, A.U. 2010a. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett* 303:1–8.

Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B., Daniels, A.U. 2010b. Biomedical use of isothermal microcalorimeters. *Sensors.* 10:9369-9383.

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.

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

Cerna, C. J. F. 2003. Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarreogénicos, en niños menores de cinco años hospitalizados con diarrea aguda, en la cd. de México. Tesis de Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Biomedicina Molecular. pp 9-11.

Chowdhry, B.Z. and Cole, S.C. 1989. Differential scanning calorimetry: applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 7:11-18.

Chowdhury, M.A.R., Montilla, R.R., Quintero, E.J., Huq, A., Mangel, T., Xu, B., Hasan, A.K. and Colwell, R.R. 1995. Cellular changes and serogroup 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 vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science.* 198: 394-396.

Colwell, R.R., Seidler, R. J., Kaper, J., Joseph, S.W., Garges, S., Lockman, H., Maneval, D., Bradford, H., E., Huq, I, y Huq, A. 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 555-558.

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.* 3: 817-820.

Colwell RR (1996) Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. *Science* 274:2025–2031.

Colwell RR, y col. (2003) Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1051–1055.

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

Dermoun Z, Belaich JP (1979). Microcalorimetric study of *Escherichia coli* Aerobic Growth: Kinetics and Experimental Enthalpy Associated with Growth on Succinic Acid. *J. Bacteriol.* 140:377-380.

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

Edwards PR, Ewing WH. *Identification of enterobacteriaceae* 1972; Cambridge University Press p.164

Fernandez Escartín, E. 2000. *Vibrio cholerae*. pp: 347-364. En: *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Feachem, R.G., Miller, C. and Drasar, B. 1981. Environmental aspects of cholera epidemiology II. Occurrence and survival of *Vibrio cholerae* in the environment. *Trop. Dis. Bull.* 78: 865-880.

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

Goodacre, R.; Timmins, E. M.; Rooney, P. J.; Rowland, J. J.; Kell, D. B. 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 233–239.

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: 161-165.

Gupte, A. R., de Rezende, C. L. E., y Joseph, S. W. 2003. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104†. *Appl. Environ. Microbiol.* 69.11:6669–6675

Hasan, J.A.K., Chowdhury, M.A.R., Shahabuddin, M., Huq, A., Loomis, L. and Colwell, R.R. 1994. Cholera toxin gene polymerase chain reaction for detection of non-culturable *Vibrio cholerae* O1. *World J. Microbiol and Biotech.* 10 : 568-571. 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

Hasan, J.A.K., Huq, A., Nair, G.B., Garg, S., Mukhopadhyay, A.K., Loomis, L., Bernstein, D. and Colwell, R.R. 1995. Development and testing of monoclonal antibody-based rapid immunodiagnostic test kits for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2935-2939

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.

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.

Hohne, G.W.H., Hemminger, W. and Flammersheim, H.-J. 1996. *Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners*. Berlin; New York: Springer-Verlag.

Honglin, Z., L. Yongjun, and S. Haitao. 1993. Determination of thermograms of bacterial growth and study of optimum growth temperature. *Thermochimica Acta*, 216: 19-23.

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.

Hoyos, C. D., Agudelo, P. A.; Webster, P. J; Curry J. A. (2006). Deconvolution of the factors contributing to the increase in global hurricane intensity. *Science* 312(5770):94-97.

Huq, A. y 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. y 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, H. T., A. Murray., M. Johns., O. C. Gill, and M. L. McMullen. 2006. Differential expression of proteins in cold-adapted log-phase cultures of *Escherichia coli* incubated at 8, 6 or 2 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 107:12-19.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2007a). *Climate change 2007: climate change impacts, adaptation and vulnerability*. Working Group II contribution to the fourth assessment report of the IPCC. Geneva, Switzerland: IPCC.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2007b). *Climate change 2007: the physical science basis*. Working Group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC. Geneva, Switzerland: IPCC.

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

Kaletunç, G. 2001. Thermal analysis of bacteria using differential scanning calorimetry. In *Novel Process and Control Technologies in the Food Industry* ed. Bozoglu, F., Deak, T. and Ray, B. pp. 227-235. IOS press: Amsterdam.

Kaletunc, G., Lee, J., Alpas, H., Bozoglu F. 2004. Evaluation of Structural Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. Applied And Environmental Microbiology, Vol. 70, No. 2, p. 1116-1122.

Kasper J. B., J. P. Natarro and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Natural Reviews Microbiology, 2(2): 123-140. 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.

Kayser, C.A., Tamplin, M.L. and Twedt, R.M. 1992. Vibrio: 451 - 473. In Vanderzant, C. and Splitstoesser, D.F. (Eds.). Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. 1992. 3rd Edition. APHA. Washington, DC

Kjelleberg, S. and Hermansson, M. 1984. Starvation induced effects on bacterial surface characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 48: 497-503.

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.

Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. 1979a. A tentative direct microscopic method for counting living bacteria. Can. J. Microbiol. 25: 415-420.

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.

Kobanova N, Stulova I, Vilu R (2012). Microcalorimetric study of growth of bacterial colonies of Lactococcus lactis IL 1403 in agar gels. Food Microbiol. 29:67-79.

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.

Lasch P, Naumann D. (1998). FT-IR Microspectroscopic Imaging of Human Carcinoma Thin Sections Based on Pattern Recognition Techniques. Cellular and Molecular Biology. 44(1). 189-202

Lederberg, J. 2004. E. coli K-12. Microbiology Today, 31:116.

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

Lee, J., and G. Kaletunc,. 2002b. Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5379–5386.

Lee, J., and G. Kaletunc,. 2010. Inactivation of *Salmonella enteritidis* strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 140:49–56

Lepock, J. R., H. E. Frey, and W. E. Inniss. 1990. Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: relationship to protein denaturation *in situ* to maximum growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1055:19–26.

Linder, K. y 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.

Lipp EK, Huq A, Colwell RR (2002) Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. *Clin Microbiol Rev* 15:757–770.

Lobitz B, y col. (2000) Climate and infectious disease: Use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1438–1443.

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., C. A. Miles, S. E. Parsons, and D. A. Seymour. 1991. Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2361–2374.

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

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.

Marison, I. W. and U. von. Stockar. 1985. A Novel Bench-Scale Calorimeter for Biological Process Development Work. *Thermochimica Acta*, 85: 493-496.

Maskow, T., Wolf, K., Enders, S., Harms, H. 2012. Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry. *Thermochim. Acta.* 543:273-280.

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

McCann, M.P., Kidwell, J. and Matin A. 1992. Microbial starvation survival, genetics. In: Encyclopedia of microbiology. Vol. 3. pp. 159-170. Academic Press, Inc.

Mekalanos, J. J., Rubin, J.E., Waldor, K. M. 1997. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. FEMS Imm. Med. Microbiol.

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

Mohacsi-Farkas, Cs., Farkas, J., Meszaros, L., Reichart, O. and Andrassy, E. 1999. Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. J. Therm. Anal. Calor. 57:409-414.

Montville, J. T. and R. K. Matthews. 2005. Food Microbiology an introduction. ASM Press. American Society for Microbiology, Washington D.C. Capitulo 2 y 9. p. 11-28 y p.111-127.

Mooi, F.R. and Bik, E.M. 1997. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. Trends Microbiol. 5: 161-165.

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

Morita, R.Y. 1992. Low-nutrient environments. In: Encyclopedia of microbiology. Vol. 2. pp. 617-624.. Academic Press, Inc.

Morris, Jr, J.G., M.B. Szein, E.W. Rice, J.P. Nataro, G.A. Losonsky, P. Panigrahi, C.O. Tacket, and J.A. Johnson. 1996. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. J. Infect. Dis. 174: 1364-1368.

Naumann, D., Labischinski, H., Giesbrecht, P. 1991. 'The Characterization of Microorganisms by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT/IR)', in Modern Techniques for Rapid Microbiological. Analysis, ed. W.H. Nelson, VCH, New York, 43–96,

Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. R.A: Meyers (Ed.). Encyclopedia on analytical chemistry. John Wiley & Son Ltd, Chichester. pp. 102-131.

Nguyen, H.T.T., Corry, J.E.L., Miles, C.A. 2006. Heat Resistance and Mechanism of Heat Inactivation in Thermophilic *Campylobacters*. Appl. Environ. Microbiol. 72(1):908-913.

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.

Niven, G. W., C. A. Miles, and B. M. Mackey. 1999. The effect of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology* 145:419–425.

NRC (National Research Council). 2001. *Under the weather: climate, ecosystems, and infectious disease*. Washington, DC: National Academy Press.

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *The journal of microbiology*. 43:93-100.

Pascual M, Bouma MJ, Dobson AP (2002) Cholera and climate: Revisiting the quantitative evidence. *Microbes Infect* 4:237–245.

Pascual, A. M. R. and P. V. Calderón. 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Segunda edición. In: Investigación y recuento de *Escherichia coli*. Editorial Días de Santos, S.A. Madrid, España. p. 21.

Perez-Miravete, A. 1973. Behaviour of micro-organisms: based on the proceedings of the 10th International Congress of Microbiology held in Mexico City. Congreso internacional de microbiología. London: Plenum Press

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

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

Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, Chowdhury, M.A.R. y 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. y Colwell, R.R. 1994. Methionine Uptake and cytopathogenicity of viable but noncuturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3573-3578.

Ravel, J., Knigt, 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.

Rice, E.W., C.J. Johnson, R.M. Clark, K.R. Fox, D.J. Reasoner, M.E. Dunnigan, P. Panigrahi, J.A. Johnson, and J.G. Morris, Jr. 1992. Chlorine and survival of “rugose” *Vibrio cholerae*. *Lancet.* 340: 740.

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.

Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44:464-475.

Rogers, R., Cuffe, R. and Cossins, Y. 1980. The Queensland cholera incident of 1977; II the epidemiological investigation. *Bull. World Health Org.* 58: 665-669.

Roszak, D.B., Grimes, D.J. y Colwell, R.R. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30(3): 334-338

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

Ruiz-Moreno D, Pascual M, Bouma M, Dobson A, Cash B (2007) Cholera seasonality in Madras (1901–1940): Dual role for rainfall in endemic and epidemic regions. *Ecohealth* 4:52–62.

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.

Secretaria de Salud. 1994. Situación del cólera en México. Boletín Cólera/Diarreas infecciosas. México.

Schilling, A. T. 2008. The Effect of pH on the Bacterium *E. coli*. Project Number J1429. California State Science Fair. Project Summary. Ap2/08.

Schultz, C.P., Eysel, H. H., Mantsch, H. H., Jackson, M. 1996. Carbon dioxide in tissues, cells, and biological fluids detected by FTIR spectroscopy. *J. of Phys. Chem.* 100 (16), 6845-6848

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.

Shultz, L.M., Rutledge, J.E., Grodner, R.M. and Biede, S.L. 1984. Determination of the thermal death time of *Vibrio cholerae* in blue crabs (*Callinectes sapidus*). *J. Food Prot.* 47: 4-6.

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.

Sjogren, R.E. and Gibson, M.J. 1981. Bacterial survival in a dilute environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1331-1336.

- Smigielski, A.J., Wallace, B. and Marshall, K.C. 1990. Genes responsible for size reduction of marine vibrios during starvation are located on the chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1645-1648.
- Steim, J.M., Tourtellote, M.E., Reinert, J.C., McElhaney, R.N. and Rader, R.L. 1969. Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 63:104-109.
- Stephens, P. J., and Jones, M. V. 1993. Reduced ribosomal thermal denaturation in *Listeria monocytogenes* following osmotic and heat shocks. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:177-182.
- Stroeher, U.H., Karageorgos, L.E., Morona, R. and Manning, P.A. 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2566-2570
- 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 Molin, S. 1996. Role of ribosome degradation in the death of heat-stressed *Salmonella Typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142:155-160.
- Torres-Vitela, M.D.R., Gómez Aldapa, C.A., Cerna-Cortes, J.F., Villarruel-López, A., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J. 2013. Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology.* 56(3):180–185.
- Tunick, M. H. , Bayles D. O., Novak, J. S. 2006. Dsc analysis of foodborne bacteria. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 83(1): 23–26.
- 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.
- Van Alphen, L., Lugtenberg, B., Rietschel, E.T., Mommers, C. 1970. Architecture of the Outer Membrane of *Escherichia coli* K12 Phase Transitions of the Bacteriophage K3 Receptor Complex. *Eur. J. Biochem.* 101, 571 -579.
- Verrips, C. T., and R. H. Kwast. 1977. Heat resistance of *Citrobacter freundii* in media with various water activities. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4:225–231.
- Vidal, G. J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), una causa frecuente de diarrea infantil. Secretaria de Salud del estado de Tabasco, Villahermosa, México, Numero 001. *Salud en Tabasco,* 9:188-193.

Von, A. U., Wirz, D., Daniels, A.U. 2009. Isothermal microcalorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 9:106.

Von Stockar U. and W. I. Marrison. 1989. The Use of Calorimetry in Biotechnology. *In: Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology. Vol 40.* Fiechter, A. M. 95, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 106, 115, 131, 132.

Von Sockar, U., van der Wieler, L.A.M. 1997. Thermodynamics in biochemical engineering. *J. Biotechnol.* 59:25-37.

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.

Wai, S.N., Y. Mizunoe, A. Takade, S.I Kawabata, and S.I. Yoshida. 1998. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3648-3655.

Wandiga, S. O. (2006). Climate Change Induced Vulnerability to Malaria and Cholera in the Lake Victoria Region A Final Report Submitted to Assessments of Impacts and Adaptations to Climate Change (AIACC), Project No. AF 91. Published by The International START Secretariat, pp 90.

White, P.B. 1938. The rugose variant of *Vibrios*. *J. Pathol. Bacteriol.* 46: 1-6.

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.

Yi, L., Than, T. T., Zhong, C., Songsheng, Q., Ping, S. 2000. Microcalorimetric studies on the metabolism of *Clorella vulgaris*. *Chemosphere* 40:845-849.

Zhang H, Lin Y, Sun H (1993). Determination of thermograms of bacterial growth and study of optimum growth temperature. *ThermochimActa*, 216: 19-23.

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.