

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE QUIMICA



EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y CLORURO DE SODIO EN LA
SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO DE CEPAS DE *Vibrio cholerae*
AISLADAS EN EL PAIS

TESIS QUE PRESENTAN:

FABIGLA MORENO SANCHEZ

MARITZA TORRES LOZANO

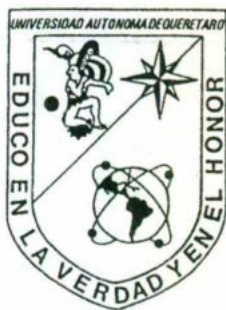
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO EN ALIMENTOS

Querétaro, Qro, Mayo de 1994



J50220

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE QUIMICA



EFECTO DE LA TEMPERATURA Y CLORURO DE SODIO EN LA
SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO DE CEPAS DE *Vibrio cholerae*
AISLADAS EN EL PAIS

TESIS QUE PRESENTAN:

FABIOLA MORENO SANCHEZ
MARITZA TORRES LOZANO

PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO EN ALIMENTOS

FACULTAD DE
QUIMICA



Querétaro, Qro. Mayo de 1994

BIBLOTECA

GRACIAS ...

A DIOS

POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SEGUIR CON VIDA.

A MIS PADRES

*POR SU AMOR, APOYO Y CONFIANZA
QUE ME HAN BRINDADO DURANTE TODA MI VIDA.*

A MIS HERMANOS

*ARTURO, SALVADOR, SUSANA Y LUPITA
POR SU CARIÑO Y APOYO DE SIEMPRE.*

A MIS AMIGAS

POR ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS.

A MIS COMPAÑEROS Y MAESTROS

*POR TODO LO QUE DE ELLOS APRENDI, EN ESPECIAL
AL DR. ESCARTIN Y A LA MAESTRA JOSY
POR SUS ENSEÑANZAS Y CONSEJOS
QUE ME SERVIRAN DURANTE TODA MI VIDA.*

A JORGE

POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL.

A MARITZA

*POR EL GRAN EQUIPO QUE FORMAMOS
PARA REALIZAR NUESTRA TESIS*

... Y ASI TERMINAR UNA ETAPA MAS DE MI VIDA.

FABIOLA

DEDICO ESTE TRABAJO,

CULMINACION DE MI PREPARACION PROFESIONAL...

A DIOS,

QUE ME AMO Y APOYO EN TODO MOMENTO

A TRAVEZ DE MIS PADRES:

ALICIA Y ARMANDO,

QUE ME ACOMPAÑO Y ALEGRO EL CAMINO

CON LAS BROMAS Y CARINO DE MIS HERMANOS:

CELINA, ARMANDO Y CESAR,

QUE ME EDUCO

CON LA SABIDURIA DE MIS PROFESORES,

QUE ME GUIO EN ESTE TRABAJO

CON LA EXPERIENCIA DE MIS ASESORES:

DR. ESCARTIN Y M en C. JOSEFINA S.,

QUE ME ALIGERO LA CARGA

CON EL APOYO DE MIS AMIGOS, ESPECIALMENTE:

FABIOLA,

QUE ME BENDIJO

CON LA VIDA.

MARITZA

INDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
JUSTIFICACION	
OBJETIVOS	
GENERALIDADES	
II. MATERIALES Y METODOS	14
MATERIALES	
METODOS	
III. RESULTADOS Y DISCUSION	30
RESULTADOS	
DISCUSION	
IV. CONCLUSIONES	106
V. BIBLIOGRAFIA	108

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

El agua es uno de los vehículos más importantes en la transmisión del cólera. A partir de la materia fecal de los enfermos, el *Vibrio cholerae* debe contaminar y sobrevivir en el agua. La sobrevivencia está determinada por factores externos (temperatura, composición del agua) y por ciertas características del microorganismo (tolerancia a factores ecológicos). Como otras bacterias el *Vibrio cholerae* tiene un perfil de resistencia propio; bajo el efecto de diversos factores ambientales puede mostrar cambios significativos que le permitan adaptarse a nuevas condiciones del medio.

La pandemia actual ha incursionado en países y regiones con variadas condiciones ecológicas. Consideramos de interés investigar la susceptibilidad a diferentes factores, de cepas que se han aislado en el país durante los recientes brotes de cólera. La información obtenida podría contribuir a diseñar medidas más eficaces para la prevención y control de la enfermedad en nuestro país. Actualmente las acciones de control se basan en estudios realizados principalmente en países asiáticos donde las condiciones ambientales pueden ser diferentes.

Es posible que entre las cepas aisladas de diferentes regiones en nuestro país se hayan generado cambios en las características fisiológicas del microorganismo. Por tal razón se incluyen en este estudio cepas aisladas de casos humanos de diferentes estados, una cepa recuperada del medio ambiente y dos cepas provenientes de otros países.

OBJETIVOS

1. Estudiar la cinética de desarrollo en caldo soya tripticaseína a 35° de diferentes cepas de *Vibrio cholerae* O1 recuperadas de casos humanos y el medio ambiente en México y otros países.
2. Evaluar la sobrevivencia de las cepas a la congelación en agua para bebida a -15° y a la ebullición, tanto en agua para bebida como en caldo soya tripticaseína.
3. Evaluar la tolerancia de las cepas al cloruro de sodio en caldo soya tripticaseína

GENERALIDADES

Las actividades de los microorganismos pueden verse afectadas intensamente por las condiciones químicas y físicas de sus ambientes. El conocimiento de estos efectos nos ayuda a explicar su distribución en la naturaleza, y en muchos casos a diseñar métodos tendientes a controlar su actividad, o bien para destruirlos cuando se trata de organismos indeseables. No todos responden igualmente a un factor ambiental dado. De hecho, algunas condiciones que pueden ser extremadamente perjudiciales para un organismo pueden ser beneficiosas para otro. Sin embargo, los organismos pueden tolerar ciertas condiciones adversas bajo las cuales no pueden crecer, y por tanto, debemos distinguir entre los efectos de esas condiciones sobre la viabilidad de un organismo y sobre su crecimiento, diferenciación y reproducción.⁽¹⁾

La resistencia de las bacterias a las diversas condiciones ambientales explican, ya en el medio natural, hechos y mecanismos relevantes en la transmisión de las enfermedades que provocan. De la misma manera, estos hechos pueden ser aplicables en la lucha contra esas enfermedades, o sea para la profilaxis, ya que suministran fundamentos técnicos para la desinfección y esterilización.⁽²⁾

Cuando las bacterias se exponen a un agente físico o químico hostil para su supervivencia, la muerte no se presenta de modo instantáneo y simultáneo en toda la población. La velocidad con que muere un organismo determinado, en condiciones uniformes, sigue una relación definida que puede establecerse de antemano. Independientemente de la magnitud de la población inicial, y en las mismas condiciones, el número de organismos se reduce en la misma proporción durante cada periodo igual de tiempo.

Los diversos procedimientos y sustancias con efecto antimicrobiano generalmente manifiestan su actividad a través de un mecanismo específico. Es importante, tanto por razones teóricas como prácticas, tener idea de como son inhibidos o destruidos los microorganismos. El conocimiento del modo de actuar de un agente determinado, permite predecir las condiciones en que será más eficaz, así como su espectro antimicrobiano. Se ha desarrollado un gran esfuerzo en la investigación para determinar el lugar específico de acción de diversos agentes. Estas investigaciones son complicadas, por el hecho de que cuando una célula se expone a un agente letal pueden observarse muchas alteraciones. El problema fundamental consiste en establecer dónde se produce la acción nociva inicial por el agente causante del trastorno general de los procesos vitales.

En forma general, pueden examinarse los lugares posibles de acción del agente bacteriano considerando algunas propiedades de la célula microbiana. El protoplasma de la célula viva normal se encuentra en estado coloidal. Dentro de la región protoplasmática se localiza una multitud de enzimas que catalizan los procesos vitales de la célula. La membrana semipermeable (membrana citoplásmica) mantiene la integridad del contenido celular, y además, regula el intercambio de sustancias entre la célula y el medio externo, y es el lugar de acción de algunas reacciones enzimáticas. La pared celular íntegra proporciona una cubierta protectora a la célula, y participa también en determinados procesos fisiológicos. La acción nociva de cualquiera de estos niveles -por ejemplo, alteración del estado físico del protoplasma, inactivación de enzimas, o modificaciones en la membrana citoplásmica o de la pared celular- puede iniciar los trastornos que conduzcan a la muerte de la célula.⁽³⁾

La temperatura es una de los factores ambientales más importantes que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. Puede afectar a los organismos vivos de cualquiera de estas dos maneras opuestas: 1) Cuando aumenta la temperatura las reacciones químicas y enzimáticas de la célula se producen a un ritmo más rápido y el crecimiento se acelera. 2) Las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares son sensibles a las altas temperaturas y se pueden inactivar irreversiblemente ⁽¹⁾. La acción bactericida de las temperaturas

elevadas involucra efectos enzimáticos adversos como la debilitación de la actividad de la catalasa, de las oxidasas y de las deshidrasas, de la desnaturalización de las proteínas y daño en la membrana celular ⁽⁴⁾. Otros efectos son, por ejemplo, la coagulación proteínica, las interacciones de los pares de bases en los ácidos nucleicos se rompen, y los lípidos se disuelven y desaparece su asociación normal interna con las proteínas de las membranas celulares. La coagulación proteínica probablemente sea la causa principal de la muerte celular ⁽⁵⁾. Pueden existir, por supuesto, diferentes mecanismos en organismos distintos, o incluso en el mismo organismo a distintas temperaturas ⁽¹⁾. El ritmo de muerte depende del tiempo y de la temperatura ⁽⁵⁾. La muerte por calor es una función exponencial y se produce más rápidamente conforme aumenta la temperatura. El tamaño del inóculo no afecta la velocidad de muerte, pero naturalmente afecta el tiempo requerido para la esterilización, puesto que cuanto mayor es el número de organismos más tiempo se necesita para inactivarlos a todos ⁽¹⁾.

La congelación de las bacterias puede ser mortal. Sin embargo, en general, la congelación tiene significado práctico por su carácter bacteriostático. La criobiología, estudio de los efectos del frío sobre materiales biológicos, es un campo de estudio relativamente nuevo. Los estudios sobre conservación y destrucción celulares sólo constituyen un aspecto de la criobiología. ⁽⁵⁾

Diversas variables influyen en lo que ocurre a la célula cuando se congela. Influyen la propia célula, el ritmo de congelación, la rapidez de descongelación, la temperatura de almacenamiento en estado congelado, y el medio donde están suspendidas las células. Cuando las células se enfrían por debajo del punto de congelación del citoplasma generalmente superior a -1° , no se congelan inmediatamente. Quedan superenfriadas hasta -10° a -15° , incluso cuando en el exterior hay hielo. Por lo tanto, la presión de vapor del agua es mayor internamente que externamente. Intervienen dos procesos para equilibrar las presiones de vapor interna y externa. O bien el agua se congela dentro de la célula, o se desplaza saliendo de la célula hacia el medio externo. Lo primero origina deshidratación por formación de cristales de hielo, lo último provoca deshidratación por desaparición del agua de la célula. La formación intracelular de cristales de hielo predomina cuando el enfriamiento es rápido, el enfriamiento lento reduce al mínimo la

formación de cristales de hielo. En ambos casos, los solutos se concentran y precipitan dentro de las células cuando se suprime el agua. La causa de la lesión celular durante la congelación todavía no está muy bien aclarada, se cree que la concentración de solutos durante la congelación produce lesión de las membranas, seguida de la lisis al venir la descongelación.

Además se considera que la formación de cristales de hielo rompe las membranas celulares. En general, un enfriamiento rápido es más lesivo que un enfriamiento lento.

La descongelación lenta ocasiona más lesión a una población celular que la descongelación rápida. Los cristales de hielo que se forman cuando las células se congelan rápidamente aumentan hasta volúmenes mayores durante la descongelación lenta y probablemente originan más trastorno físico. La descongelación lenta también suele ser nociva para las células congeladas lentamente, sin formación de cristales de hielo, pero el motivo de ello no está bien aclarado.⁽⁵⁾

A temperaturas bajas tiene lugar un decremento de los procesos metabólicos, la muerte de las bacterias a causa del envejecimiento e inanición y la destrucción de la célula a consecuencia de la formación de cristales al congelarse.⁽⁶⁾

En general, las células grandes son más sensibles a la congelación que las pequeñas, y las desprovistas de paredes celulares más sensibles que las que las poseen. Incluso en organismos que pueden soportar la congelación, generalmente mueren algunas células cuando se congela un cultivo. Si una célula sobrevive a la congelación inicial, puede permanecer viable en estado de congelación durante largos periodos de tiempo. Esto es realmente una situación de vida suspendida, ya que las funciones celulares están completamente interrumpidas solamente cuando se deshiela el cultivo puede recomenzar el metabolismo.⁽¹⁾

La tolerancia a la sal se puede apreciar en términos de actividad acuosa y presión osmótica. El agua es un disolvente esencial y se necesita para la mayoría de las reacciones bioquímicas en los sistemas vivos y la disponibilidad del agua tiene marcada influencia sobre los índices de

crecimiento microbiano. El agua destilada pura tiene una actividad acuosa (A_w) de 1.0. Sin embargo, los factores de adsorción y solución, pueden disminuir la A_w y así bajar su actividad. Por ejemplo, el agua puede ser bloqueada por un soluto y así hacerla inaccesible a los microorganismos. Debido a que las distintas concentraciones de soluto también afectan a la presión osmótica, el crecimiento de los microorganismos se puede ver también en términos de presión osmótica. Agregando sal (NaCl) a una solución se puede bajar la disponibilidad del agua. Las estructuras de las pared celular de las bacterias y otros microorganismos los hacen algo resistentes a los cambios de presión osmótica pero, los cambios exagerados en ésta dan como resultado la muerte de los microorganismos. Las grandes concentraciones de sal normalmente desorganizan los sistemas de transporte de las membranas y desnaturalizan las proteínas.

La reproducción de los microorganismos no sólo es afectada por la composición cualitativa del medio sino que también por la concentración de los distintos componentes en el medio. De manera intencional se pueden añadir al medio de cultivo sustancias que inhiban o prevengan el crecimiento de ciertos microorganismos en particular.⁽⁷⁾

El *Vibrio cholerae* pertenece a la familia Vibrionaceae, filogenéticamente cercana a las enterobacterias. En esta familia se incluyen tres géneros que son de importancia clínica: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Tiene más de 90 serogrupos, pero sólo el serogrupo O1 puede ocasionar cólera. Existen dos biotipos: Clásico y El tor, serológicamente indistinguibles. Dentro de cada biotipo hay tres serotipos, Inaba, Ogawa e Hikojima.

El biotipo Clásico induce manifestaciones clínicas más graves. Al biotipo El Tor se le ha relacionado más directamente con las últimas epidemias. Ambos elaboran la misma enterotoxina, el colerágeno, de tal forma que el cuadro clínico es semejante. Esta toxina es termolábil y se destruye a 56°.

El *Vibrio cholerae* es un bacilo aerobio, gram negativo, curvo, de extremos redondeados, en uno de los cuales tiene un flagelo que lo hace sumamente móvil. Miden de 0.5-0.8 μm de

ancho y 1.4-2.6 μm de largo. Presenta formas de involución en cultivos viejos o bajo condiciones de cultivo adversas. No forma endoesporas o microcitos.⁽⁴⁾

Las condiciones más favorables para el desarrollo de *Vibrio cholerae* incluye un pH entre 8.5 y 9.0; el organismo puede sobrevivir hasta un pH de 10, es muy lábil al pH ácido. La temperatura óptima para su crecimiento es entre 32 y 35°, pero podría hacerlo hasta 40°. No necesita considerables nutrientes para su crecimiento, salvo unos compuestos orgánicos como fuentes de carbono.⁽⁸⁾

Fermenta con formación de ácido, la glucosa, la levulosa, la galactosa, la maltosa, la sacarosa, la manita, el almidón y lentamente también la glicerina; no fermenta durante 48 horas la lactosa y coagula en forma variable la leche.⁽⁶⁾

Hay discordancia entre los autores sobre si produce o no sulfuro de hidrógeno y amoníaco, y si tiene actividad ureasa.⁽⁵⁾⁽⁹⁾⁽⁶⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

No produce hemolisina para los glóbulos rojos de caprinos y ovinos, pero sí hay digestión con transformación de la hemoglobina en metahemoglobina por lo cual las colonias aparecen rodeadas de una zona verdosa. La propiedad hemolisante ha permitido diferenciar entre los vibriones coléricos, no hemolíticos, y los paracoléricos hemolíticos, así como a las cepas El Tor productoras de una hemolisina soluble⁽¹¹⁾ y las que aglutinan los eritrocitos de pollo⁽¹⁰⁾.

Vibrio cholerae produce indol, es RM y VP negativos y reduce los nitratos a nitritos. Es rojo-cólera positivo (formación simultánea de indol y nitritos en medios adecuados, se manifiesta tras la adición de ácido sulfúrico una coloración roja debido a la transformación de los nitritos en amoníaco y oxígeno libre que favorece la oxidación de los aminoácidos y la producción de indol)⁽¹¹⁾. Es oxidasa y catalasa positivo.⁽¹²⁾

Crece bien en los medios comunes de laboratorio y rápidamente en agua peptonada. En caldo simple presenta ligera turbiedad, depósito pulverulento y gruesa película blanquecina que se rompe en fragmentos al agitar el medio. En agua peptonada (1% de peptona y 0.5% de NaCl) tiene un rápido crecimiento en seis a nueve horas, con formación de una película superficial constituida por vibriones fuertemente aerobios. En agar simple, forma colonias pequeñas de 1 a 2 mm, circulares, aplanadas, borde continuo, brillantes, translúcidas, ligeramente granulosas y de color amarillento. A los pocos días las colonias se rodean a veces de una zona estrecha, brillante, transparente y difusa.⁽¹¹⁾

El aislamiento del microorganismo en casos agudos de cólera, donde los vibriones se encuentran en un número elevado, no presenta problema, pero en casos de infecciones inaparentes, portadores sanos, agua contaminada ó agua de alcantarilla, es mucho más difícil⁽²⁵⁾. En estos casos, todo el conjunto de medios que son tan eficaces para el aislamiento de las Enterobacteriaceae es inadecuado, generalmente son inhibitorios. Se recomienda el llamado agar TCBS, el medio contiene tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa en una base de agar que está disponible en el comercio en forma deshidratada⁽⁹⁾. Tras 18 a 24 horas de incubación en TCBS, se pueden observar colonias amarillas lisas, de 2 a 4 mm de diámetro, con centro opaco y periferia transparente⁽¹⁰⁾. Este medio aunque es preferentemente selectivo para vibriones, permite crecer otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* o *Candida*⁽²⁾.

El agua peptonada alcalina es altamente recomendable como medio de enriquecimiento para la recuperación del *Vibrio cholerae*. El pH elevado del medio (8.4) inhibe el desarrollo de muchas bacterias comensales del intestino. Se aconseja el subcultivo en TCBS a las 12 a 18 horas para una óptima recuperación, ya que luego de una incubación prolongada comienzan a desarrollar otros organismos en el caldo de enriquecimiento⁽¹⁰⁾.

El *Vibrio cholerae* serogrupo O1 sobrevive por periodos de hasta siete días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados⁽⁴⁾; es intolerante a los ácidos y no atraviesa con facilidad la barrera del estómago normal⁽¹³⁾.

Es particularmente sensible a la desecación, si se seca una gota de caldo de cultivo sobre una laminilla todos los vibriones mueren en unas dos horas⁽⁵⁾, son destruidos rápidamente por los antisépticos químicos usuales y por la cloración del agua ⁽⁹⁾.

La susceptibilidad al calor no está bien establecida. En la bibliografía se reporta los siguientes datos: es destruido en 10 minutos a 55° ⁽⁵⁾⁽⁹⁾, muere en 15 minutos a 55° ⁽¹³⁾, el calor a 55° lo destruye en media hora ⁽¹¹⁾, una temperatura de 56° le mata en una hora y la de 100° instantáneamente ⁽²⁾ y a 80° en el término de 5 minutos ⁽⁶⁾.

Muere a las pocas horas en las muestras fecales a la temperatura de la habitación ⁽⁹⁾. En el intestino de las moscas sobrevive de 4-5 días ⁽⁶⁾. La temperatura, la humedad, la cantidad de materia orgánica, la concurrencia vital, etc., son factores que, como se comprende han de variar el resultado de las observaciones sobre la resistencia del vibrión colérico en la tierra⁽²⁾. Por ejemplo, en la tierra no sometida a la luz directa se conserva durante un mes o más ⁽¹¹⁾.

Los efectos de las bajas temperaturas en la sobrevivencia pueden ser variables⁽⁸⁾, por ejemplo, en las deposiciones sobrevive a bajas temperaturas durante un mes⁽⁶⁾. Ya que las especies del género *Vibrio* son psicrófilas, tienen la capacidad de crecer a 0°. Por otro lado, la congelación a temperaturas elevadas es más letal que a niveles menores. Por ejemplo, se dañan o matan más vibrios a temperaturas entre -2 y -10° que a -30° ⁽⁸⁾. Viven sólo tres o cuatro días cuando se congelan en hielo⁽⁹⁾.

El *Vibrio cholerae* sobrevive mejor en el agua que en los alimentos, dependiendo del pH, la temperatura, el grado de contaminación, las sustancias orgánicas presentes, la humedad, el contenido de sal y carbohidratos y la presencia de otras bacterias⁽⁸⁾, por ejemplo, vive hasta un mes en el agua de bebida, pero muere rápidamente en presencia de materia orgánica en abundancia⁽¹³⁾, en agua de mar puede permanecer viable hasta 10 a 13 días a temperatura ambiente y hasta 60 días en refrigeración⁽⁸⁾. Puede permanecer por más de siete días en la superficie de

frutas, vegetales, y carne bajo condiciones favorables, y más de tres semanas en pescados no acidificados y en mariscos⁽¹⁴⁾.

En presencia del cloruro de sodio, el *Vibrio cholerae* crece óptimamente hasta una concentración de 5 a 15 mM, pero crece también en ausencia de esta sal.⁽⁸⁾

El vibrión colérico posee un marcado enterotropismo, en virtud del cual, sea cualquiera la vía de inoculación que se utiliza, se dirige a la pared intestinal. Durante su paso a través de la pared intestinal desarrolla su actividad patógena, actuando de manera selectiva sobre el intestino delgado.⁽²⁾

El microorganismo se multiplica y produce toxina en el huésped. La motilidad puede estar relacionada con la adherencia de *Vibrio cholerae*, dado que las variedades inmóviles que producen toxina son incapaces de producir enfermedad.⁽⁴⁾⁽¹⁸⁾

La enterotoxina producida es una proteína denominada colerágeno que causa todos los trastornos fisiopatológicos del cólera. Está formada por dos subunidades, A y B⁽²¹⁾. La subunidad A está compuesta por una molécula A₁ que es la fracción tóxica y una molécula A₂ que une una molécula de A₁ a 5 subunidades B. Esta última une la toxina a un receptor (un gangliósido, glucolípido ácido) que se encuentra en la membrana de las células intestinales⁽¹⁹⁾⁽²²⁾. Una vez que la toxina se ha fijado actúa sobre la enzima adenilciclase⁽²³⁾⁽²⁴⁾ que cataliza la transformación de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Los mayores niveles de AMPc inducen a la célula a una activa secreción de iones hacia el lumen intestinal; para mantener el equilibrio osmótico, las células deben secretar líquido en el lumen, el cual se obtiene de todo el depósito líquido del organismo. En consecuencia, los pacientes pueden deshidratarse rápidamente.⁽⁴⁾

El periodo de incubación es corto; suele ser de tres a cinco días, pero puede ser tan breve como 24 horas. El orden de los acontecimientos parece ser el siguiente: los vibriones atraviesan

la barrera de la acidez gástrica en número suficiente para crear un foco de infección en el intestino delgado. Se elabora la enterotoxina, y el líquido y los electrolitos se pierden rápidamente con la intensa diarrea resultante. Esta reacción inicial a veces se denomina primera etapa de la enfermedad. Las heces con apariencia de agua de arroz, son de tipo trasudado, consistente de plasma sanguíneo menos proteína; contienen estrías de moco, células epiteliales descamadas y un número enorme de vibriones. Al persistir la pérdida de agua y bicarbonato, lo más notable es la deshidratación y la acidosis metabólica, de manera que la persona afectada cae en un estado de colapso. Esto es lo que se llama la segunda parte de la enfermedad, caracterizada por insuficiencia circulatoria, temperatura subnormal y anuria. La mucosa del intestino se conserva intacta. En raros casos la infección no produce diarrea pero origina la forma designada cólera seco, cuadro que es señal de intoxicación generalizada.⁽⁵⁾

El cólera es causado por la ingestión de células vivas de *Vibrio cholerae* O1. La infección puede presentarse en forma grave, de menor gravedad, e incluso sin síntomas. El microorganismo se elimina por las heces y la enfermedad se transmite por vía fecal-oral directa o indirectamente. El vehículo más importante es el agua para bebida⁽¹⁷⁾. Una diversidad de alimentos puede también ser medio de transmisión, especialmente en casos individuales.⁽¹⁵⁾

Las aguas contaminadas por desechos humanos son una fuente importante de propagación espacial de *Vibrio cholerae*. Los animales acuáticos, especialmente los animales marinos próximos a las costas se contaminan en el medio que contiene el agente. Las aguas residuales utilizadas para el riego de hortalizas y verduras son fuentes de propagación del agente⁽²⁰⁾. Los portadores asintomáticos también son agentes de propagación.

Las epidemias ocurridas en el pasado sobre todo en los países asiáticos, se atribuyeron principalmente al consumo de agua contaminada y, en menor proporción al consumo de alimentos; sin embargo, actualmente la transmisión a través de los alimentos es cada vez más frecuente.⁽¹⁶⁾

Los productos alimenticios son probables vectores para la transmisión del cólera⁽¹⁷⁾, dado que algunos de ellos (leche, huevos, hortalizas, frutos, pollo, carne) permiten el desarrollo de *Vibrio cholerae* O1. Aún cuando se los introduzca en bajo número, ya sea por manipuleo con manos sucias o por contacto con aguas levemente contaminadas, estos microorganismos pueden multiplicarse hasta alcanzar concentraciones superiores a los umbrales de riesgo.⁽¹⁶⁾

MATERIALES Y METODOS

Para el objetivo 1:

- 1.1. Recuento de *Vibrio cholerae* O1 a lo largo de la incubación en caldo soya tripticaseína a 35° durante 24 horas.
- 1.2. Cálculo del tiempo de generación.

Para el objetivo 2:

- 2.1. Evaluación de toxicidad del agua de la llave para *Vibrio cholerae* y *E. coli*.
- 2.2. Sobrevivencia en congelación a -15° en agua para bebida (probando dos niveles de inóculo, aproximadamente 10^6 y 10^4).
- 2.3. Susceptibilidad al tratamiento térmico en agua para bebida.

Para el objetivo 3:

- 3.1. Tolerancia al cloruro de sodio en caldo soya tripticaseína.

Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 incluídas en el estudio se obtuvieron de las siguientes fuentes:

- a) Aisladas de casos clínicos de brotes presentados en los estados de Querétaro (2 cepas), San Luis Potosí (1 cepa), y de la ciudad de Toluca (1 cepa).
- b) Una cepa aislada del medio ambiente (aguas negras) en el estado de San Luis Potosí.
- c) Dos cepas proporcionadas por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA) a través del Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Claves de las cepas incluídas en el trabajo:

- | | |
|-------|--|
| Q#1 | Cepa aislada de caso clínico en el estado de Querétaro. |
| Q#2 | Cepa aislada de caso clínico en el estado de Querétaro. |
| Tol | Cepa aislada de caso clínico en la ciudad de Toluca. |
| SLP-H | Cepa aislada de caso clínico en el estado de San Luis Potosí. |
| SLP-A | Cepa aislada del medio ambiente en el estado de San Luis Potosí. |
| E#1 | Cepa proporcionada por la FDA Serotipo Inaba. |
| E#2 | Cepa proporcionada por la FDA Serotipo Ogawa. |

MATERIALES

MATERIAL

Cajas petri.

Pipetas graduadas de 1, 2, 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Sistema de filtración Millipore.

Tubos con tapón de rosca de 13x100 y 16x150.

Frascos de dilución.

Vasos de precipitado de 250 y 2000 ml.

Matraces Erlenmeyer de 250 y 1000 ml.

Probetas graduadas de 250 y 1000 ml.

Asas de nicromo.

Termómetro de -10 a 120°.

Gradillas para tubos de 16x150.

Espátulas y agitadores de vidrio.

Mecheros Bunsen y Fisher.

Soporte universal y pinzas para bureta.

Tripies y telas de alambre con asbesto.

Algodón, gasa, papel estraza, papel aluminio.

Ollas de aluminio y peltre.

EQUIPO

Campana de flujo laminar horizontal.

Baño María con termostato.

Vortex.

Incubadora a 35°.

Olla de presión con manómetro.

Horno a 180°.

Cuenta colonias Solbat.

Potenciómetro Corning 220.

Balanza analítica con precisión de 0.01 g.

Congelador a -15°.

Centrifuga.

Bomba de vacío.

Termómetro digital Fluke 51 con termopar externo tipo K como sensor de temperatura (-200 a 1370°).

Estufa de gas.

Lámpara (bombilla con filamento de tungsteno)

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Soya Trypticaseína (AST)

Base de Agar Sangre (ABS)

Caldo Soya Trypticaseína (CST)

Diluyente de peptona (peptona de caseína 0.1%)

Diluyente de peptona (peptona de caseína 0.1%), utilizando agua tridestilada

Diluyente de peptona (peptona de caseína 0.1%), utilizando agua tridestilada y adicionando 0.85% de NaCl

REACTIVOS

Buffer salino de fosfatos ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.1 M + 0.8% de NaCl) (BSF)

Agua destilada

Agua tridestilada

Agua de la llave¹

Cloruro de sodio (NaCl)

Buffer de fosfatos pH 4 y 7

Yodóforo (solución comercial)

¹ Característica fisicoquímicas del agua de la llave:

Cloruros	27.11 ppm
Cloro residual	Indetectable
Demanda bioquímica de oxígeno	< 7 ppm
Sólidos totales	302 ppm

La caracterización anterior la realizó el Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) de la Universidad Autónoma de Querétaro.

METODOS

- 1.1 CINETICA DE DESARROLLO DE *Vibrio cholerae* 01 EN CALDO SOYA TRIPTICASEINA.
 - 1.1.1 Mantener las cepas en agar base sangre (ABS) a temperatura ambiente previa incubación a 35°/24 horas.
 - 1.1.2 A partir de cada cepa preparar un cultivo fresco mediante dos pases en caldo soya tripticaseína (CST) incubando 24 y 18 horas respectivamente a 35°.
 - 1.1.3 Preparar diluciones decimales en el diluyente de peptona hasta obtener una suspensión que contenga aproximadamente 10⁴ células viables/ml.
 - 1.1.4 Transferir 1 ml de la suspensión anterior a 99 ml de CST temperado a 35° para disponer de un contenido inicial de aproximadamente 100 células viables/ml. Agitar.
 - 1.1.5 Incubar los frascos a 35 ± 0.5° en baño maría.
 - 1.1.6 Efectuar el recuento por la técnica del vaciado en placa (VP) ⁽²³⁾ en agar soya tripticaseína (AST) al cabo de 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16 y 24 horas. Incubar las placas (duplicado por dilución) a 35°/18-24 horas. Esquema 1.
 - 1.1.7 Computar los resultados y graficar el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) contra tiempo (hs).

1.2. CALCULO DEL TIEMPO DE GENERACION

1.2.1 Calcular tiempo de generación para las siete cepas según la fórmula:

$$G = t/n = t/3.3 \log (b/B)$$

G = Tiempo de generación

t = Periodo o tiempo

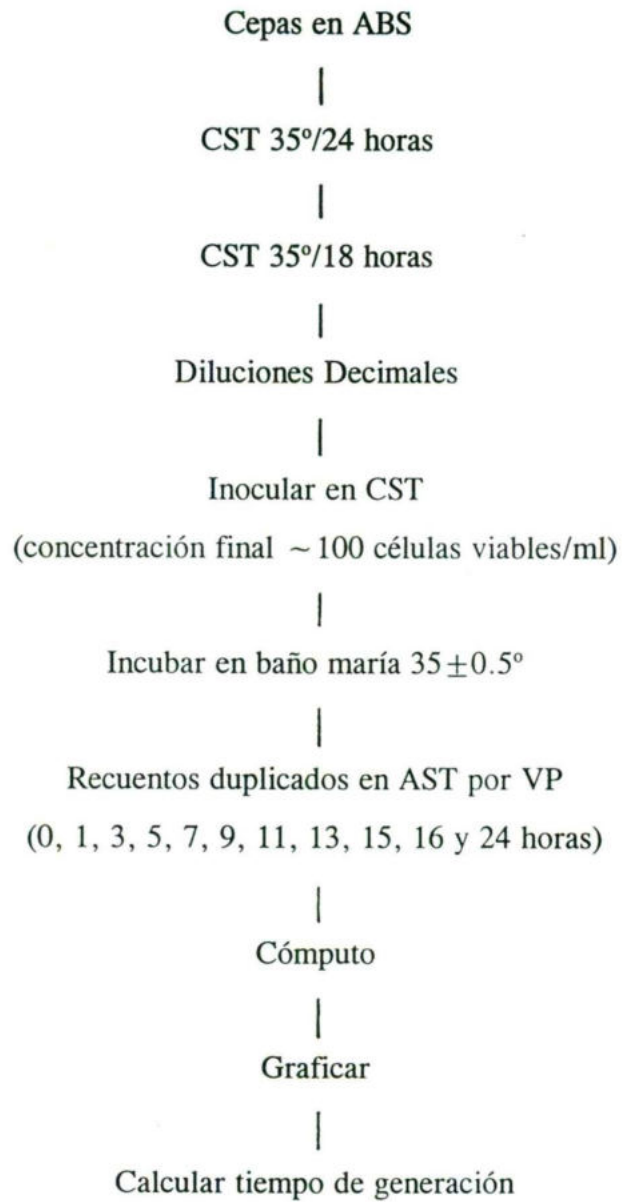
n = Número de generaciones

B = Número de bacterias inoculadas

b = Número de bacterias al final del periodo.⁽³⁾

ESQUEMA 1

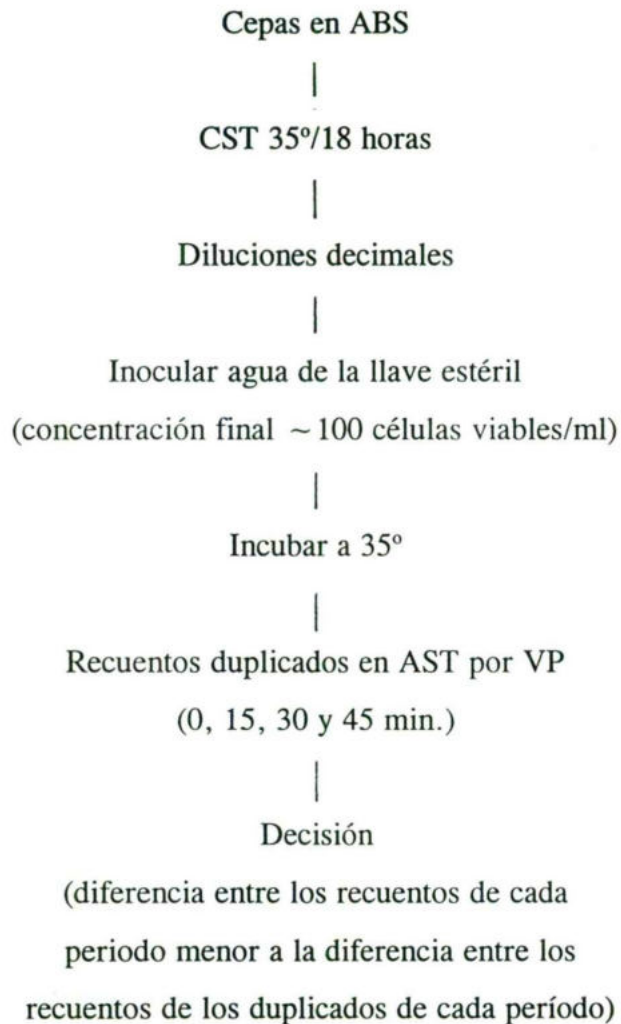
1.1 CINÉTICA DE DESARROLLO DE *Vibrio cholerae* O1 EN CST



- 2.1 EVALUACION DE LA TOXICIDAD DEL AGUA DE LA LLAVE PARA *Vibrio cholerae* Y *E. coli*.⁽¹⁷⁾
- 2.1.1 Preparar cultivos frescos en CST por incubación a 35°/18 horas.
- 2.1.2 Preparar diluciones decimales en diluyente de peptona hasta obtener una concentración aproximada de 10⁴ células viables/ml.
- 2.1.3 Transferir 1 ml de la suspensión anterior en 99 ml de agua de la llave estéril temperada a 35° para disponer de una concentración inicial de ~100 células viables/ml.
- 2.1.4 Incubar a 35°.
- 2.1.5 Efectuar el recuento por la técnica de VP en AST al cabo de 0, 15, 30 y 45 minutos. Incubar las placas (duplicado por dilución) a 35°/18-24 horas. Esquema 2.
- 2.1.6 Computar los resultados.

ESQUEMA 2

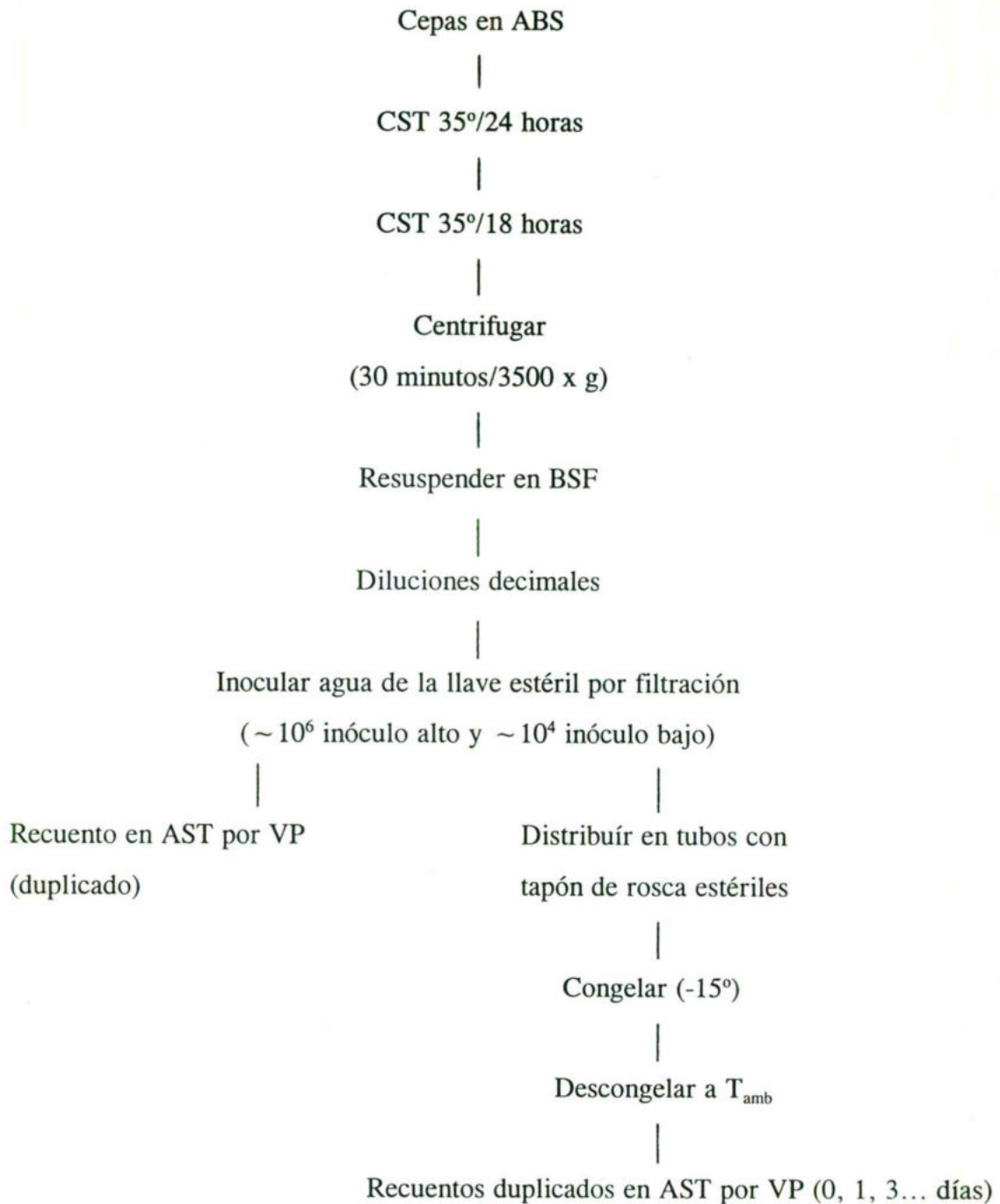
2.1 EVALUACION DE LA TOXICIDAD DEL AGUA DE LA LLAVE PARA *V. cholerae* Y *E. coli*.



- 2.2 SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA (PROBANDO DOS NIVELES DE INOCULO, $\sim 10^6$ Y 10^4).
- 2.2.1 A partir de cada cepa preparar un cultivo fresco mediante dos pases en CST incubando 24 y 18 horas respectivamente a 35° .
- 2.2.2 Centrifugar (30 minutos/3500 x g).
- 2.2.3 Resuspender en un volúmen igual de buffer salino de fosfatos (BSF).
- 2.2.4 Preparar diluciones decimales en diluyente de peptona hasta obtener una suspensión que contenga $\sim 10^8$ (inóculo alto) y $\sim 10^6$ (inóculo bajo) células viables/ml.
- 2.2.5 Inocular 5 ml de la suspensión en 495 ml de agua de la llave esterilizada por filtración para tener una concentración aproximada de 10^6 y 10^4 células viables/ml respectivamente. Homogenizar agitando 1 minuto vigorosamente.
- 2.2.6 Efectuar el recuento de ambas suspensiones por la técnica de VP en AST. Incubar las placas (duplicado por dilución) a $35^{\circ}/18-24$ horas.
- 2.2.7 Distribuir 10 ml de la suspensión en tubos con tapón de rosca estériles.
- 2.2.8 Congelar a -15° . Acoplar un termómetro digital con termopar externo a un tubo con agua para monitorear la temperatura.
- 2.2.9 Descongelar 3 tubos a temperatura ambiente y realizar en cada ocasión recuentos por la técnica de VP en AST al cabo de 0, 1, 3...días hasta la extinción del microorganismo en un mililitro. Incubar las placas a $35^{\circ}/18-24$ horas.
- 2.2.10 Realizar recuentos por la técnica de VP en AST utilizando los 10 ml de cada tubo distribuyéndolos en 4 cajas. Esquema 3.
- 2.2.11 Computar los resultados y graficar logaritmo de UFC/ml contra tiempo (hs).

ESQUEMA 3

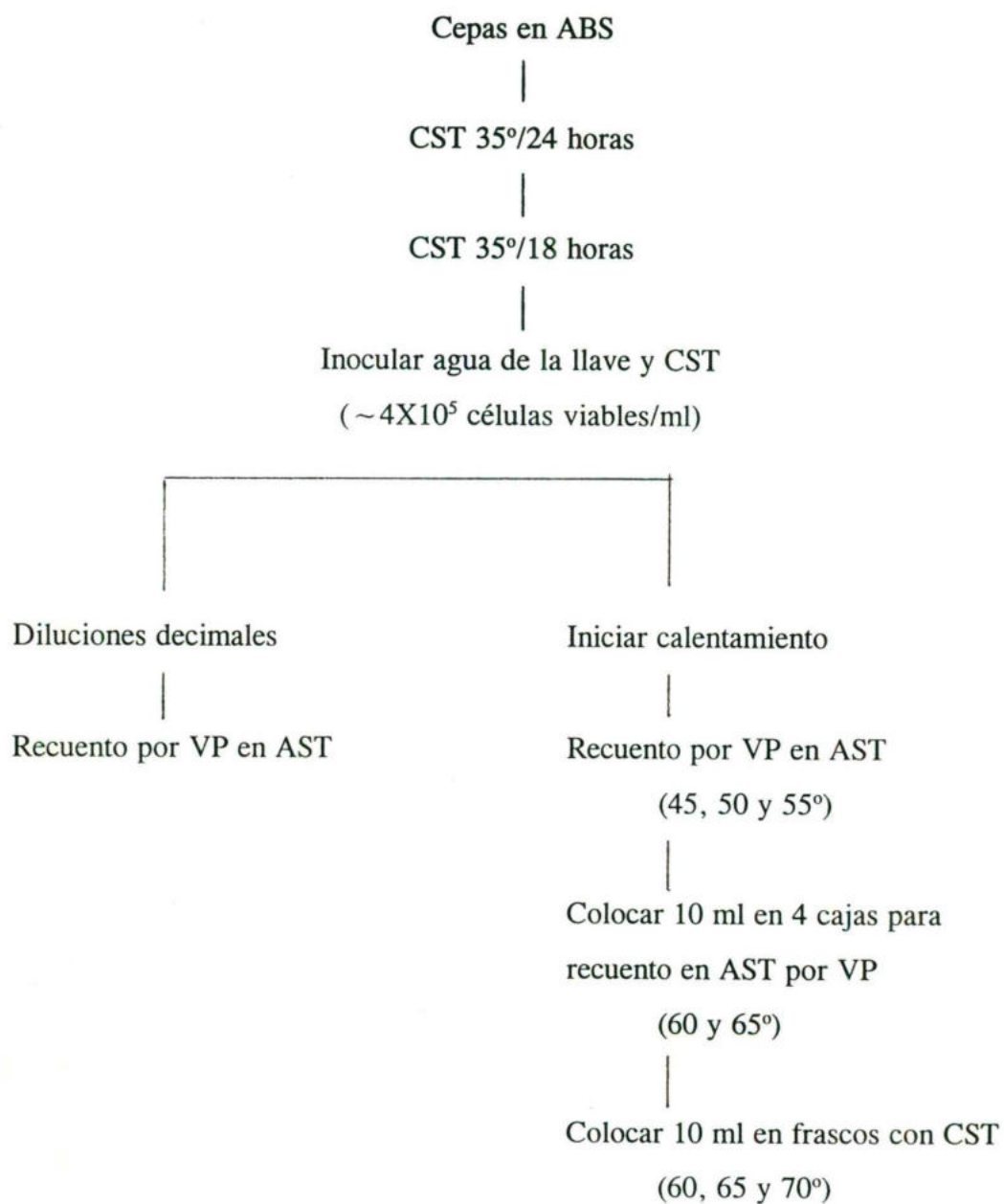
2.2 SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA (PROBANDO DOS NIVELES DE INOCULO, $\sim 10^6$ Y 10^4).



- 2.3 SUSCEPTIBILIDAD AL TRATAMIENTO TERMICO EN AGUA PARA BEBIDA Y EN CST.
- 2.3.1 A partir de las cepas Q#1, E#1 y SLP-A, preparar un cultivo fresco mediante dos pases sucesivos en CST incubando 24 y 18 horas respectivamente a 35°.
- 2.3.2 a) Inocular 10 ml del cultivo en 2500 ml de agua de la llave contenida en un recipiente de aluminio o peltre, hervida previamente durante 10 minutos y enfriada a temperatura ambiente. El inóculo inicial será de $\sim 4 \times 10^5$ células viables/ml.
- b) Inocular 3 ml de cultivo en 1000 ml de CST a temperatura ambiente contenido en un vaso de precipitado para obtener un inóculo inicial de $\sim 3 \times 10^5$ células viables/ml.
- 2.3.3 Realizar el recuento de cada una de las suspensiones por la técnica de VP en AST. Incubar las placas (duplicado por dilución) 18-24 horas a 35°.
- 2.3.4 Acoplar un termómetro al recipiente sumergiéndolo aproximadamente 5 cm en el líquido.
- 2.3.5 Iniciar el calentamiento en una estufa de gas.
- 2.3.6 Efectuar recuentos por VP en AST (duplicado por dilución) cuando la temperatura alcance 45, 50 y 55°.
- 2.3.7 Tomar muestras de 10 ml y distribuirlos en cuatro cajas para recuento por VP en AST a los 60 y 65°.
- 2.3.8 Colocar muestras de 10 ml en frascos de dilución con 90 ml de CST (duplicado) a los 60, 65 y 70°.
- 2.3.9 Incubar las placas y los frascos 18-24 horas a 35°. Esquema 4.
- 2.3.10 Computar los resultados de las placas y observar turbidez en los frascos a las 24 y 48 horas de incubación.
- 2.3.11 Graficar logaritmo de UFC/ml contra tiempo (hs).

ESQUEMA 4

2.3 SUSCEPTIBILIDAD AL TRATAMIENTO TERMICO EN AGUA PARA BEBIDA Y EN CST.



3.1 TOLERANCIA AL CLORURO DE SODIO EN CALDO SOYA TRIPTICASEINA

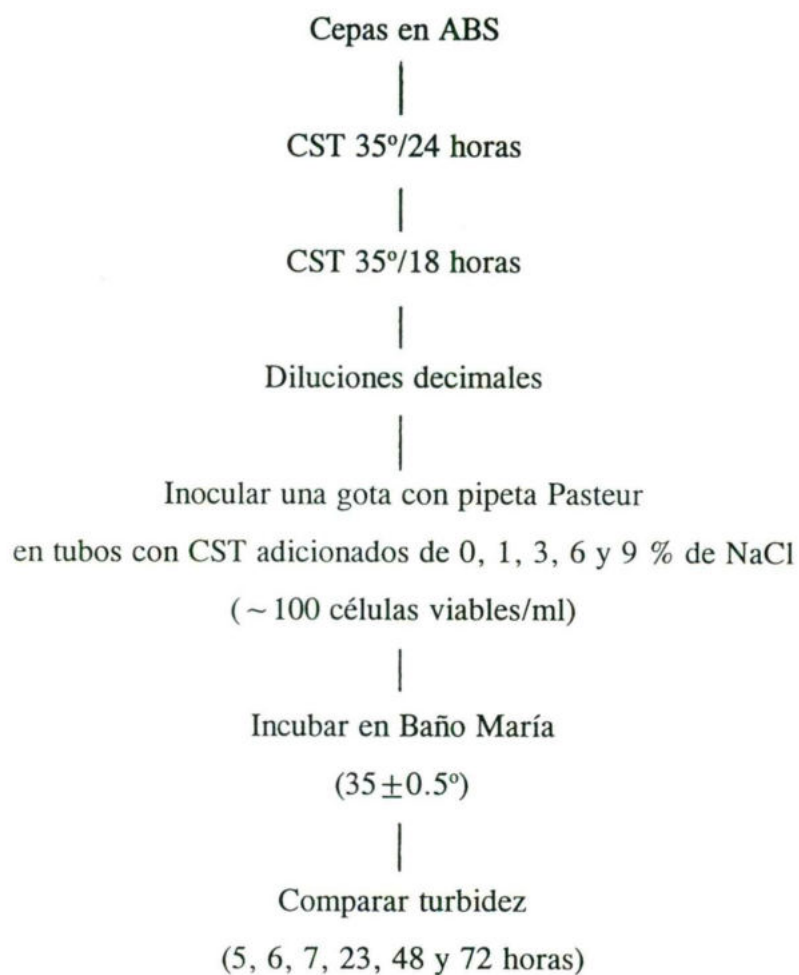
- 3.1.1 A partir de cada cepa preparar un cultivo fresco mediante dos pases en CST incubando 24 y 18 horas respectivamente a 35°.
- 3.1.2 Preparar diluciones decimales en diluyente de peptona hasta obtener una suspensión que contenga $\sim 10^4$ células viables/ml.
- 3.1.3 Inocular una gota con pipeta Pasteur (0.02 ml) en tubos con 3 ml de CST adicionados de 0, 1, 3, 6 y 9 % de NaCl respectivamente.
- 3.1.4 Incubar a $35 \pm 0.5^\circ$ en baño maría.
- 3.1.5 Comparar turbidez al cabo de 5, 6, 7, 23, 48 y 72 horas. Esquema 5.

Para estimar la turbidez se recurrió a una escala en los siguientes términos:

Extrema turbiedad	+++++
Muy turbio	++++
Turbio	+++
Poco turbio	++
Leve turbiedad	+
No turbio	-

ESQUEMA 5

3.1 TOLERANCIA AL CLORURO DE SODIO EN CALDO SOYA TRIPTICASEINA



RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS

TABLA 1

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#1) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	2,500	3.40
1.03	3,200	3.50
3.00	95	1.98
5.00	6,500	3.81
7.00	260,000,000	8.41
9.67	450,000,000	8.65
11.03	960,000,000	8.98
13.00	950,000,000	8.98
15.03	1,400,000,000	9.15
16.00	650,000,000	8.81
24.00	390,000,000	8.59

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 1. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA Q#1) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

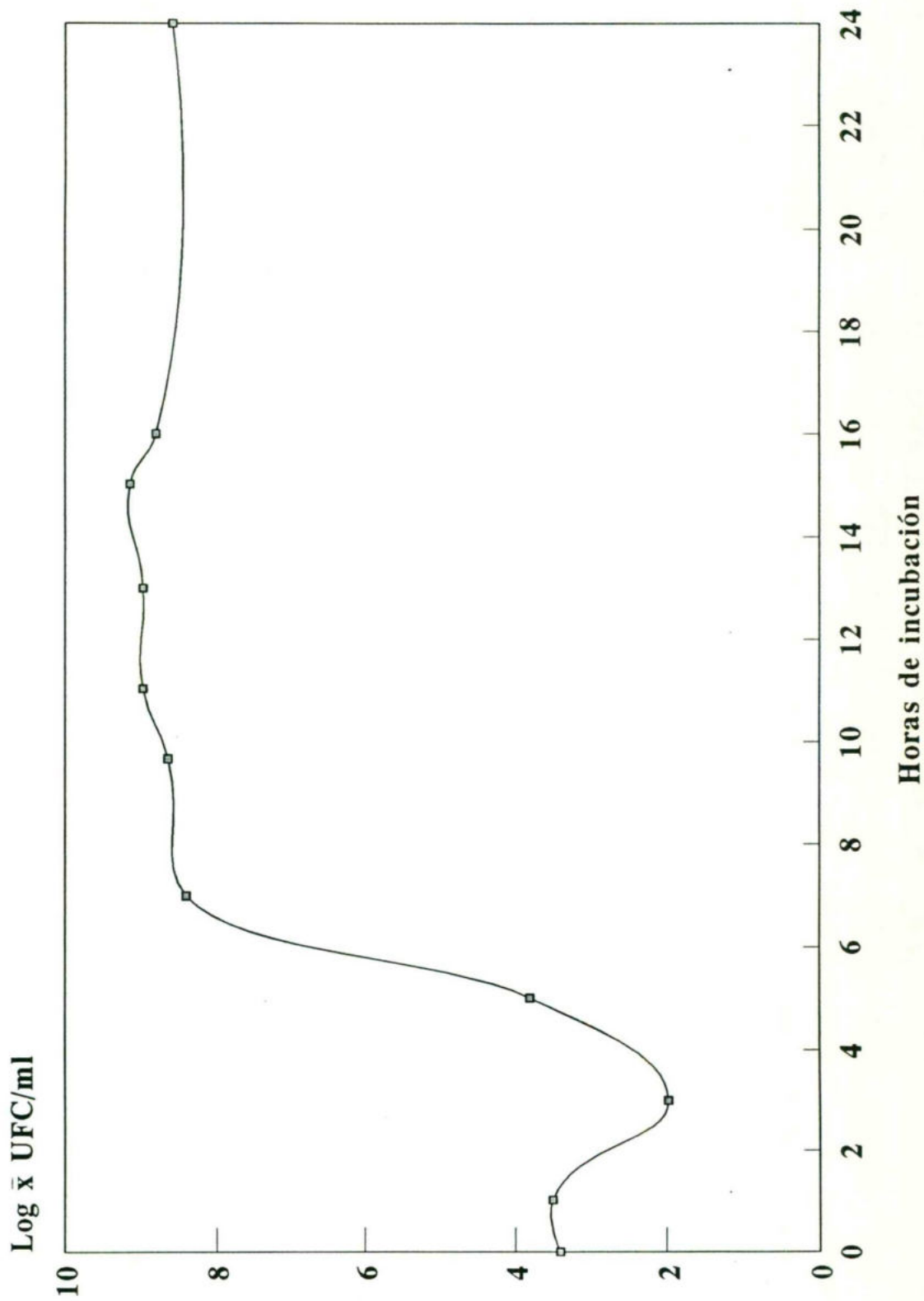


TABLA 2

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#2) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	950	2.98
1.03	2,300	3.36
3.00	50	1.70
5.00	16,000	4.20
7.00	690,000,000	8.84
9.67	940,000,000	8.97
11.03	680,000,000	8.83
13.00	1,300,000,000	9.11
15.03	490,000,000	8.69
16.00	350,000,000	8.54
24.00	620,000,000	8.79

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 2. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA Q#2) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

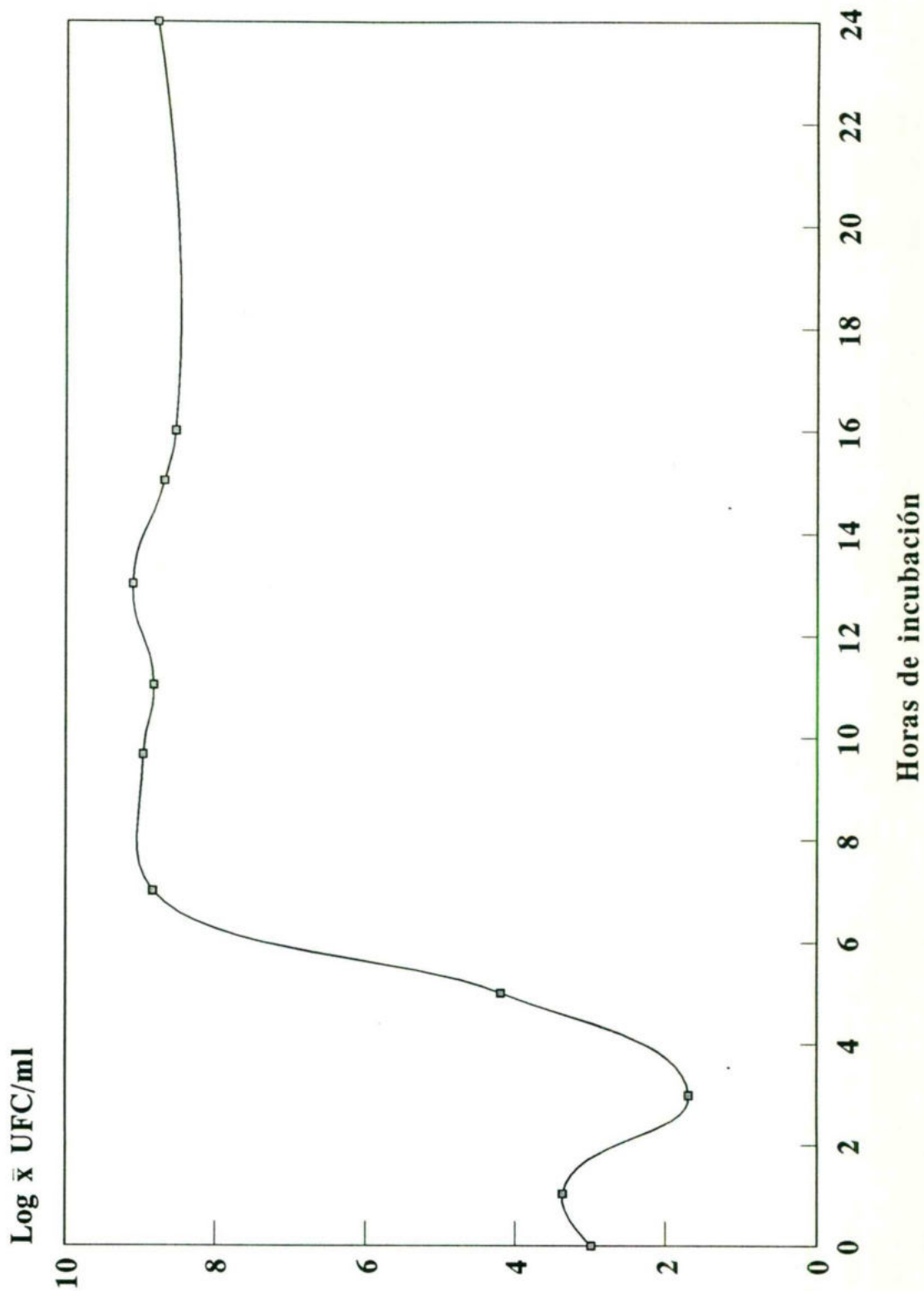


TABLA 3

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Tol) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	930	2.97
0.92	1,400	3.15
2.92	< 10	1.00
4.92	300,000	5.48
6.92	470,000,000	8.67
8.92	680,000,000	8.83
10.92	740,000,000	8.87
12.92	680,000,000	8.83
15.07	450,000,000	8.65
15.95	760,000,000	8.88
25.42	84,000,000	7.92

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 3. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA To1) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

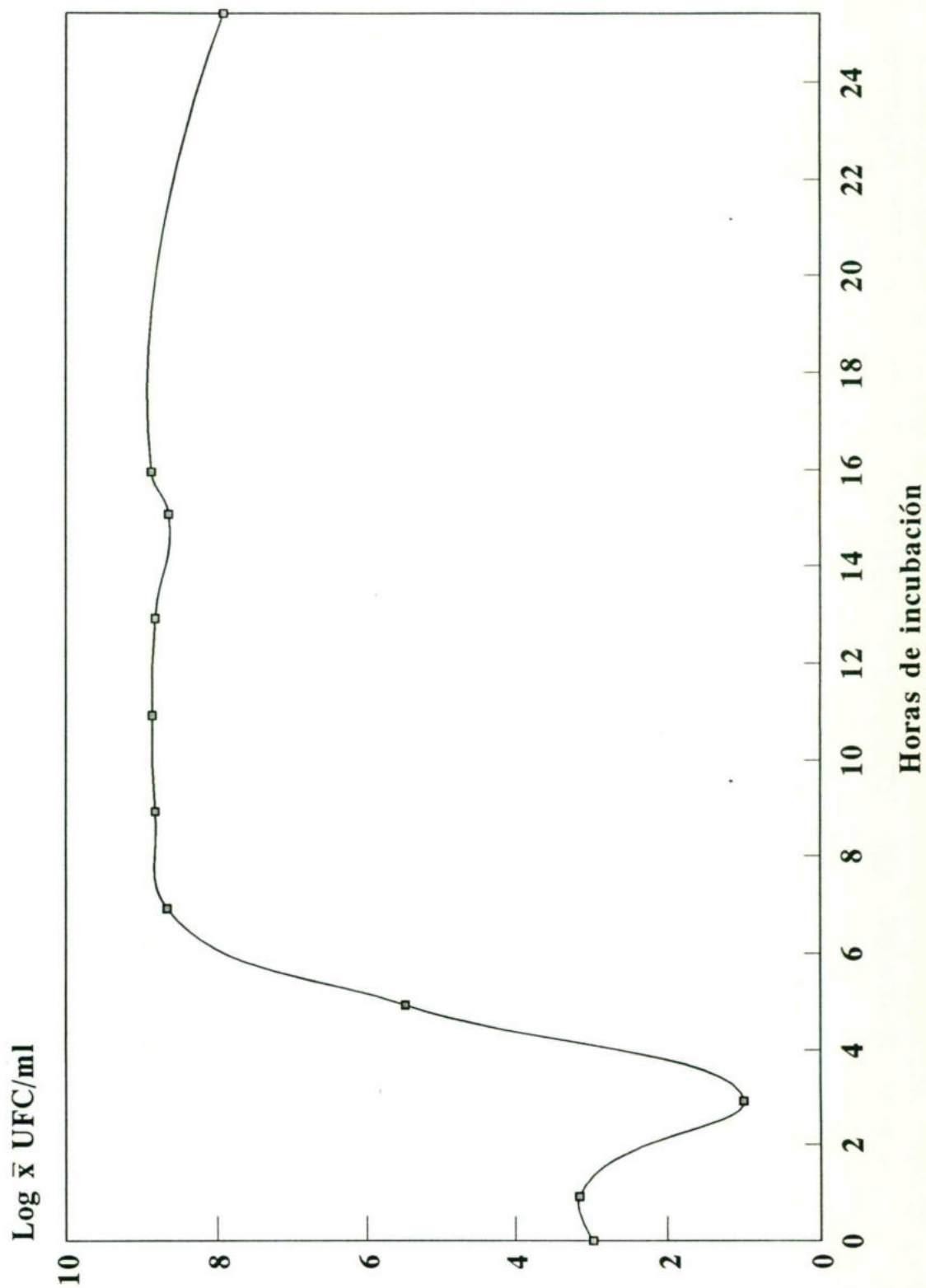


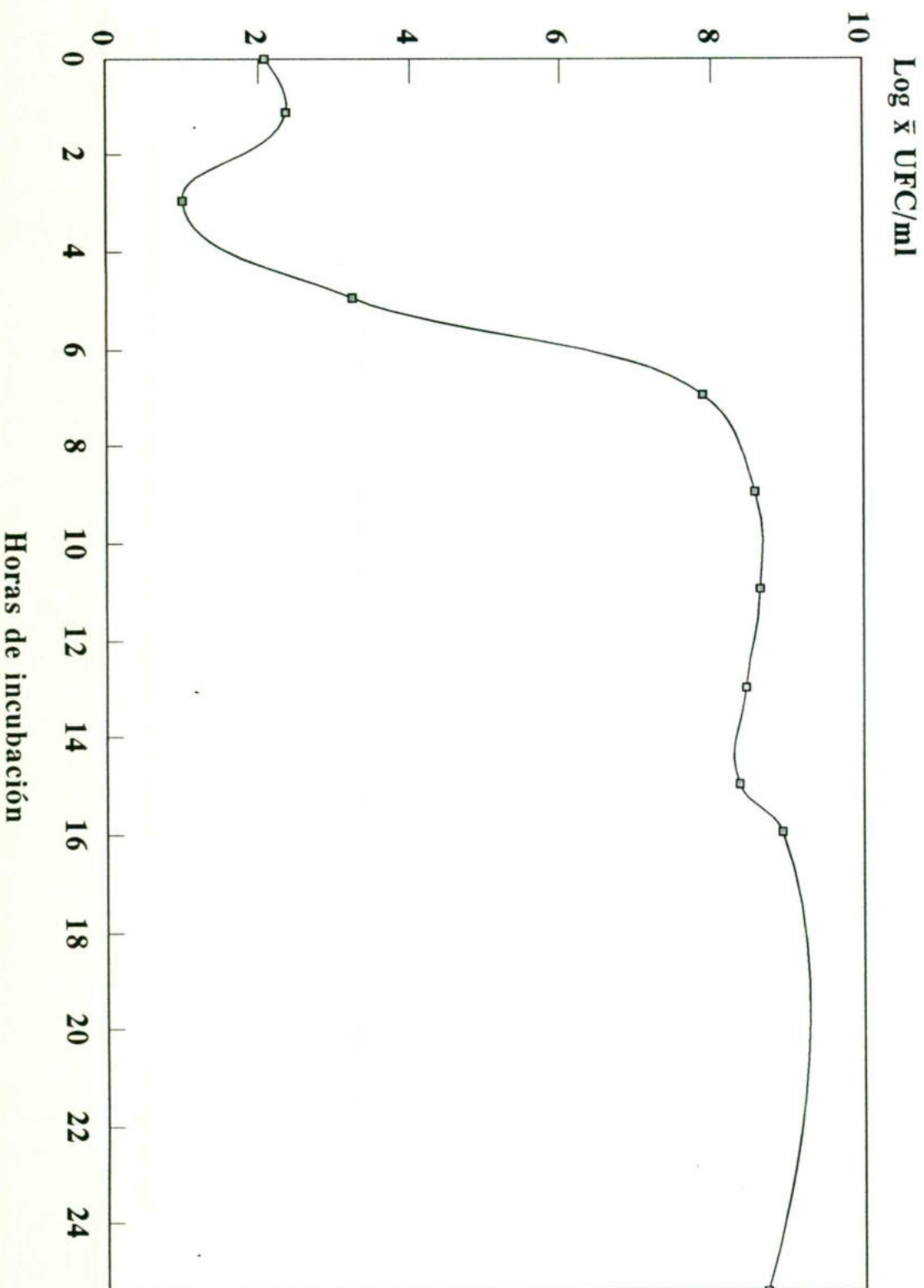
TABLA 4

RECUENTO DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA SLP-H) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	120	2.08
1.12	230	2.36
2.95	< 10	1.00
4.95	1,700	2.23
6.95	75,000,000	7.88
8.95	370,000,000	8.57
10.95	440,000,000	8.64
12.98	280,000,000	8.45
14.98	230,000,000	8.36
15.95	860,000,000	8.93
25.45	520,000,000	8.72

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 4. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA SLP-H) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**



* Media de recuentos duplicados

log x*	UFC/ml	Horas de incubación
2.08	120	0.00
2.56	360	1.12
1.00	< 10	2.95
2.00	< 100	4.95
8.18	150,000,000	6.95
8.85	700,000,000	8.95
8.88	760,000,000	10.95
8.94	880,000,000	12.98
8.75	560,000,000	14.98
8.89	770,000,000	15.95
7.74	55,000,000	25.45

TABLA 5
 RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA SLP-A) A LO LARGO DE LA INCUBACION
 EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

**GRAFICA 5. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA SLP-A) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

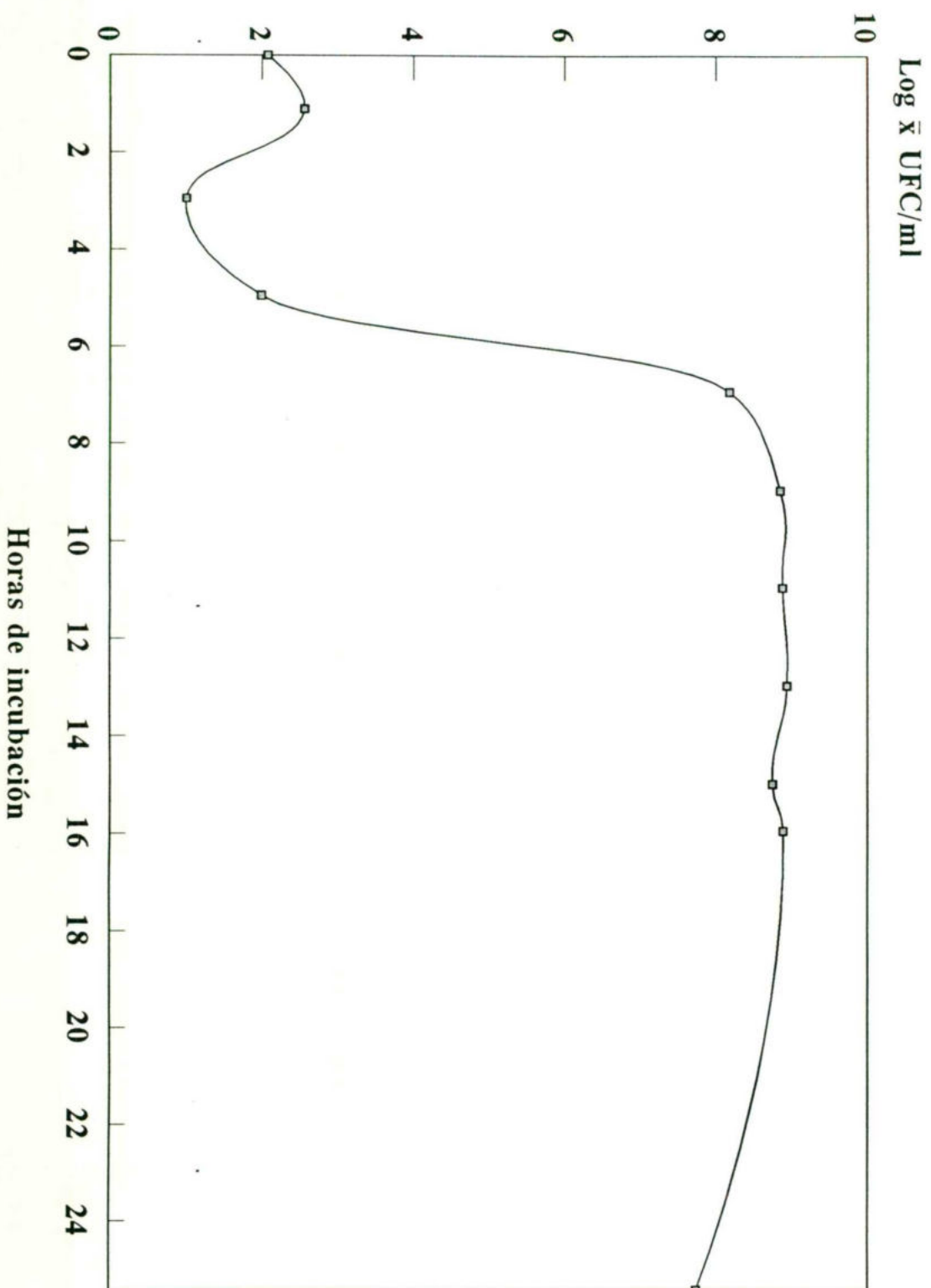


TABLA 6

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA E#1) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	15	1.18
0.92	18	1.26
2.92	<10	1.00
4.92	300	2.48
6.92	90,000	4.95
8.92	430,000,000	8.63
10.92	440,000,000	8.64
12.92	540,000,000	8.73
15.07	370,000,000	8.57
15.95	400,000,000	8.60
25.42	13,000,000	7.11

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 6. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA E#1) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

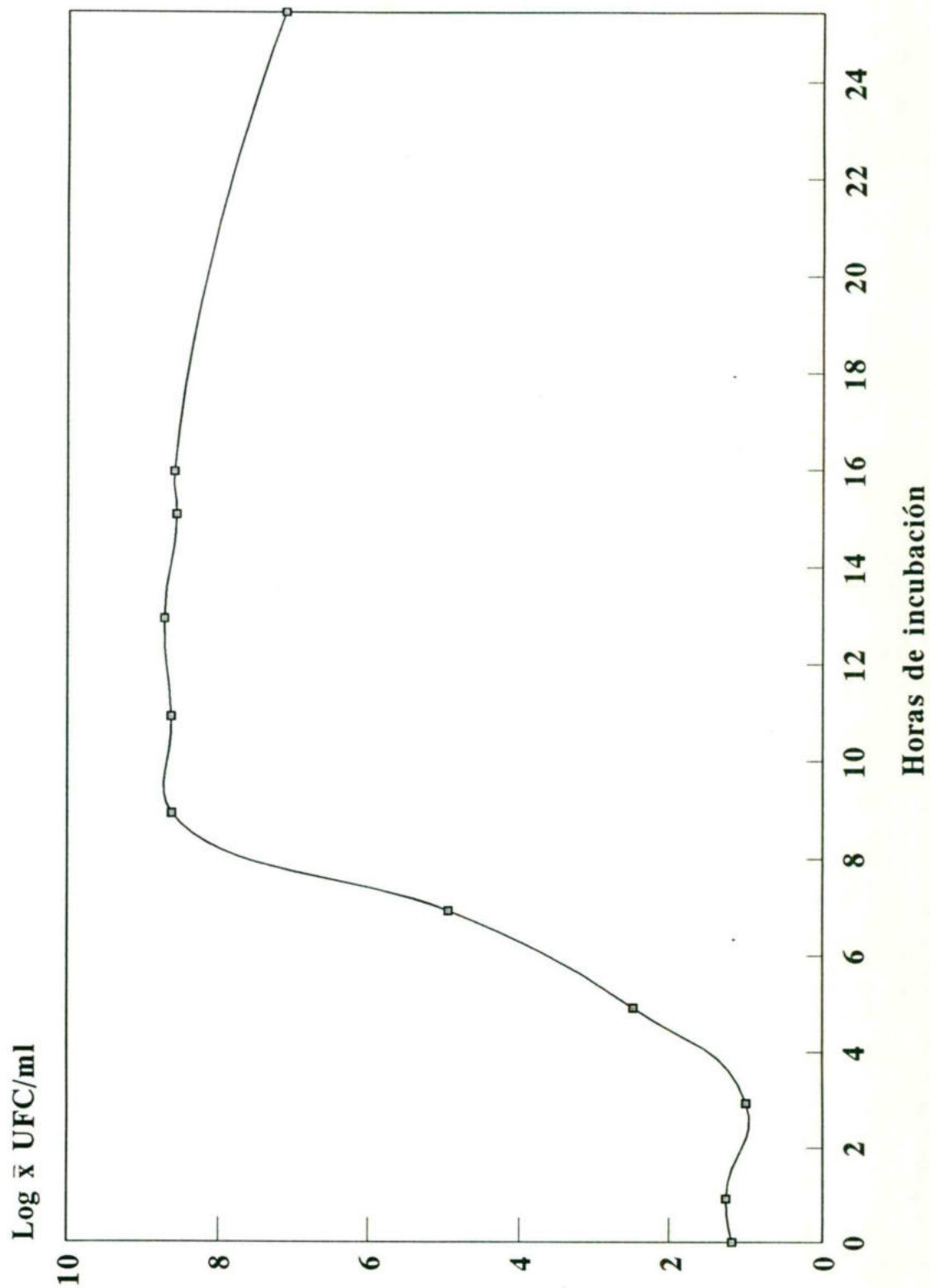


TABLA 7

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA E#2) A LO LARGO DE LA INCUBACION
EN CST A 35° DURANTE 24 HORAS

Horas de incubación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
0.00	600	2.78
0.92	980	2.99
3.00	430	2.63
5.00	10,000	4.00
7.00	52,000,000	7.72
9.67	550,000,000	8.64
11.07	400,000,000	8.60
13.00	220,000,000	8.34
15.00	16,000,000	7.20
15.72	7,000,000	6.85
23.75	1,000,000	6.00

* Media de recuentos duplicados

**GRAFICA 7. CINETICA DE *Vibrio cholerae*
O1 (CEPA E#2) EN CST INCUBADO A 35°
DURANTE 24 HORAS**

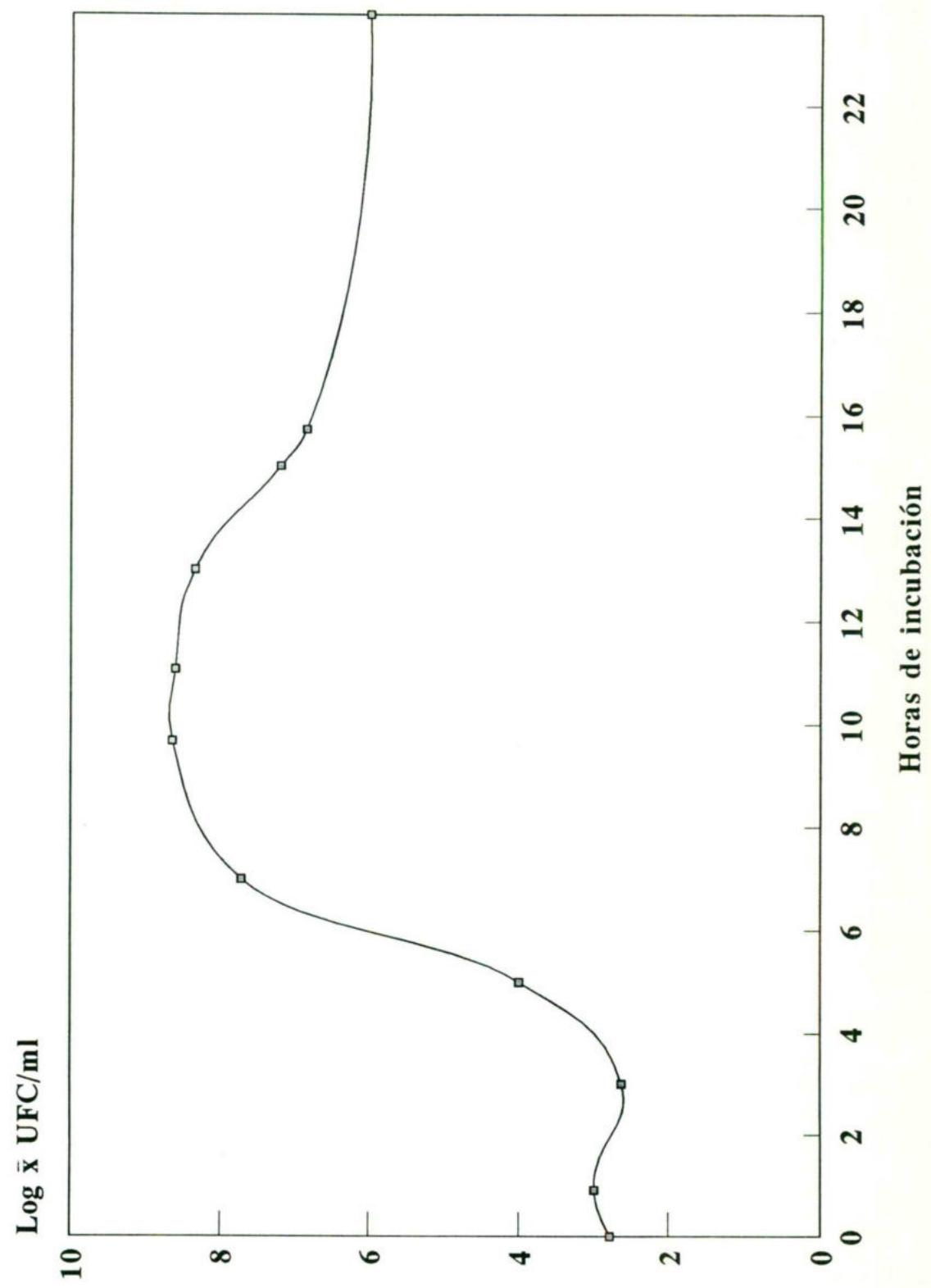


TABLA 8

RECUESTO DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#2) A LO LARGO DE LA INCUBACION EN CST A 35° DURANTE 4 HORAS TOMANDO MUESTRAS DEL CULTIVO CADA MEDIA HORA ENTRE LAS 2 Y 4 DE INCUBACION

Horas de incubación	Diluciones			
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
0.0	100*	10		
	110	11		
1.0	120	12		
	120	17		
2.0	560	51		
	580	60		
2.5	2,400	240		
	3,000	260		
3.0	7,200	3	0	
	8,000	3	1	
3.5	41,000	2	0	
	30,000	1	0	
4.0	> 10 ⁵	8	0	0
	> 10 ⁵	4	0	0

*UFC/ml

TABLA 9

RECuento de *Vibrio cholerae* O1 (CEPA SLP-A) A LO LARGO DE LA INCUBACION
 EN CST A 35° DURANTE 4 HORAS TOMANDO MUESTRAS DEL CULTIVO CADA
 MEDIA HORA ENTRE LAS 2 Y 4 DE INCUBACION

Horas de incubación	Diluciones			
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
0.0	110*	5		
	120	18		
1.0	170	23		
	220	24		
2.0	600	80		
	950	83		
2.5	> 10 ³	540		
	> 10 ³	930		
3.0	> 10 ³	2	0	
	> 10 ³	5	0	
3.5	> 10 ⁴	18	2	
	> 10 ⁴	21	2	
4.0	> 10 ⁵	810	24	2
	> 10 ⁵	780	13	3

*UFC/ml

TABLA 10

RECuento de *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#2) DIRECTO Y CON PREVIA DILUCION A LO LARGO DE LA INCUBACION EN CST A 35° DURANTE 7 HORAS TOMANDO SUELMIVO CADA 1/4 DE HORA ENTRE LAS 2.5 Y 3.5 DE INCUBACION

Horas de incubación	Inoculación		
	Previa dilución	Directa	
0.00		200	2.30
2.00		2,000	3.30
2.50	0*		
2.75	150	~ 33,000	4.52
3.00	0	~ 44,000	4.64
3.25	0	~ 120,000	5.08
3.50	0	> 100,000	
4.00	0	> 100,000	
5.00	1,300	> 1,000,000	
6.00	7,500	> 1,000,000	
7.00	200,000,000		8.30

* UFC/ml

TABLA 11

RECuento de *Vibrio cholerae* O1 (CEPA SLP-A) DIRECTO Y CON PREVIA DILUCION A LO LARGO DE LA INCUBACION EN CST A 35° DURANTE 7 HORAS TOMANDO MUESTRAS DEL CULTIVO CADA 1/4 DE HORA ENTRE LAS 2.5 Y 3.5 DE INCUBACION

Horas de incubación	Inoculación		
	Previa dilución	Directa	
0.00		96	1.98
2.00		1,300	3.12
2.50	0*	~ 3,600	3.56
2.75	0	~ 13,000	4.11
3.00	0	~ 18,000	4.26
3.25	0	~ 32,000	4.51
3.50	100	~ 33,000	4.52
4.00	290	~ 70,000	4.85
5.00	620	> 100,000	
6.00	9,900	> 1,000,000	
7.00	140,000,000		8.15

*UFC/ml

TABLA 11-A.1

RECuento de *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#2) PREVIA DILUCION CON DIFERENTES DILUYENTES A LO LARGO DE LA INCUBACION EN CST A 35° DURANTE 7 HORAS TOMANDO MUESTRAS DEL CULTIVO CADA 1/4 DE HORA ENTRE LAS 2.5 Y 3.5 DE

INCUBACION

Hs de incubación	Diluyente			
	CST (x10 ⁴)	DP ¹	DP ²	DP ³ (x10 ²)
0.00		1,300	1,500	19
2.00	~ 3*	0	0	170
2.50	~ 11	0	0	~ 800
2.75	20	0	0	1900
3.00	41	0	0	~ 4700
3.25	92	0	0	9800
3.50	110	0	0	20,000
4.00	540	0	0	~ 83,000
5.00	3,000	7,400	500	350,000
6.00	~ 12,000	> 10,000,000	~ 280,000,000	~ 2,100,000
7.00	51,000	670,000,000	740,000,000	3,900,000

* UFC/ml

¹ Diluyente de peptona preparado con agua destilada

² Diluyente de peptona preparado con agua tridestilada

³ Diluyente de peptona preparado con agua tridestilada adicionado de 0.85% de NaCl.

TABLA 11-A.2

RECuento DE *Vibrio cholerae* O1 (CEPA Q#2) SIN PREVIA DILUCION A LO LARGO DE LA INCUBACION EN CST A 35° DURANTE 4 HORAS TOMANDO MUESTRAS DEL CULTIVO CADA 1/4 DE HORA ENTRE LAS 2.5 Y 3.5 DE INCUBACION.

Horas de incubación	Inoculación	
	Directo ¹	Directo ²
0.00	1,300*	
2.00	7,600	42,000
2.50	~ 10,000	~ 140,000
2.75	~ 10,000	~ 280,000
3.00	> 10,000	~ 480,000
3.25	> 100,000	~ 500,000
3.50	> 100,000	> 1,000,000
4.00	> 1,000,000	

* UFC/ml

¹ Recuento directo inoculando 1 ml

² Recuento directo inoculando 0.1 ml y 0.01 ml con micropipeta

TABLA 12

TIEMPOS DE GENERACION PARA LA CEPA Q#2 CALCULADOS CON LOS DATOS DE LAS TABLAS 10 Y 11-A.1

Diluyente	Tiempo de generación (min)
CST	≈16.03
Agua peptonada con NaCl	≈13.45
Sin diluyente	≈9.45

TABLA 13

TIEMPOS DE GENERACION DE LAS SIETE CEPAS SEGUN DATOS DE LAS TABLAS 1-7

Cepa	Tiempo de generación (min)
Q#1	21.35
Q#2	19.70
Tol	19.62
SLP-H	19.12
SLP-A	18.76
E#1	29.31
E#2	23.46

TABLA 14

EVALUACION DE LA TOXICIDAD DEL AGUA DE LA LLAVE
 PARA *Vibrio cholerae* Y *E. coli*

Cepa	Minutos de incubación en el agua	x* UFC/ml
<i>E. coli</i>	0	30
	15	20
	30	32
	45	44
<i>V. cholerae</i> E#1	0	190
	15	190
	30	210
	45	190
<i>V. cholerae</i> E#2	0	75
	15	80
	30	90
	45	100

* Media de recuentos duplicados

TABLA 15

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
Q#1 CON UN INOCULO INICIAL DE 5×10^6 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	5,000,000**	6.70
0	3,200,000	6.51
1	91,000	4.96
5	2,300	3.36
8	130	2.41
13	38	1.58
23	2	0.30
34	0.90	
40	10	1.00
47	0.40	
54	0.03	
61	1.20	0.08
69	0.06	
75	0	
81	0.10	
90	0.30	
96	0.15	
125	0.10	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

TABLA 17

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
Tol CON UN INOCULO INICIAL DE 6×10^6 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	6,000,000**	6.78
0	5,100,000	6.71
1	200,000	5.30
5	13,000	4.11
8	7,000	3.85
13	490	2.69
23	22	1.34
34	6	0.81
47	9	0.95
61	8	0.88
69	7	0.85
82	0.20	
97	0.17	
104	0.17	
126	0.47	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 10. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Tol
INOCULO INICIAL DE 6×10^6 UFC/ml**

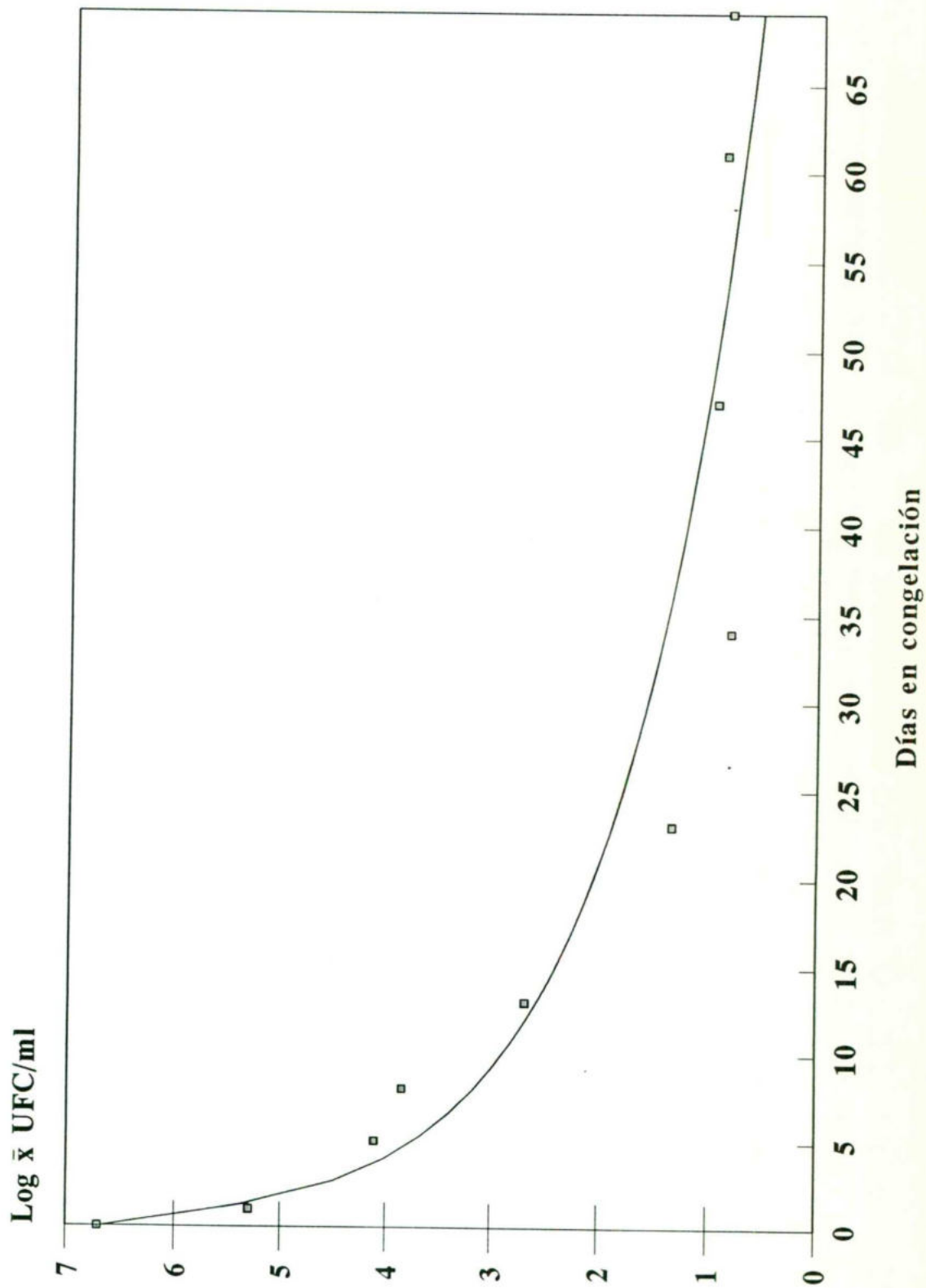


TABLA 18

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-H CON UN INOCULO INICIAL DE 5.6×10^5 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	560,000**	5.75
0	360,000	5.56
1	75,000	4.88
5	180	2.26
12	10	1.00
18	14	1.15
25	8	0.90
39	3	0.48
47	0.67	
54	0.50	
60	0.00	
69	0.30	
75	0.05	
82	0.00	
95	0.23	
104	0.20	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 11. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-H INOCULO INICIAL DE 5.6×10^5 UFC/ml**

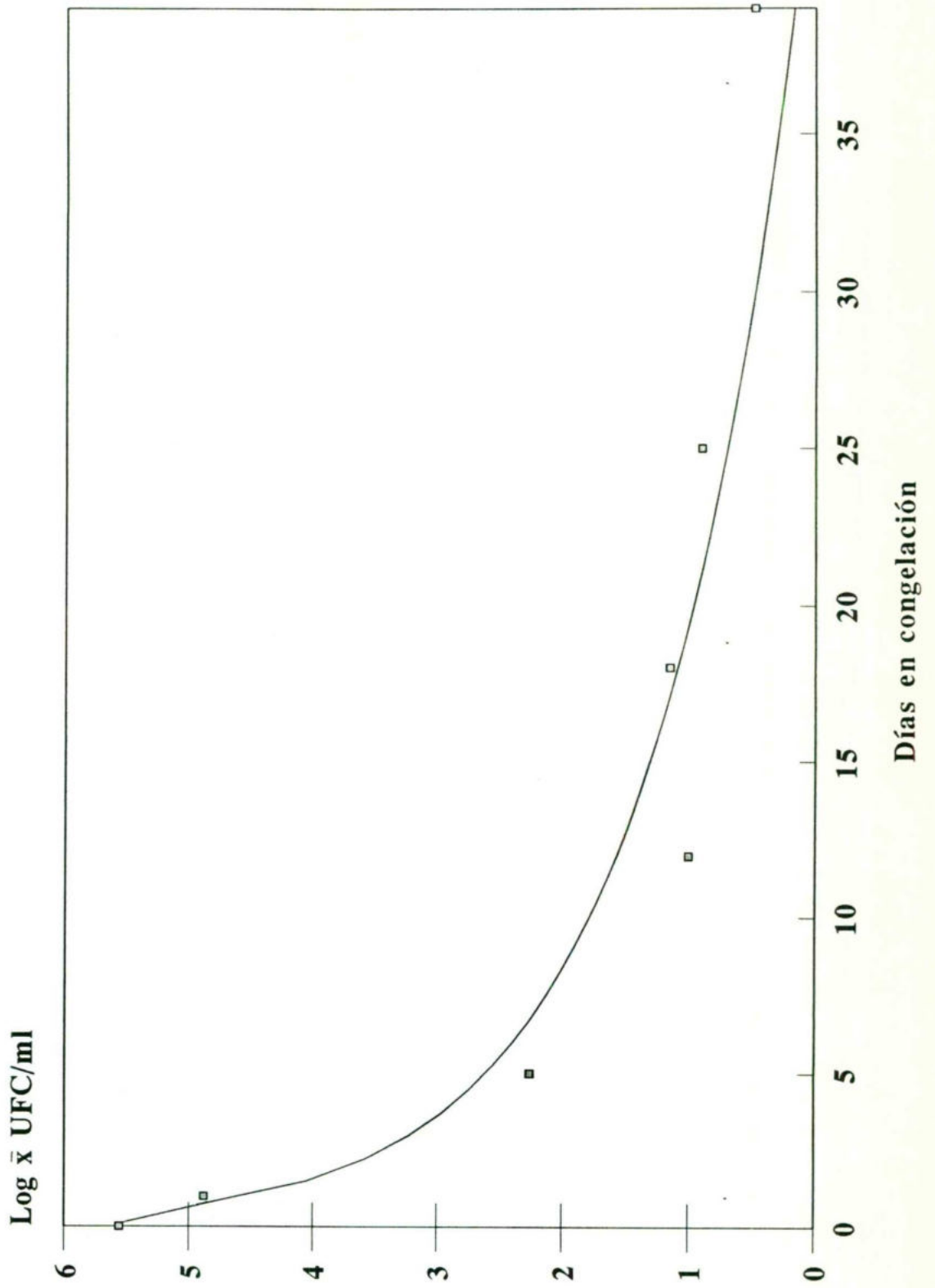


TABLA 19

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-A CON UN INOCULO INICIAL DE 9×10^6 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	9,000,000**	6.95
0	2,900,000	6.46
1	160,000	5.20
5	24,000	4.38
8	5,700	3.76
13	2,700	3.43
23	60	1.78
34	39	1.59
47	37	1.57
61	12	1.08
69	1	0.00
82	2	0.30
91	3	0.48
97	0.83	
104	0.80	
117	0.73	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 12. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-A INOCULO INICIAL DE 9×10^6 UFC/ml**

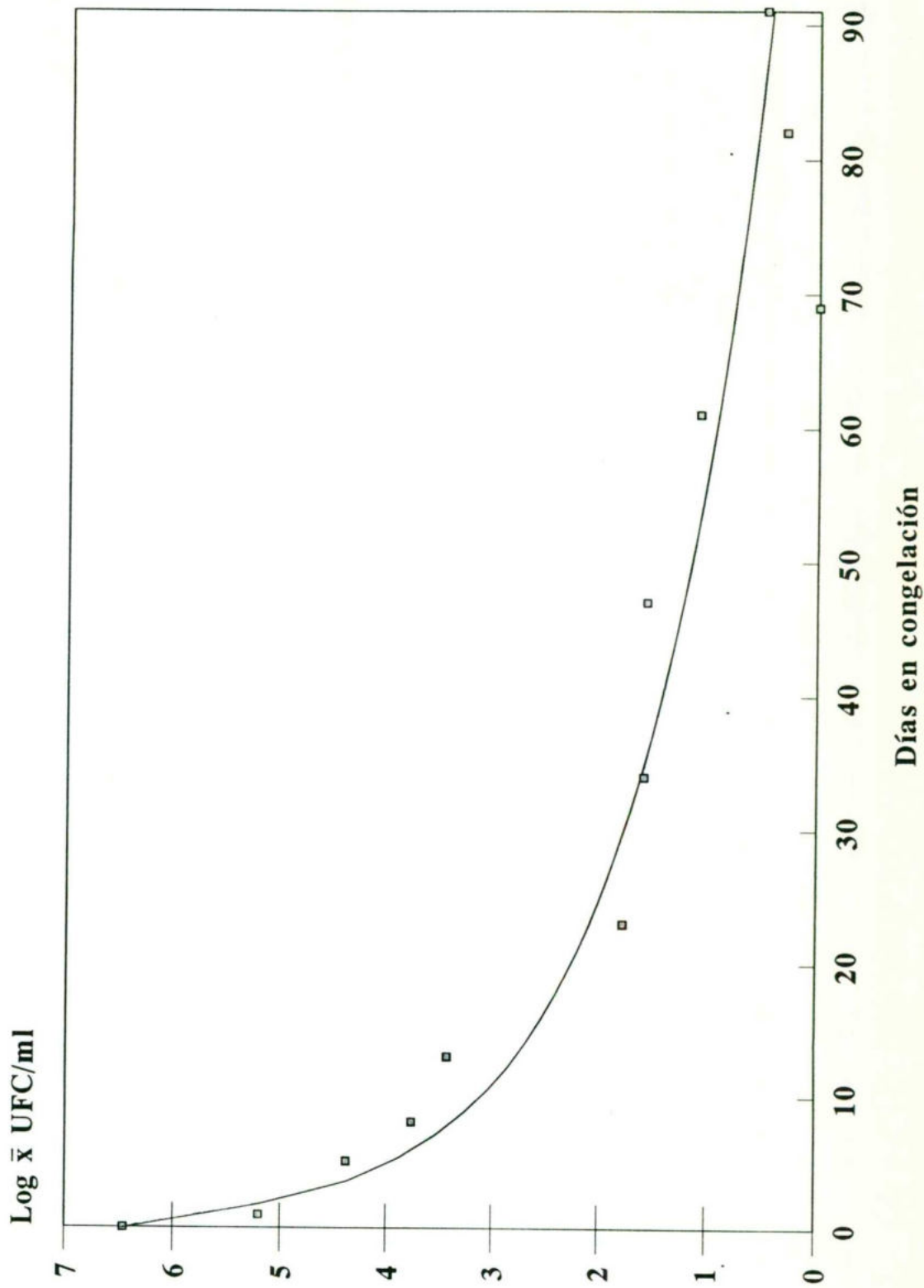


TABLA 20

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
E#1 CON UN INOCULO INICIAL DE 10⁷ UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	10,000,000**	7.00
0	6,700,000	6.51
1	110,000	5.04
5	24,000	4.38
8	23,000	4.36
10	29,000	4.46
16	5,800	3.76
21	2,400	3.38
27	2,100	3.32
34	760	2.88
42	230	2.36
49	5	0.70
69	2	0.30
87	0.10	
118	0.20	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 13. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA E#1
INOCULO INICIAL DE 1×10^7 UFC/ml**

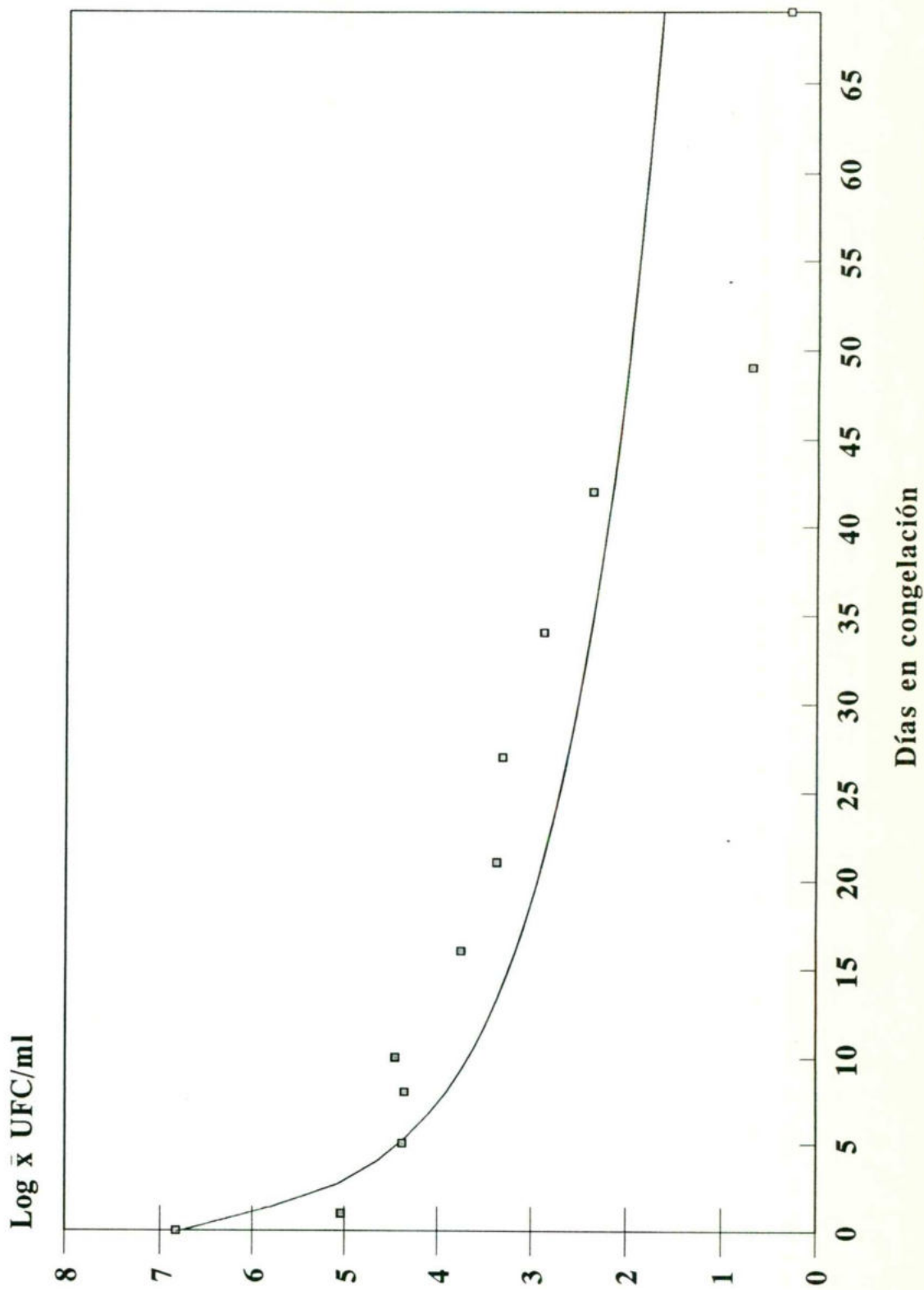


TABLA 21

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
E#2 CON UN INOCULO INICIAL DE 1.1×10^7 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	11,000,000**	7.04
0	5,200,000	6.72
1	180,000	5.26
5	71,000	4.85
8	29,000	4.46
10	27,000	4.43
16	17,000	4.23
21	6,400	3.81
27	7,800	3.89
34	6,600	3.82
44	2,200	3.34
56	19	1.28
69	6	0.78
87	0.07	
118	0.05	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 14. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA E#2
INOCULO INICIAL DE 1.1×10^7 UFC/ml**

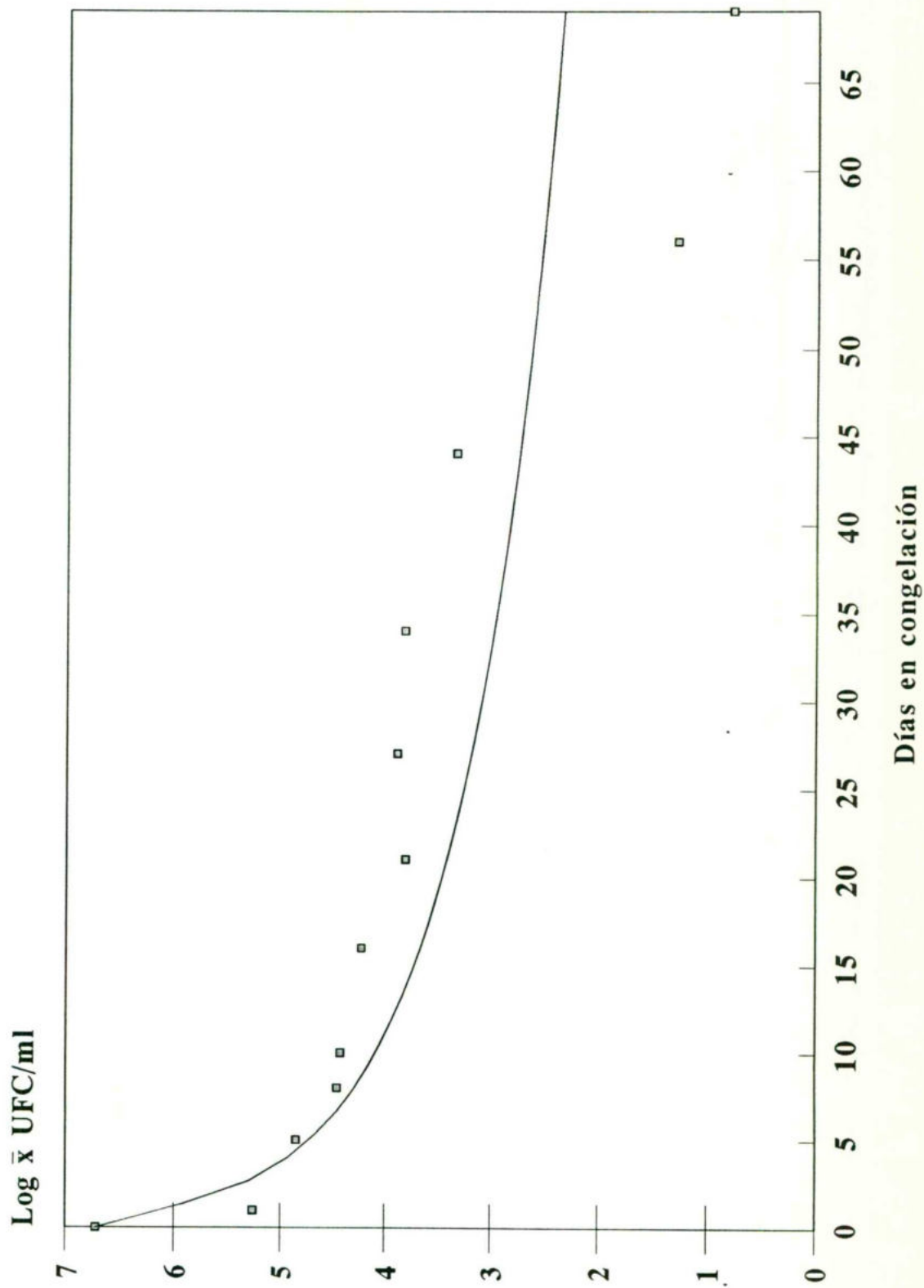


TABLA 22

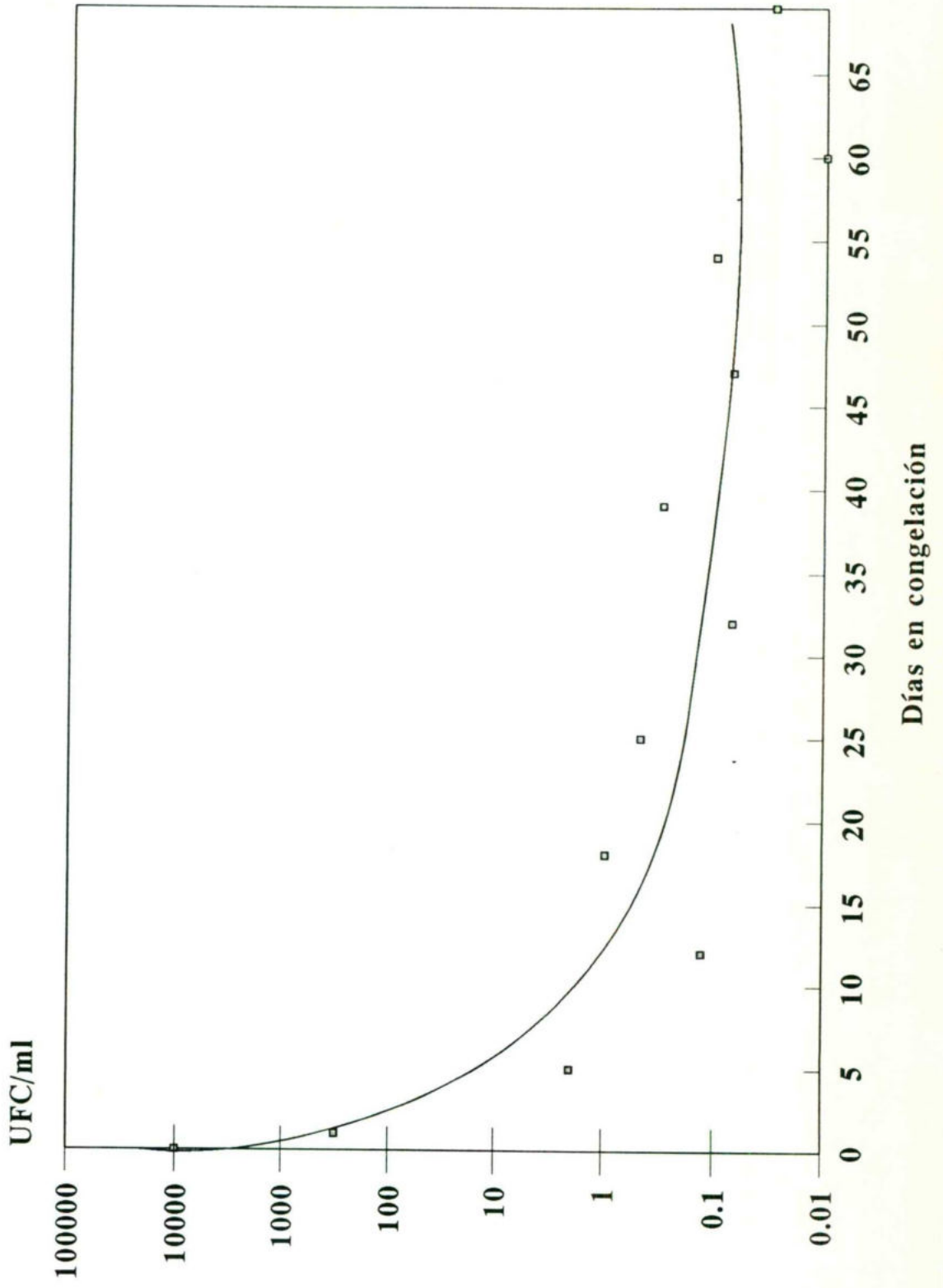
SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
Q#1 CON UN INOCULO INICIAL DE 2.5X10⁴ UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	25,000**	4.40
0	10,000	4.00
1	320	2.51
5	2	0.30
12	0.13	
18	0.97	
25	0.47	
32	0.07	
39	0.30	
47	0.07	
54	0.10	
60	0.00	
69	0.30	
75	0.00	
82	0.00	
104	0.00	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 15. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Q#1
INOCULO INICIAL DE 2.5×10^4 UFC/ml**



**GRAFICA 8. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Q#1
INOCULO INICIAL DE 5x10⁶ UFC/ml**

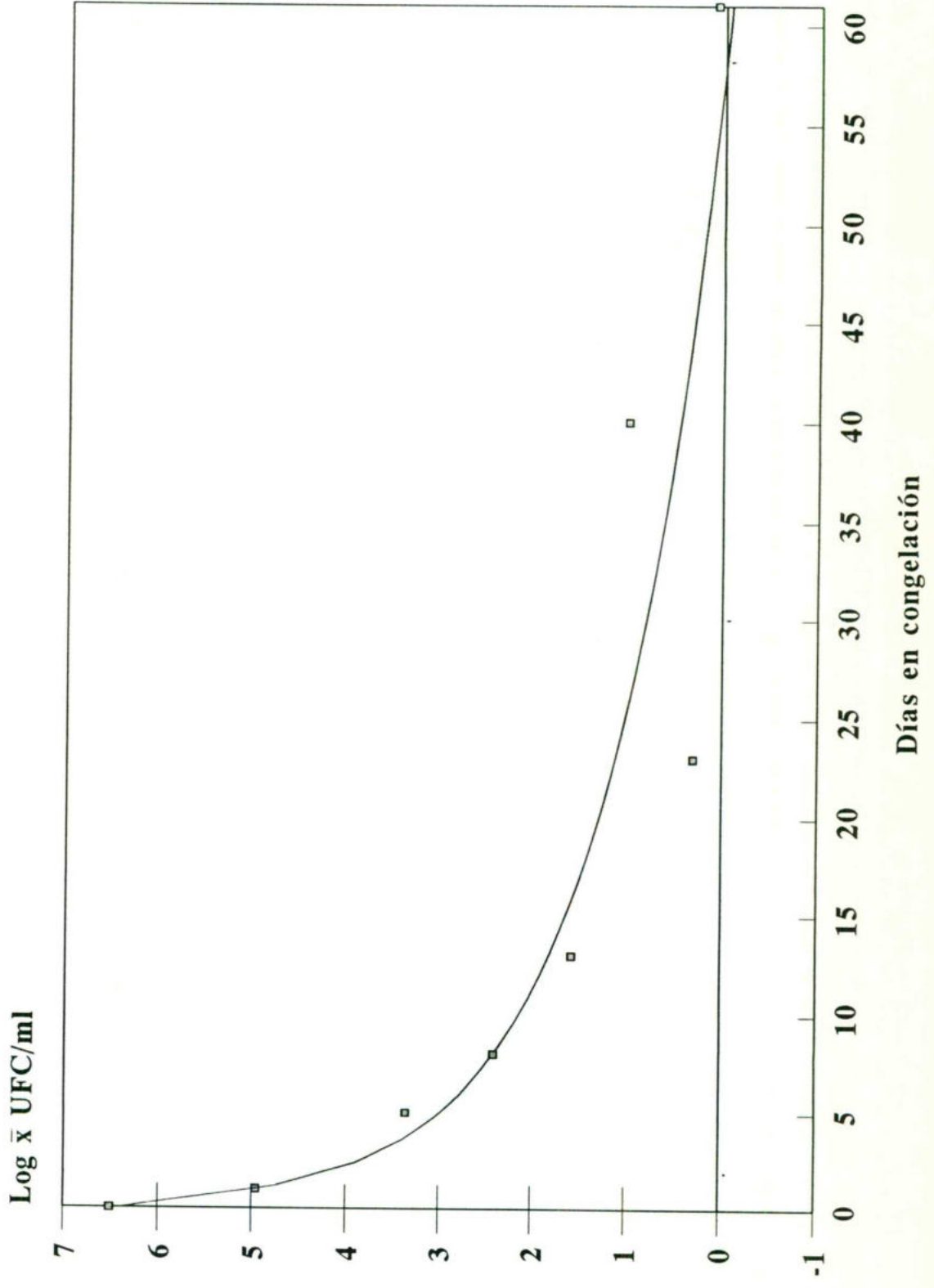


TABLA 16

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
Q#2 CON UN INOCULO INICIAL DE 7.9×10^6 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	7,900,000**	6.90
0	6,700,000	6.83
1	190,000	5.28
6	7,400	3.87
8	5,900	3.77
13	540	2.73
23	260	2.42
34	23	1.36
47	7	0.80
61	6	0.78
69	11	1.04
82	0.60	
91	3.60	0.56
97	0.70	
104	0.50	
117	0.00	
126	0.05	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 9. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Q#2
INOCULO INICIAL DE 7.9×10^6 UFC/ml**

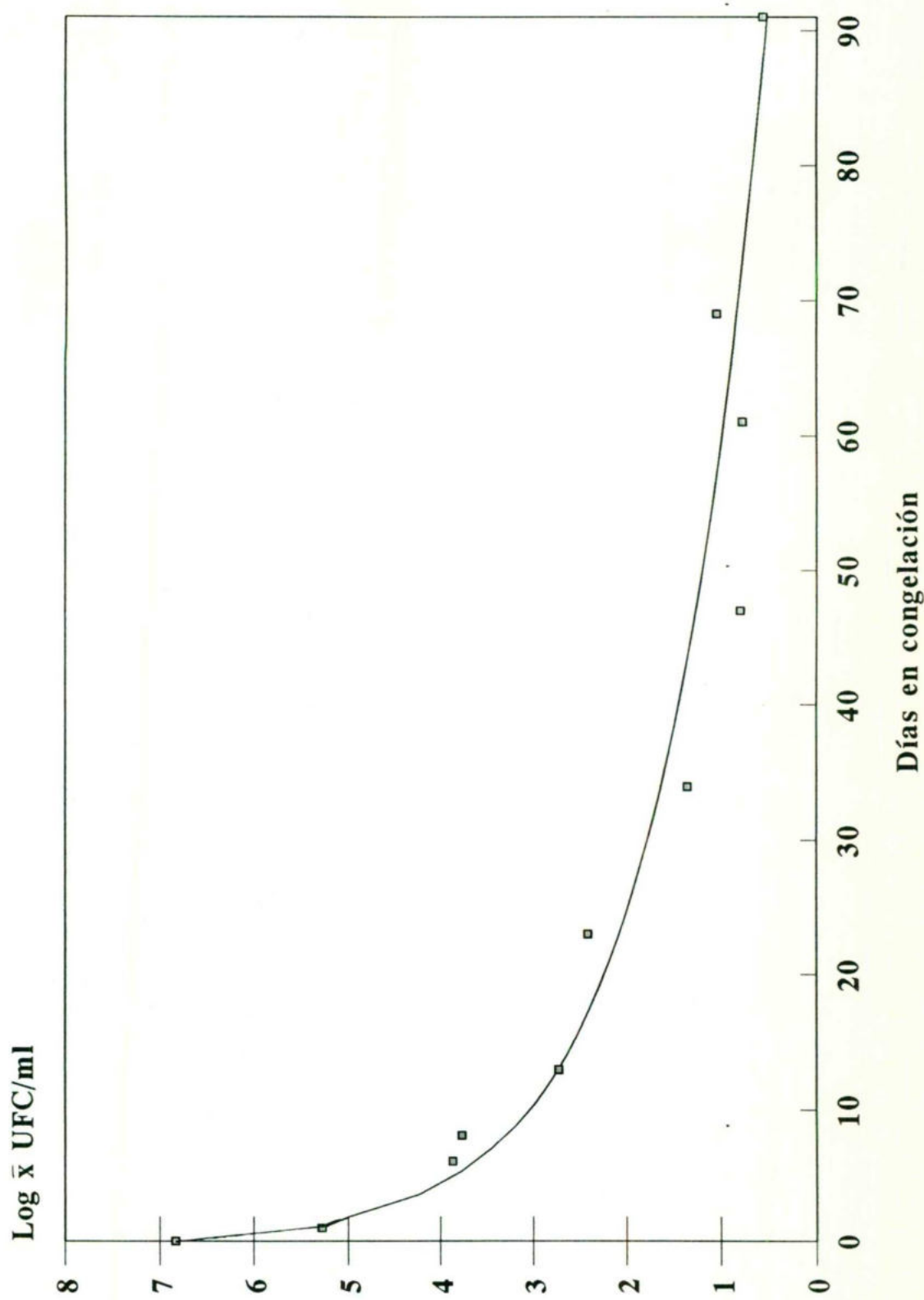


TABLA 23

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
Q#2 CON UN INOCULO INICIAL DE 4.5×10^4 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	45,000**	4.65
0	13,000	4.11
1	560	2.75
5	60	1.78
12	10	1.00
18	34	1.53
25	3	0.48
32	0.00	
39	1.00	0.00
47	0.47	
54	0.27	
60	0.10	
69	0.60	
75	0.03	
82	0.17	
95	0.03	
104	0.03	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 16. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Q#2
INOCULO INICIAL DE 4.5×10^4 UFC/ml**

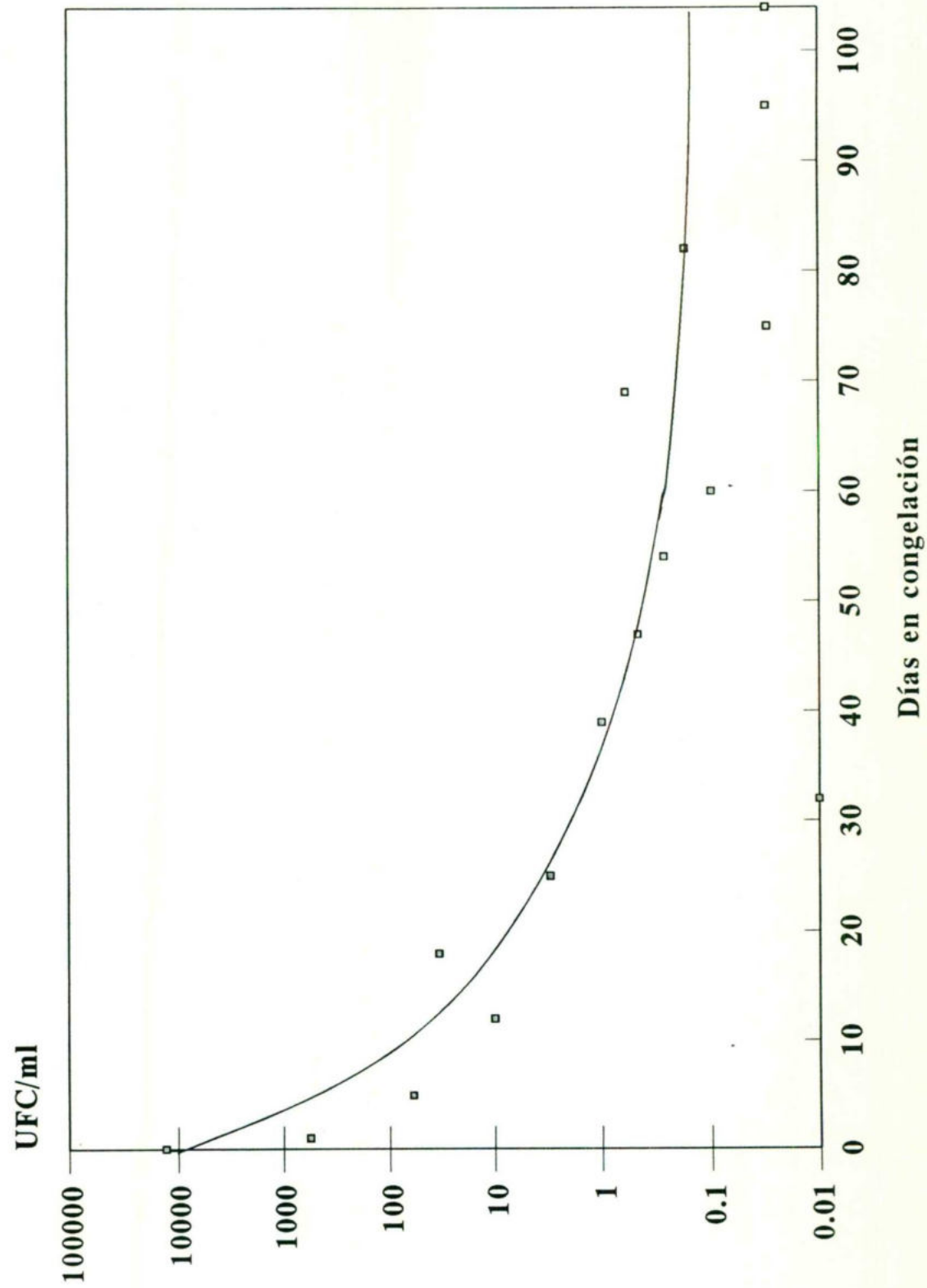


TABLA 24

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
 Tol CON UN INOCULO INICIAL DE 1.2×10^5 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	120,000**	5.08
0	100,000	5.00
1	4,300	3.63
3	1,100	3.04
11	87	1.94
15	50	1.70
23	0.00	
27	0.00	
29	0.00	
41	0.00	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 17. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA Tol
INOCULO INICIAL DE 1.2×10^5 UFC/ml**

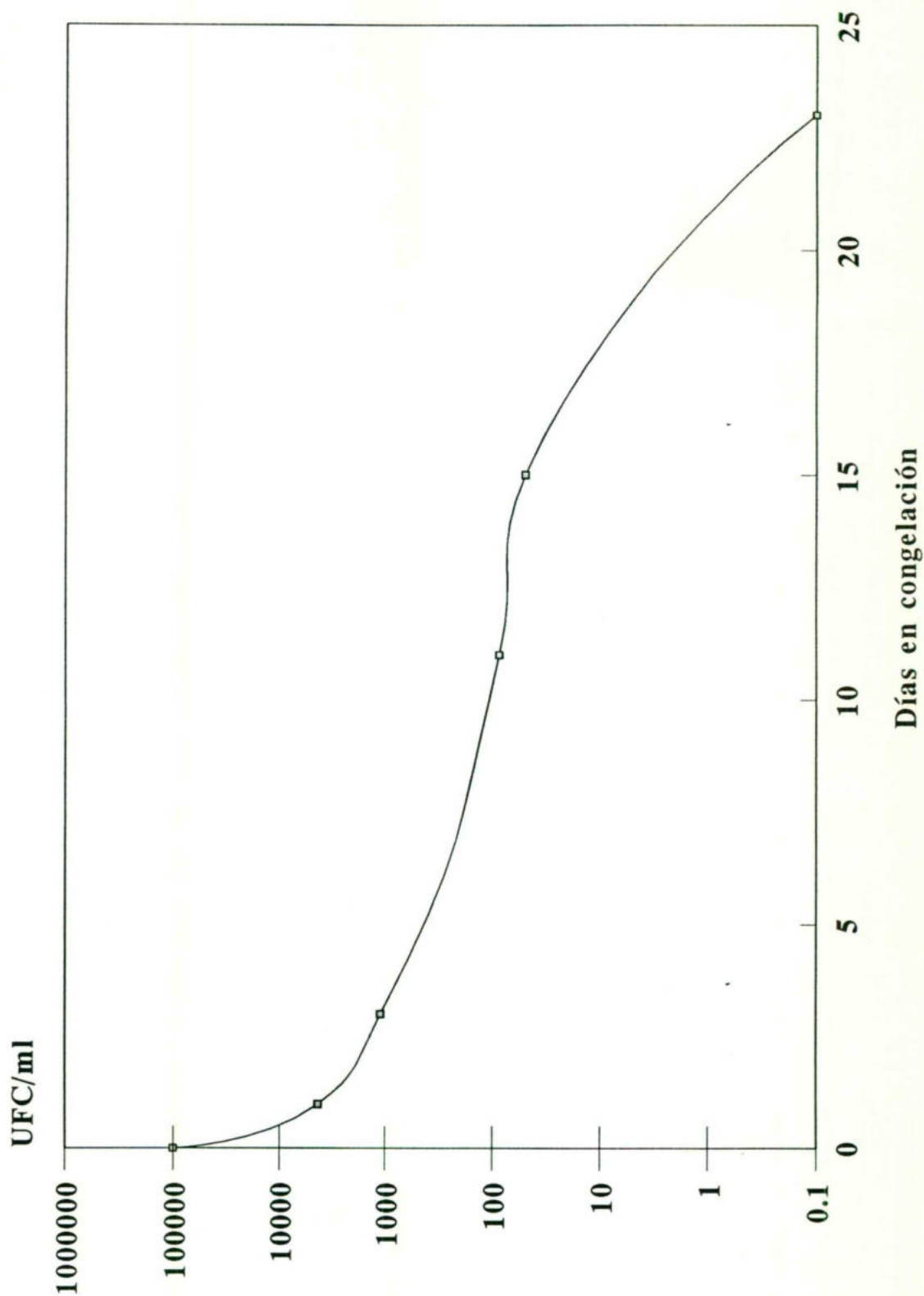


TABLA 25

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-H CON UN INOCULO INICIAL DE 10⁵ UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	100,000**	5.00
0	75,000	4.88
1	1,500	3.18
3	800	2.90
8	140	2.15
13	17	1.23
15	11	1.04
20	0.00	
23	0.03	
27	0.00	
29	0.00	
41	0.00	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 18. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-H INOCULO INICIAL DE 1×10^5 UFC/ml**

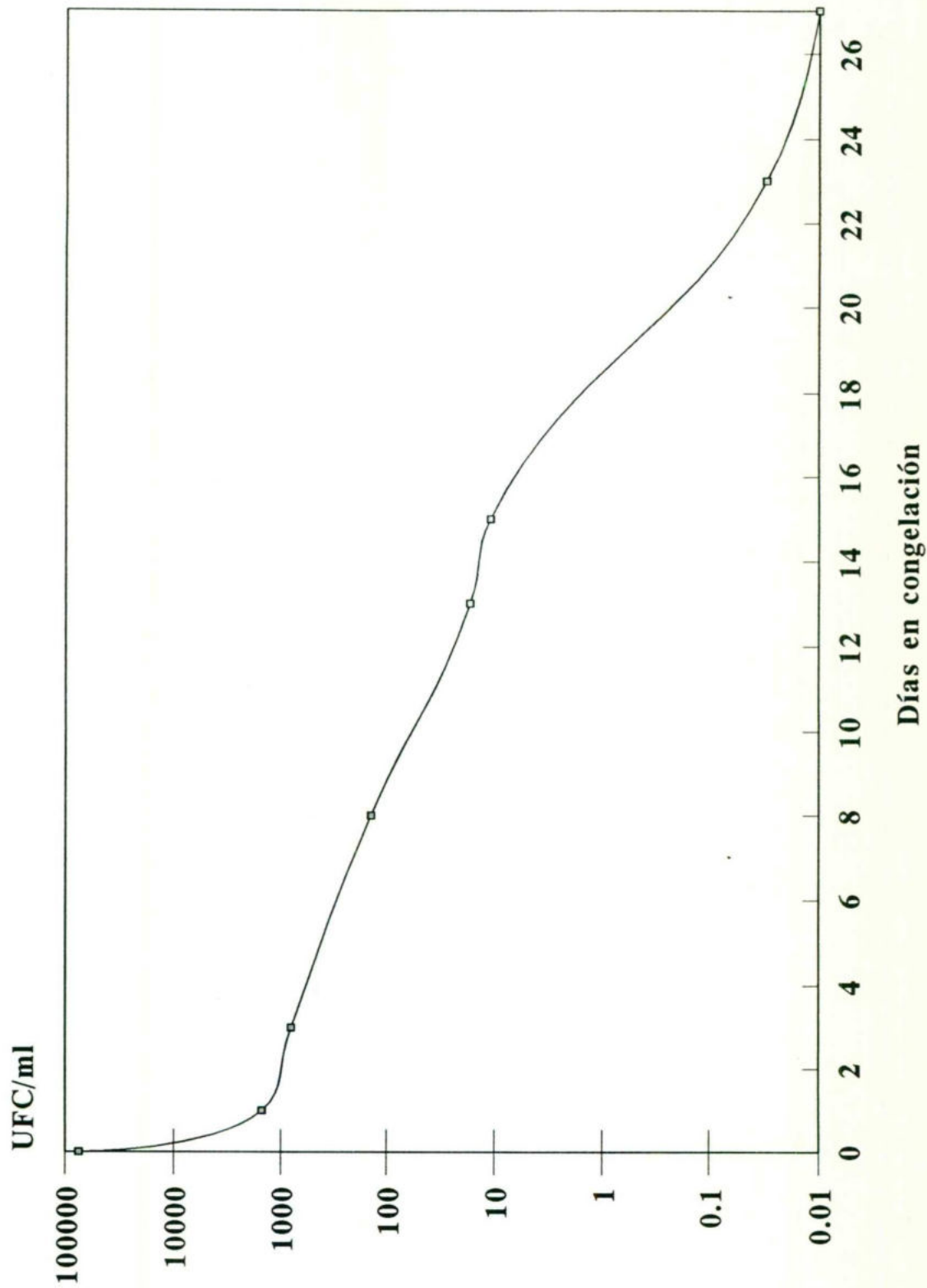


TABLA 26

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-A CON UN INOCULO INICIAL DE 4.8×10^5 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	480,000**	5.56
0	180,000	5.26
1	2,700	3.43
3	760	2.88
8	250	2.40
13	14	1.15
15	33	1.52
23	0.00	
27	0.03	
29	0.00	
41	0.05	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 19. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
SLP-A INOCULO INICIAL DE 4.8×10^5 UFC/ml**

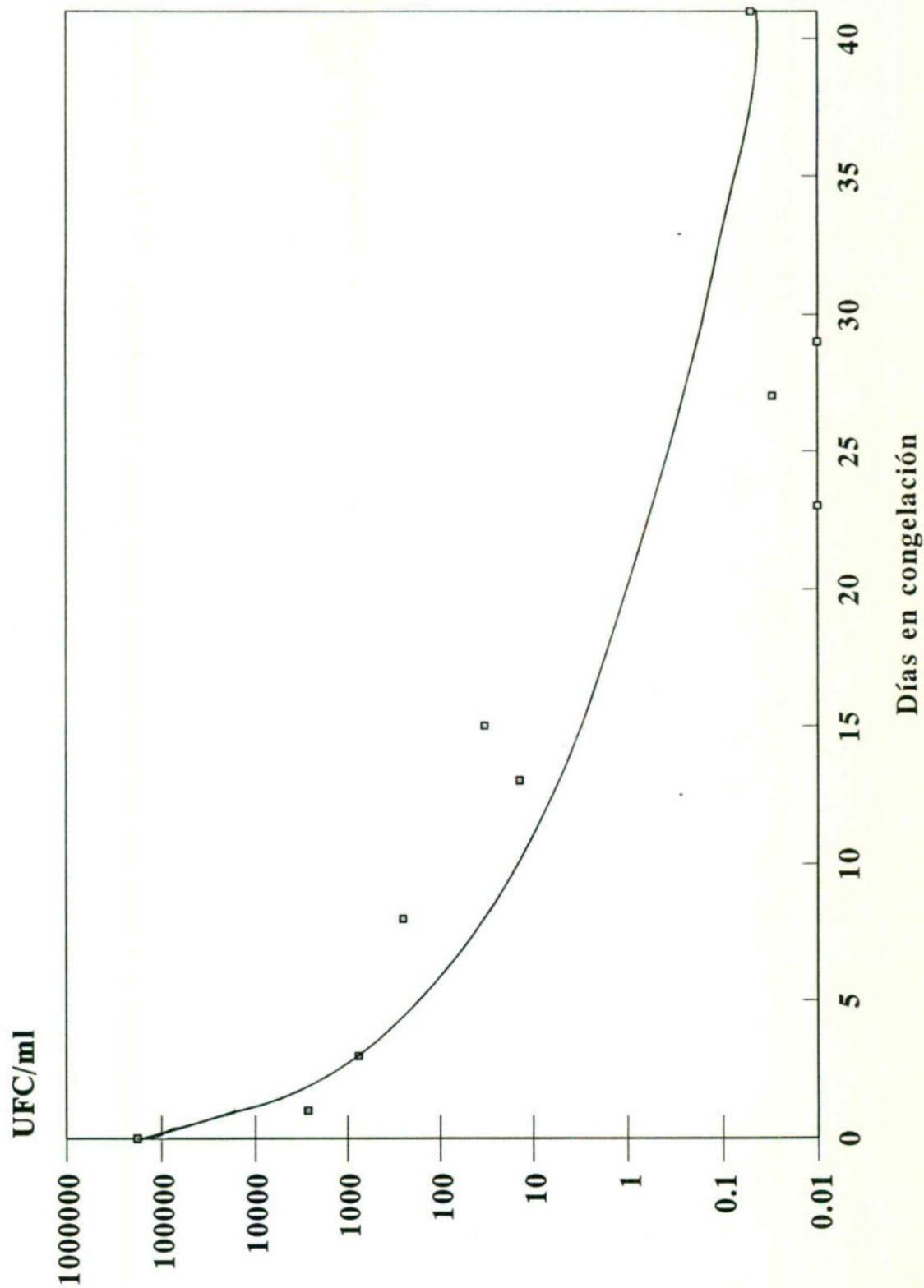


TABLA 27

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
E#1 CON UN INOCULO INICIAL DE 3.4×10^3 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	3,400**	3.53
0	2,700	3.43
1	82	1.91
5	4	0.60
12	0.33	
18	2	0.30
25	0.13	
32	0.03	
39	0.10	
47	0.07	
54	0.13	
60	0.00	
69	0.07	
75	0.00	
82	0.03	
95	0.00	
104	0.00	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 20. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA E#1
INOCULO INICIAL DE 3.4×10^5 UFC/ml**

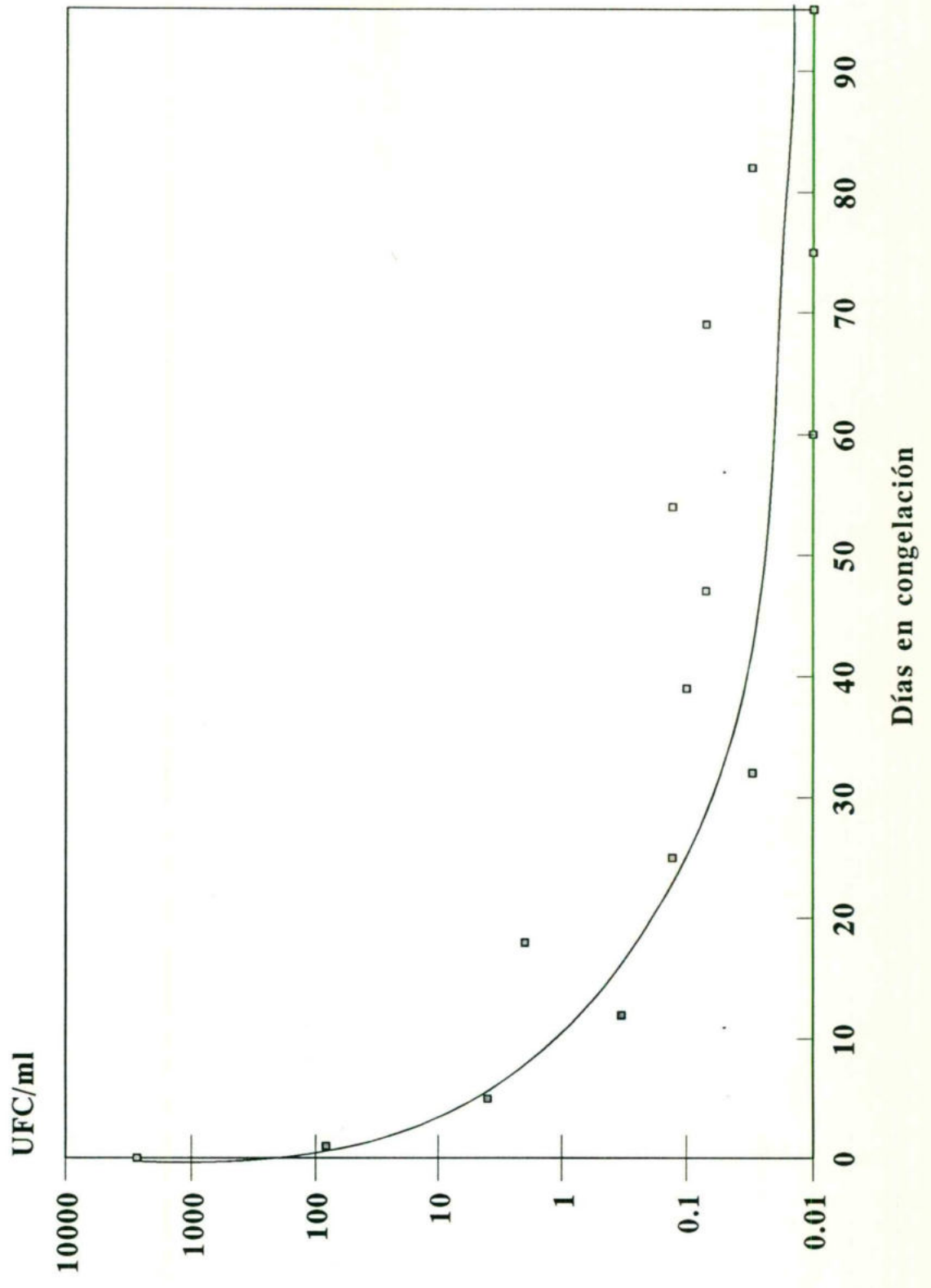


TABLA 28

SOBREVIVENCIA EN CONGELACION A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA
E#2 CON UN INOCULO INICIAL DE 1.6×10^4 UFC/ml

Días de congelación	x* UFC/ml	log x* UFC/ml
	16,000**	4.20
0	9,000	3.95
1	100	2.00
3	15	1.18
5	4	0.60
8	0.00	
11	0.20	
13	0.23	
15	0.13	
21	0.00	
23	0.00	
27	0.00	

* Media de recuentos de tres tubos descongelados

** Recuento previo a la congelación

**GRAFICA 21. SOBREVIVENCIA EN CONGELACION
A -15° EN AGUA PARA BEBIDA DE LA CEPA E#2
INOCULO INICIAL DE 1.6×10^4 UFC/ml**

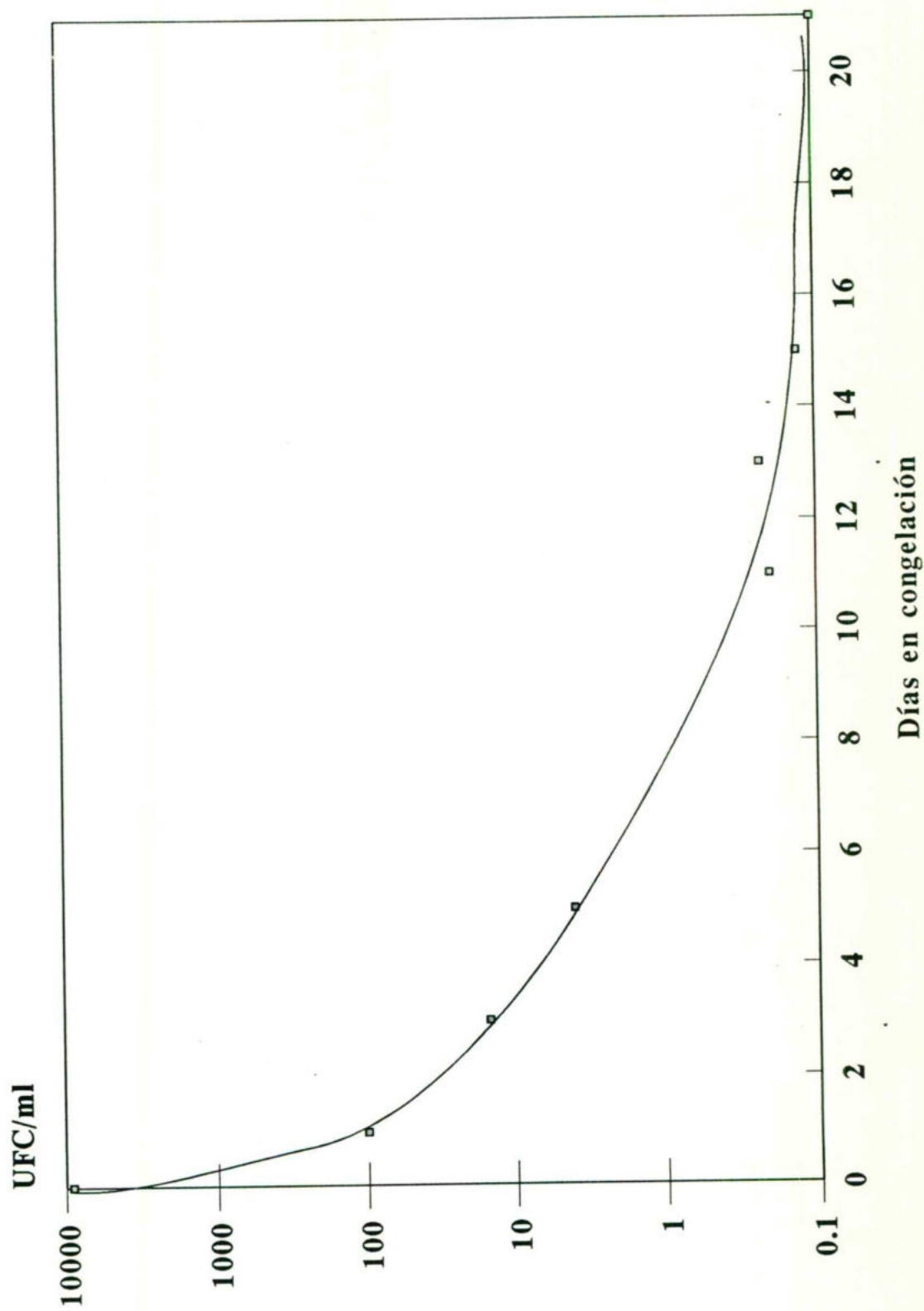


TABLA 29

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL AGUA¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA Q#1

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
20	0	120,000		
45	9.50	110,000		
50	11.17	4,900		
55	12.95	20		
60	14.50	0.2	-	-
65	16.33	0.0	-	-
70	18.42		-	-
93	32.83	EBULLICION		

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

**GRAFICA 22. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA Q#1) AL TRATAMIENTO TERMICO HASTA
EBULLICION DEL AGUA**

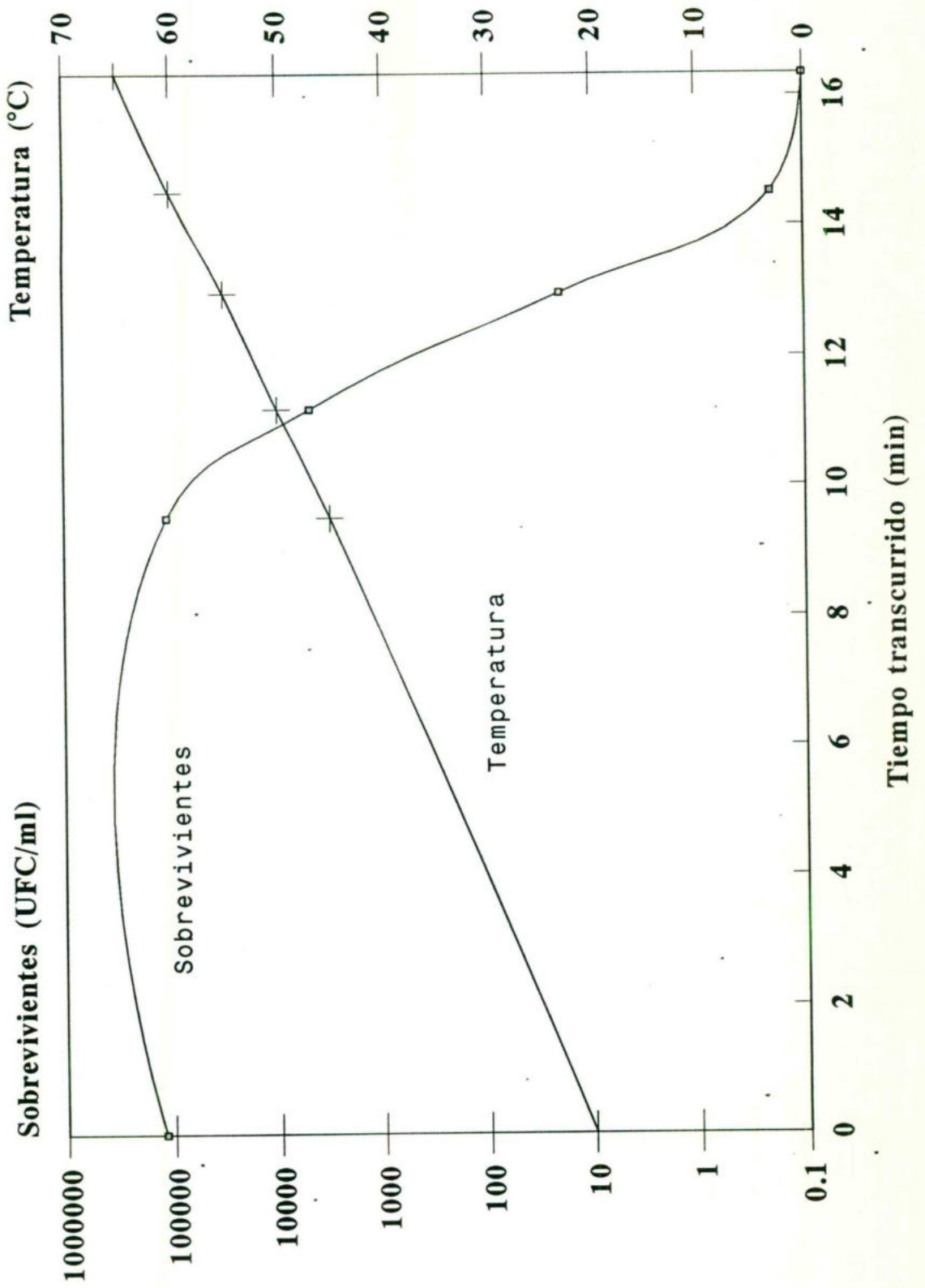


TABLA 30

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL AGUA¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA SLP-A

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
21	0	570,000		
45	7.70	420,000		
50	9.33	8,200		
55	11.08	0		
60	12.92	0	-	-
65	14.72	0	-	-
70	16.50		-	-
93	22.42	EBULLICION		

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

**GRAFICA 23. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA SLP-A) AL TRATAMIENTO TERMICO
HASTA EBULLICION DEL AGUA**

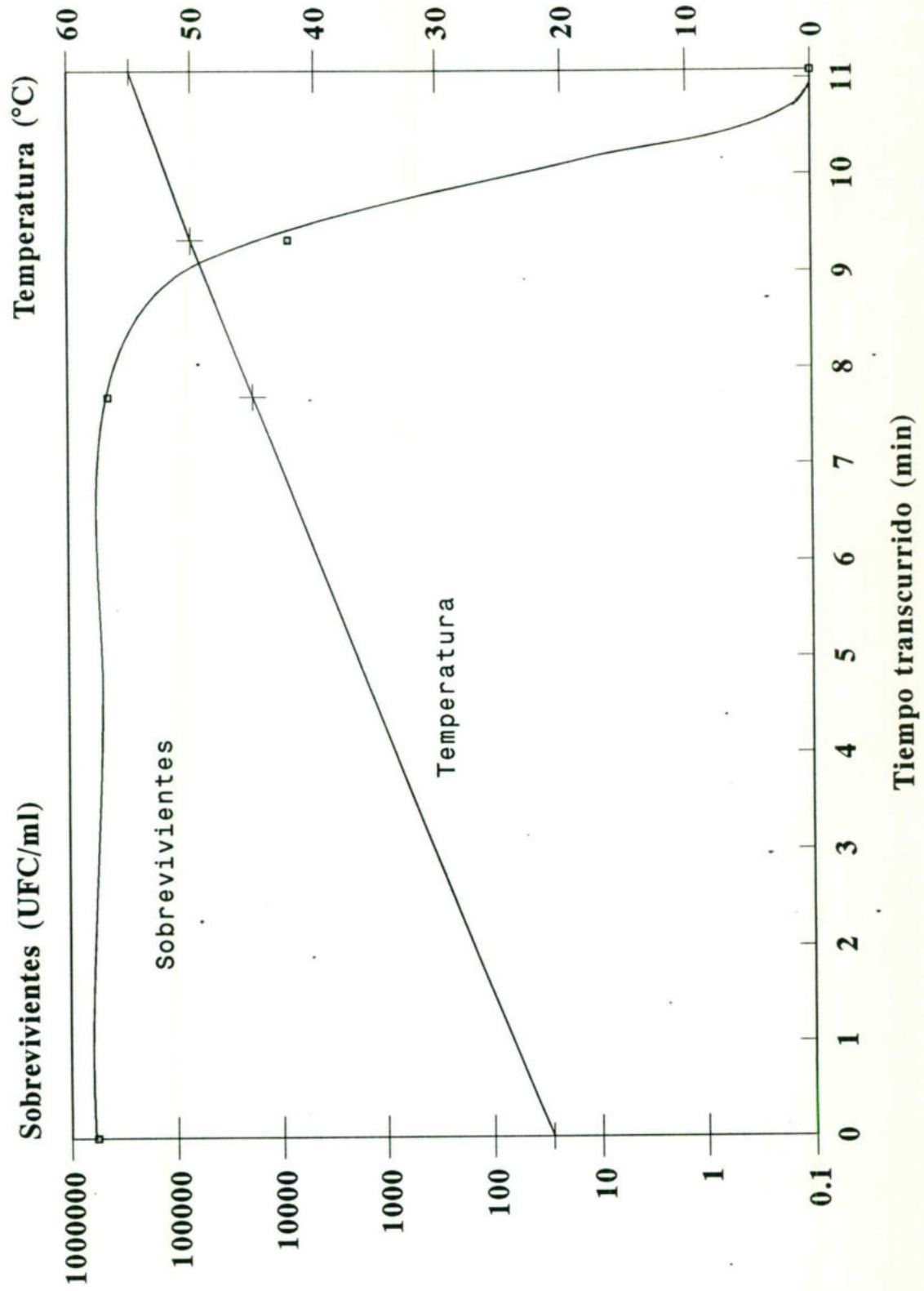


TABLA 31

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL AGUA¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA E#1

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
24.5	0	30,000		
45	8.25	17,000		
50	9.83	290		
55	11.58	0		
62.5	13.55	0	-	-
70	15.83	0	-	-
93	27.67	EBULLICION	-	-
50	47.33	ENFRIAMIENTO ⁴		

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

⁴ Enfriamiento a temperatura ambiente hasta alcanzar 50°

**GRAFICA 24. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA E#1) AL TRATAMIENTO TERMICO HASTA
EBULLICION DEL AGUA**

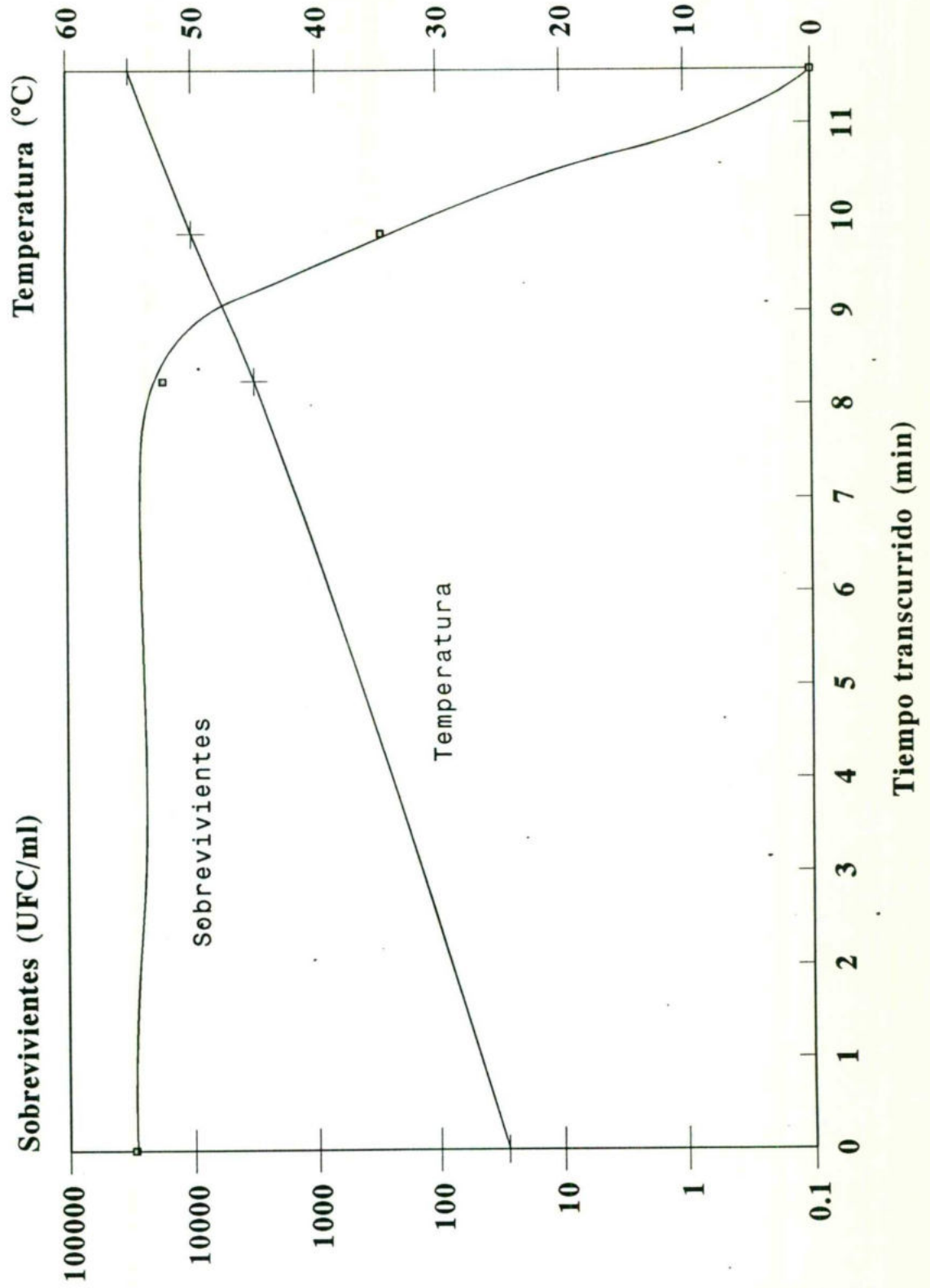


TABLA 32

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL CST¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA Q#1

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
24	0	500,000		
45	5.92	380,000		
50	6.98	150,000		
55	8.05	130		
60	9.32	0.1	-	-
65	10.35	0	-	-
70	11.55		-	-
80	14.20		-	-
96	21.87	EBULLICION		

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

**GRAFICA 25. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA Q#1) AL TRATAMIENTO TERMICO HASTA
EBULLICION DEL CST**

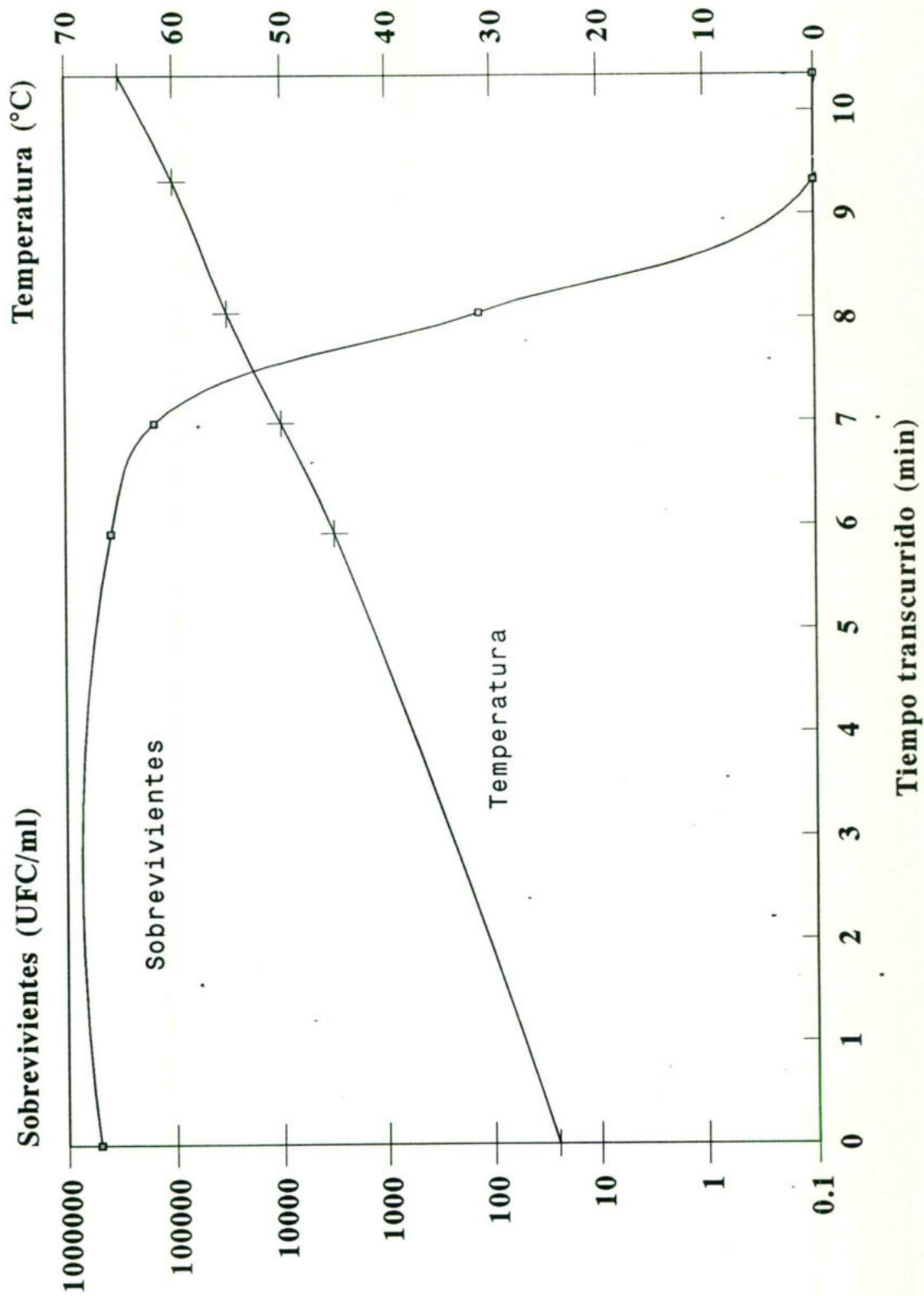


TABLA 33

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL CST¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA SLP-A

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
22.5	0	1,000,000		
45	6.08	840,000		
50	7.17	470,000		
55	8.28	0.1		
60	9.35	0.2	-	-
65	10.43	0.0	-	-
70	11.67		-	-
80	14.12		-	-

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

**GRAFICA 26. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA SLP-A) AL TRATAMIENTO TERMICO
HASTA EBULLICION DEL CST**

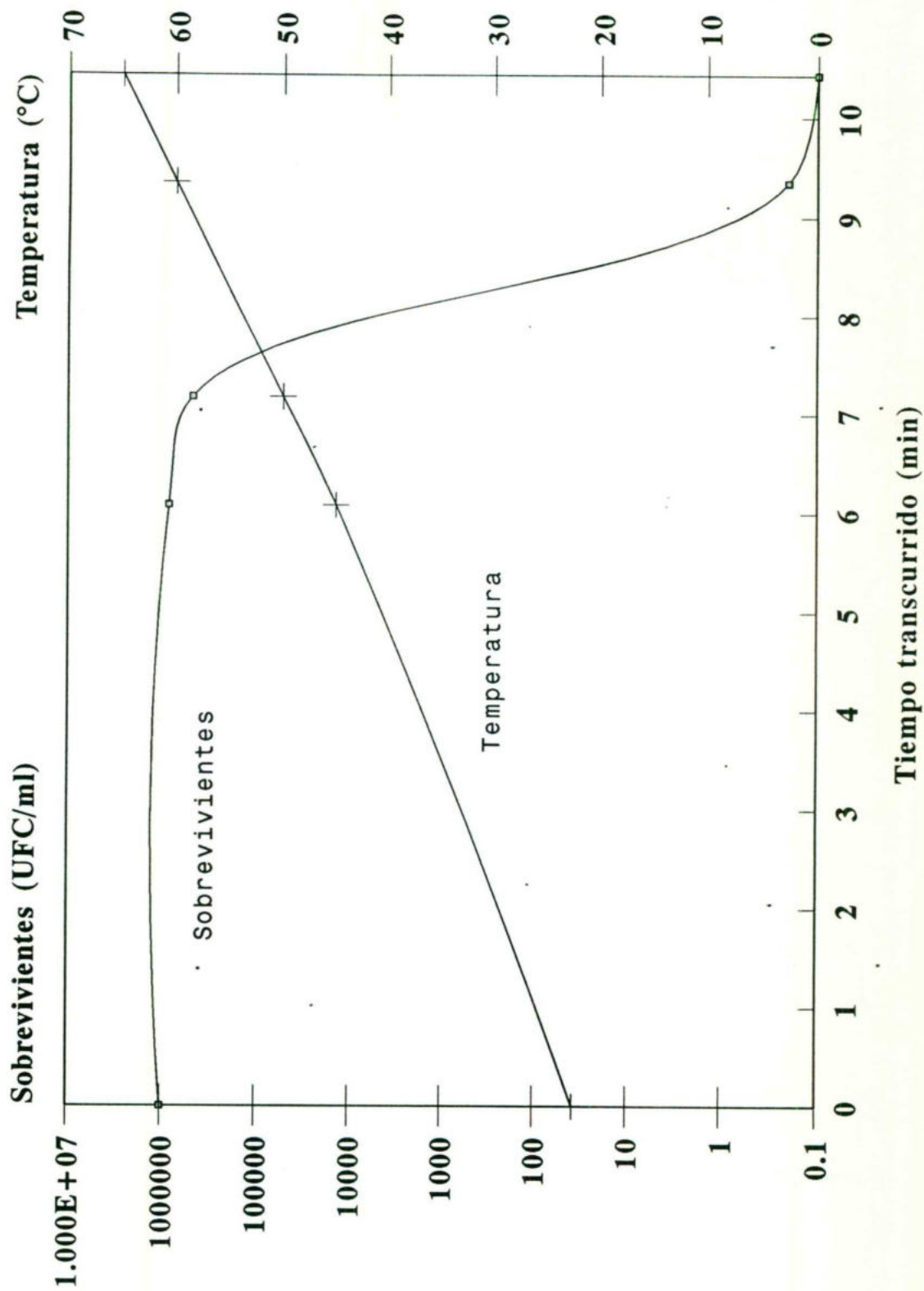


TABLA 34

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO HASTA EBULLICION DEL CST¹ EN LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA E#1

Temperatura (°C)	Tiempo transcurrido (min)	Sobrevivientes ² UFC/ml	Desarrollo en CST ³	
			24 hs	48 hs
22.2	0	190,000		
45	7.58	160,000		
50	9.72	39,000		
55	12.00	13		
60	14.35	0.1	-	-
65	16.87	0.2	-	-
70	19.80		-	-

¹ Volúmen tratado: 2,500 ml contenidos en un recipiente de aluminio

² Media de dos recuentos

³ 10 ml de agua tratada inoculada a 90 ml de CST (duplicado)

**GRAFICA 27. SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae*
(CEPA E#1) AL TRATAMIENTO TERMICO HASTA
EBULLICION DEL CST**

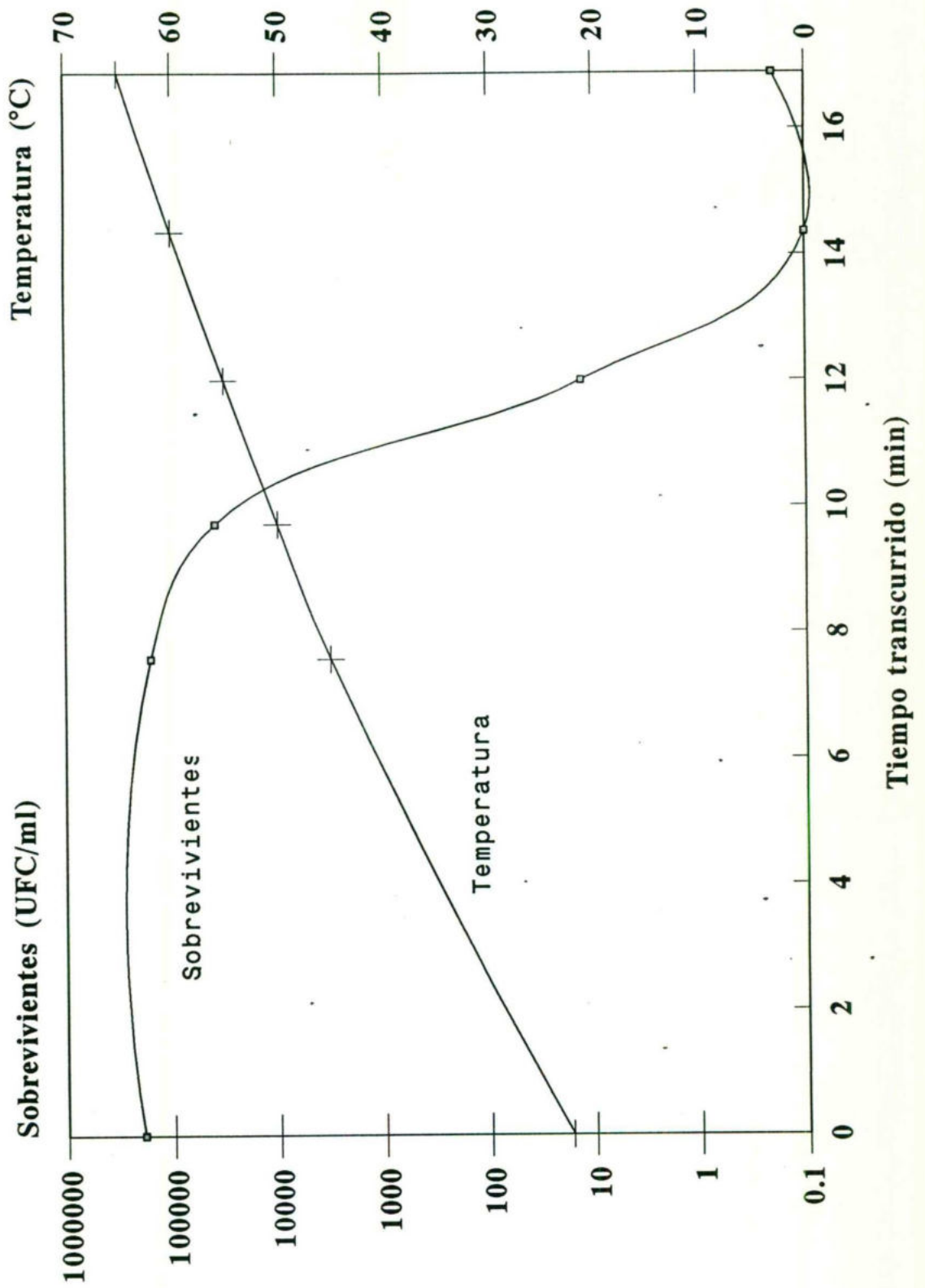


TABLA 35

DESARROLLO DE 7 CEPAS EN CST ADICIONADO DE 3% DE NaCl INCUBADAS A
35° DURANTE 72 HORAS

Cepa	Horas de incubación					
	5	6	7	23	48	72
Q#1	-	-	±	++++±	+++++	+++++
Q#2	-	±	±	++++	+++++	+++++
Tol	-	±	±	++±	+++++	+++++
SLP-H	-	±	±	++±	+++++	+++++
SLP-A	-	±	±	++±	+++++	+++++
E#1	-	-	-	++±	+++++	+++++
E#2	-	-	-	++±	+++++	+++++

Clave

Turbiedad extrema	+++++
Muy turbio	++++
Turbio	+++
Poco turbio	++
Turbiedad leve	+
No turbio	-

**GRAFICA 28. DESARROLLO A 35° DE 7 CEPAS EN
CST ADICIONADO DE 3% DE NaCl INCUBADAS
DURANTE 72 HORAS**

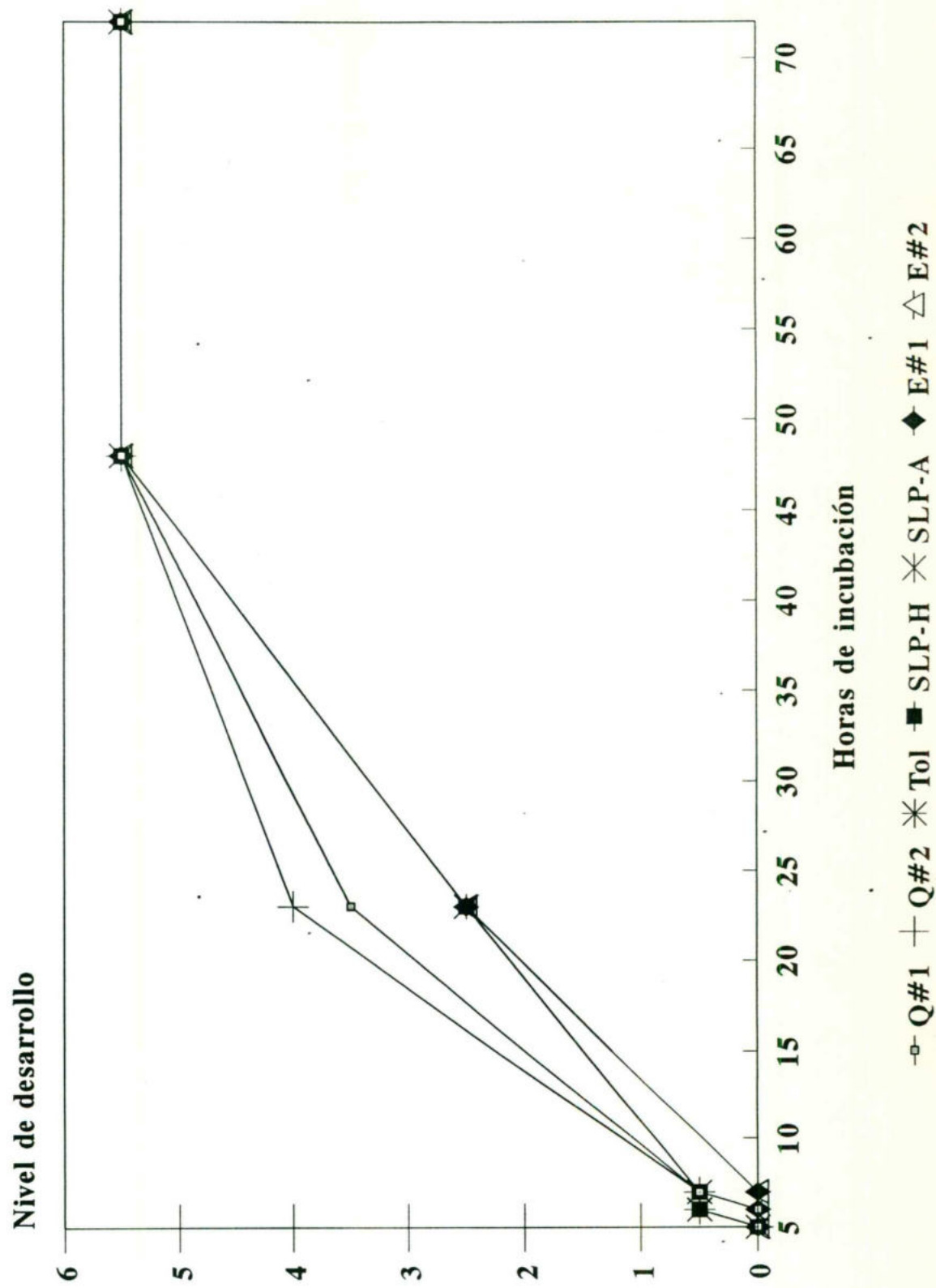


TABLA 36

DESARROLLO DE 7 CEPAS EN CST ADICIONADO DE 6% DE NaCl INCUBADAS A
35° DURANTE 72 HORAS

Cepa	Horas de incubación					
	5	6	7	23	48	72
Q#1	-	-	-	±	±	±
Q#2	-	-	-	±	±	±
Tol	-	-	-	-	±	±
SLP-H	-	-	-	-	±	±
SLP-A	-	-	-	-	±	±
E#1	-	-	-	-	±	±
E#2	-	-	-	±	±	±

Clave

Turbiedad extrema	+++++
Muy turbio	++++
Turbio	+++
Poco turbio	++
Turbiedad leve	+
No turbio	-

DISCUSION

Vibrio cholerae es una bacteria patógena exclusiva del hombre y su vía de transmisión es fecal-oral. Al ser expulsado en las heces fecales puede sobrevivir o desarrollarse de acuerdo con las condiciones prevalentes del medio. Si la situación es favorable puede ingresar en nuevos individuos donde encuentra perspectivas para continuar su ciclo. El periodo que el microorganismo permanece fuera del cuerpo, puede ser decisivo en la propagación de la enfermedad. Es en este periodo donde las medidas de prevención y control encuentran su máxima eficiencia. Por tal razón es importante conocer la susceptibilidad de esta bacteria a diversos factores ambientales.

Un antecedente para la realización de esta evaluación es el estudio del comportamiento del microorganismo en un medio de cultivo en condiciones apropiadas para su desarrollo. Con tal propósito se coloca al microorganismo en un medio de cultivo líquido idóneo en el cual se multiplica siguiendo un patrón que se sucede de manera consistente. Aunque el conjunto de condiciones óptimas no se presenta en la práctica, este modelo expresa los términos en los que el vibrio se multiplica ordinariamente. Se siguió la actividad durante 24 horas de las siete cepas incluidas en el trabajo.

Típicamente al iniciar su desarrollo, las bacterias pasan por una etapa de acondicionamiento al substrato (Fase lag), antes de entrar en una etapa de muy activa multiplicación en donde el tiempo de generación es mínimo. Durante esa primera etapa puede haber un discreto decremento en el número de células viables que se incorporan al medio ⁽¹⁸⁾. La fase logarítmica por otra parte suele consistir en una recta que permite fácilmente calcular el tiempo de generación (G).

En las gráficas 1-7 se ilustra la situación antes descrita. Los tiempos de generación calculados para las siete cepas estudiadas oscilan entre 18.76 y 29.31 minutos. Para su estimación se presentó el inconveniente de una extrema susceptibilidad del microorganismo al agua peptonada como diluyente que utilizamos cuando se lleva a cabo la técnica de recuento.

En efecto, el desarrollo mostró una caída muy acentuada que aparentemente inicia hacia los 60 minutos de incubación, excepto en la cepa Serotipo Ogawa (FDA) en la que la caída es menos marcada (Tablas 1-7). Esta observación no coincide con el modelo clásico de curva de desarrollo microbiano.

El trazo de la curva está evidentemente determinado por la selección de los tiempos en los que se practicó el recuento 0, 1, 3, 5 horas. Aunque procuramos siempre introducir el mismo número de microorganismos para cada cepa, el nivel de inóculo varió de 15 a 2500. El máximo en la caída del número de células viables lo ubicamos hacia las 3 horas de incubación, cuando había disminuido hasta 95 e incluso menos de 10/ml. Este comportamiento imposibilita efectuar un cálculo matemático consistente para determinar los tiempos de generación, puesto que el límite inferior (B) no queda bien definido. En consecuencia llevamos a cabo un estudio más detallado durante las primeras 4 horas de incubación que permitiera definir la dinámica del microorganismo durante la fase lag, durante esa fase se estudiaron las cepas que presentaron una caída más pronunciada (Q#2 y SLP-A). Se modificó el experimento acortando el intervalo de tiempo de muestreo a media hora entre las 2 y 4 de incubación. Como se había observado una disminución en el número de microorganismos en este lapso se optó por efectuar recuentos directos y de las primeras diluciones. Los resultados de este experimento mostraron una marcada desproporción entre los recuentos practicados cuando el inóculo se deposita directamente en las placas con respecto a una inoculación previa dilución en agua peptonada (Tablas 8 y 9). Es posible que el diluyente estuviera ejerciendo un efecto letal sobre el microorganismo, justamente durante la fase lag. Es bien sabido que las bacterias en esta etapa se muestran hipersensibles a factores extrínsecos que no se presentan en células jóvenes de los cultivos.

El diluyente de peptona aunque confiere protección a las células contra el efecto letal de algunos iones y sustancias nocivas, carece de la isotonicidad que requieren algunas bacterias hipersensibles como las de las cepas que estudiamos.

En consecuencia se tomaron para el recuento porciones del cultivo a intervalos más cortos, entre las 2.5 y 3.5 horas de iniciada la incubación. La técnica se realizó entonces colocando en las cajas directamente los inóculos (0.1ml) por una parte, y por otra el mismo inóculo expuesto al diluyente (1ml de la dilución 1:10). Aparentemente el diluyente tiene un efecto letal sobre el microorganismo ya que al examinar fracciones iguales de inóculo por cada alternativa, los recuentos no resultaron razonablemente equivalentes (Tablas 10 y 11). A las 3 horas de incubación hay un desarrollo masivo (más de 10,000/ml) en las placas inoculadas sin dilución previa. Al introducir el diluyente en la primera dilución el número de colonias desarrolladas tiende a cero. Es evidente la falta de proporcionalidad. Hacia las 3.5-5 horas, aparentemente las mermas de estos recuentos ya no alcanzan la misma magnitud.

Se plantearon dos explicaciones al fenómeno observado:

- a) El diluyente de peptona contiene sustancias tóxicas para el microorganismo
- b) El diluyente de peptona, por su baja concentración de solutos, provoca un choque osmótico que afecta la viabilidad de las células.

Para probar si alguno, ambos o ninguno de los planteamientos eran los factores determinantes, en un nuevo estudio se incluyeron varios diluyentes. El posible efecto tóxico del diluyente de peptona solo puede asociarse con el agua en la que se disuelve o con la propia peptona. Utilizamos agua tridestilada en la preparación del diluyente con el fin de excluir esa hipotética sustancia tóxica en el agua. Para probar si existía o no un choque osmótico, se utilizaron como diluyentes: a) CST (el medio en el que se desarrolla el microorganismo) esperando con ello una condición favorable a la vitalidad de las células; b) Diluyente de peptona preparado con agua tridestilada adicionado de 0.85% de NaCl para lograr la isotonicidad de la solución; c) Se incluyó también el diluyente de peptona original.

El estudio se completó recurriendo a microinóculos directos del cultivo para prescindir de cualquier tipo de diluyente. En esta parte del experimento se utilizó únicamente la cepa Q#2.

En base a los resultados que se muestran en las Tablas 11-A.1 y 11-A.2 se puede concluir que la desproporción en los recuentos está determinada por el efecto hipotónico del diluyente de peptona. Cuando se usa como diluyente CST y agua peptonada adicionada de 0.85% de NaCl, los recuentos no son significativamente diferentes con respecto a los recuentos realizados con inóculos en los que se prescindió de diluyente (uso de micropipeta). Podemos asumir que el uso de CST y agua peptonada con NaCl como diluyentes no muestran los inconvenientes del agua peptonada simple para el recuento de *Vibrio cholerae* al inicio de la incubación de los cultivos.

Con los resultados obtenidos de los recuentos (Tabla 11-A.1) usando CST y agua peptonada salina como diluyente, calculamos el tiempo de generación para la cepa Q#2. Se calculó también el tiempo de generación con los datos de los recuentos sin diluyente (Tabla 10). Los valores así obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Al graficar los datos de los recuentos sin diluyente, con CST y agua peptonada con NaCl como diluyentes, la curva de desarrollo resultante se ajusta mejor al modelo clásico de desarrollo bacteriano. La fase de adaptación es menor de 1 hora, ya que todos los recuentos efectuados en esta hora son mayores que los recuentos iniciales. Esto es razonable, ya que en el medio en el que se desarrolla es el mismo del cual proviene. Se deduce también que la fase logarítmica de desarrollo se extiende de 1 a 7 horas. De la observación de las curvas de crecimiento parecería que el número de microorganismos inicial utilizado para el cálculo de tiempo de generación (B), podía ser el correspondiente a la primera hora de incubación y el segundo valor (b) el obtenido a las 7 horas. Sin embargo los valores de los tiempos así calculados (Tabla 13) son superiores a los obtenidos con los tiempos seleccionados en periodos más estrechos (2-5 horas).

Creemos que las cifras reales de los tiempos de generación consignados en la Tabla 13 se encuentran excedidos en una proporción similar a la que observamos para la cepa Q#2 de la Tabla 12. La magnitud del error en el que incurrimos para calcular los tiempos de generación de la Tabla 13 podemos estimarlo aproximadamente en +20%, esto es, el porcentaje de la diferencia entre el tiempo de generación calculado a la 1 y 7 horas, con respecto a la media de los obtenidos con el uso de los diluyentes que no mostraron efecto antimicrobiano.

Debe destacarse la diferencia en el comportamiento de las cepas de referencia (FDA) con respecto a las cepas nacionales. Las primeras exhiben tiempos de generación mayores. Entre las segundas los valores se encuentran próximos, excepto para la cepa ambiental (SLP-A), que se mostró más activa.

La evaluación de la toxicidad del agua se realizó con el fin de determinar su idoneidad y poderla utilizar posteriormente en el estudio del efecto de la congelación y el tratamiento térmico sobre *Vibrio cholerae*.

Como premisa, debe excluirse cualquier efecto tóxico imputable al agua, a fin de interpretar de manera más consistente los resultados de los recuentos durante el almacenamiento del agua congelada o de su ebullición.

Los efectos tóxicos del agua sobre una bacteria generalmente se manifiestan durante los primeros 45 minutos de contacto ⁽¹⁷⁾. Si durante este periodo no se observan cambios significativos se considera que no existirá un daño posterior. El tiempo de contacto durante la prueba transcurre mientras se mantiene la temperatura a 35°.

Incluimos además de 2 cepas de *V. cholerae*, una cepa de *E. coli*, que es un microorganismo ampliamente usado como referencia en la microbiología sanitaria del agua.

Las diferencias observadas en los recuentos al cabo de 0, 15, 30 y 45 minutos no son mayores que los obtenidos en los duplicados correspondientes. Concluimos en consecuencia que la fuente de agua utilizada es propia para efectuar el estudio de sobrevivencia de *Vibrio cholerae* a la congelación y ebullición.

La sobrevivencia de *V. cholerae* a la congelación en agua para bebida puede verse afectada durante el mismo proceso de congelación (que incluye la velocidad y la temperatura a la que ocurre), durante el almacenamiento en congelación y durante la descongelación.⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Las poblaciones bacterianas no son uniformes. Ante un factor específico, como la congelación, existe una proporción que muestra una hipersensibilidad y otra notablemente resistente. El efecto letal de la congelación y la descongelación se estiman al efectuar los recuentos de las células sobrevivientes durante los primeros periodos del estudio. Conforme transcurre el tiempo, las células con mayor resistencia se van seleccionando. Inicialmente el daño es subletal⁽¹⁾. Las células implicadas no desarrollan en los medios selectivos que comúnmente se utilizan para aislar al microorganismo del medio ambiente, pero lo hacen en medio libre de inhibidores. Si se colocan las células dañadas en un medio favorable generalmente hay una recuperación, y tras una división celular la progenie ha recuperado las características propias de la cepa de la cual proviene.

El patrón de destrucción del microorganismo por efecto de la congelación se muestra en las Tablas 15-28. El número de microorganismos viables disminuye a casi la mitad inmediatamente después de que visualmente se aprecia una total congelación (65-80 minutos según el inóculo inicial). Después del primer día el número ha decrecido en 1 ó 2 unidades logarítmicas. Este comportamiento se debe a que aún cuando se observa visiblemente la congelación total, ésta se consolida en el transcurso de las siguientes horas, dañando a un gran número de microorganismos (Gráficas 8-21). La disminución en los días posteriores es menos marcada y la sobrevivencia/ml se extiende hasta 30-90 días para un inóculo inicial de 10^6 células viables/ml. En el caso de inóculos bajos (10^4 aprox.) la tendencia es muy similar pero el tiempo durante el

cual aún se obtienen recuentos en inóculos de 1 ml es mucho menor: en tres de las cepas se requieren 23 días aproximadamente para obtener placas libres de colonias con inóculos de 1 ml. En otras tres en menos de 12 días se tienen 0 UFC/ml. La cepa Q#2 permanece viable hasta 40 días de congelación.

Sin embargo, cuando a partir de entonces las placas se inoculan con volúmenes mayores de 1 ml continúa la recuperación del microorganismo por hasta 126 y 104 días cuando se utilizan muestras con inóculo alto e inóculo bajo respectivamente (Tablas 15-28). El significado epidemiológico de esta observación debe ser destacado. La inocuidad de las muestras que exhiben 0 UFC inoculando 1 ml de agua en las placas de cultivo es engañosa. Puede existir 1 célula/2ml (compatible con 0/ml), con evidente riesgo si se consumen 200 ml ó más de agua. En tal caso, el número de células viables actualmente ingeridas puede ser de más de 100. Estudios efectuados en Bangladesh sugieren que la dosis infectante de este microorganismo puede llegar a ser tan baja como 100 células. ⁽¹⁴⁾

Debe tomarse en consideración además que la muerte celular del *Vibrio cholerae* en condiciones naturales no sigue exactamente este patrón. La presencia de materia orgánica que generalmente acompaña al microorganismo cuando contamina el agua, podría tener un efecto protector y extender la sobrevivencia por periodos mayores.

Es evidente que la congelación aunque merma progresivamente el contenido de *V. cholerae* en el agua, no constituye un efecto confiable en la autodepuración y pérdida del riesgo asociado con su consumo.

Está ampliamente reconocido, por otra parte que la ebullición es la medida más eficiente para proveerse de agua libre de riesgos microbianos aún en regiones de alta endemicidad de enfermedades transmitidas por el agua.

Se suele insistir en mantener el tratamiento durante 10 minutos "por lo menos". La temperatura de ebullición del agua aún en regiones de gran altitud en el país generalmente rebasa los 85°. En la ciudad de Querétaro el agua hierve aproximadamente a 91-93°.

La muerte bacteriana ante estos tratamientos es logarítmica. Supongamos que la población inicial es de 1 millón de bacterias. Al final de la primera unidad de tiempo (valor D) ha muerto el 90% y quedan 100,000 supervivientes. Al final de la segunda unidad de tiempo ha muerto otro 90%, quedando 10,000 vivas. Este régimen de mortalidad ordenado y regular se mantiene hasta la extinción de la población.⁽³⁾

Vibrio cholerae es un microorganismo termosensible que se inactiva fácilmente a temperaturas de pasteurización⁽⁹⁾. El efecto letal se inicia cuando la temperatura se aproxima a los 50°. En nuestro estudio observamos una drástica disminución en el número de sobrevivientes entre los 50 y 55° para las tres cepas estudiadas (Tablas 29-31).

Debido al relativamente elevado volumen de agua (2.5 litros) utilizado en el experimento, la concentración inicial de vibrios tan solo se encontraba próxima a 500,000 UFC/ml (la cepa Inaba mostró un desarrollo más discreto en el cultivo previo al inóculo y por ello la concentración inicial fué considerablemente mayor). En cualquier caso la recuperación de sobrevivientes durante el tratamiento térmico llegó a cero cuando la temperatura se había elevado a 55° para dos de las cepas y a 65° para la tercera cepa probada. Para entonces el tiempo de calentamiento transcurrido era de 11 y 16 minutos respectivamente. El tiempo requerido para llegar a la ebullición osciló entre 22 y 32 minutos, lapso durante el cual el efecto antimicrobiano no solo mantenía la tasa de muerte, sino que la incrementaba progresivamente.

En la Tabla 31 se aprecia que conservando a temperatura ambiente el recipiente transcurrirán 20 minutos para alcanzar un enfriamiento a 50°. En otras palabras, el agua se mantuvo a una temperatura letal para el *V. cholerae* por espacio de 40 minutos aproximadamente. Esta observación pone de manifiesto lo innecesario de la recomendación de mantener la ebullición

del agua durante 10 minutos. Hay que indicar que el experimento se realizó utilizando agua limpia. Cuando ésta se encuentra contaminada con materia orgánica es de esperar un efecto protector para los microorganismos, de manera que fuentes de agua no limpias requerirán un tratamiento térmico más energético, si bien en tales casos, podrán esperarse niveles mayores de contaminación. Cuando el líquido de suspensión de los microorganismos, consistió en el propio CST, el periodo de sobrevivencia se extendió por mayor tiempo para las tres cepas probadas (Tablas 32-34). Aún así, cuando la temperatura era de 65° el microorganismo se encontraba ausente en porciones de 1 y hasta de 10ml. El nivel de tratamiento aplicado (suspensión del calentamiento al iniciar la ebullición) al agua en las condiciones del experimento que comentamos sugiere un amplio margen de seguridad aún para estos microorganismos.

La tolerancia al cloruro de sodio fué estudiada en CST. Es interesante conocer por una parte la mayor concentración de NaCl a la cual las cepas inician su desarrollo, y por otra parte la menor concentración a la cual no se observa desarrollo. Del mismo modo es importante determinar la ocurrencia de estos eventos en periodos definidos de incubación de los cultivos.

Desafortunadamente el método utilizado para apreciar el desarrollo fué visual, lo que impidió detectar pequeñas diferencias entre las cepas hacia las distintas concentraciones de NaCl. Sin embargo la ausencia de desarrollo y el inicio de éste, fueron claramente distintivos.

En general el comportamiento de las cepas fué muy similar; cuando el CST se adicionó de 0 y 1% de NaCl, hubo desarrollo libre y máximo de todas las cepas; al 9% no se observó desarrollo aún después de 72 horas de incubación. Al adicionar el caldo 3 y 6% se apreciaron ligeras diferencias que nos permiten hacer las siguientes observaciones:

I. En CST adicionado de 3% de NaCl:

- Ninguna cepa mostró desarrollo (turbiedad) a las 5 horas de incubación.
- Todas las cepas presentaban un desarrollo intenso a las 48 horas de incubación.
- Las cepas Q#1, E#1 y E#2 no habían iniciado desarrollo a las 6 horas de incubación.

- Únicamente las cepas E#1 y E#2 no habían iniciado el desarrollo a las 7 horas.
- Las cepas Q#1 y Q#2 mostraron mayor desarrollo a las 24 horas de incubación. Las restantes presentaron un desarrollo moderado.

II. En CST adicionado de 6% de NaCl:

- Ninguna cepa había iniciado desarrollo hasta las 7 horas de incubación.
- Únicamente las cepas Q#1, Q#2 y E#2 presentaban inicio de desarrollo a las 24 horas de incubación.
- A partir de las 48 horas todas mostraban indicios de actividad sin embargo, aún después de 72 horas el nivel de desarrollo fué escaso y similar para todas las cepas.

Aparentemente las cepas aisladas en el país mostraron una ligera mayor tolerancia al NaCl en el medio de cultivo con respecto a las dos cepas de referencia obtenidas de la FDA. Es recomendable realizar estudios con un mayor grado de refinamiento para confirmar y medir con más exactitud el efecto del NaCl sobre el desarrollo de *V. cholerae*.

CONCLUSIONES

1. Las cepas estudiadas muestran una desusual sensibilidad al choque osmótico durante la fase lag. A diferencia de las cepas en etapas posteriores, en presencia de agua peptonada sufren una inactivación total. Esta limitación para el recuento se resuelve haciendo uso de agua peptonada salina o caldo soya tripticaseína para efectuar las diluciones de los cultivos.
2. Los tiempos de generación en caldo soya tripticaseína a 35° oscilaron entre 18.7 y 21.3 minutos; las dos cepas de referencia procedentes de la FDA exhibieron los tiempos más prolongados.
3. En general, los efectos de la congelación del microorganismo a partir de niveles de contaminación de 5-10 millones de células por ml, el microorganismo disminuye su número a menos de 10 células por ml entre 23 y 69 días.
4. Excepcionalmente al cabo de 120-125 días se llega a detectar al microorganismo a niveles de 1 célula por 10 ml.
5. Con inóculos iniciales aproximadamente 100 veces menores, la inactivación ocurrió al cabo de 5-15 y 20-90 días respectivamente.
6. Las cepas de referencia resultaron en general más sensibles, en tanto que la recuperada del medio ambiente en San Luis Potosí mostró la máxima resistencia al efecto de la congelación.

7. Las cepas estudiadas muestran una acentuada susceptibilidad al tratamiento térmico en agua. Con una concentración inicial de 10^4 - 10^5 al alcanzarse los 55° dos de ellas muestran cifras de 0 por ml al recuento en placa. En una cepa la inactivación ocurrió al llegar a los 65° . Para entonces habían transcurrido 11-16 minutos desde el inicio del tratamiento. El punto de ebullición se presentó al cabo de 22-32 minutos (según el tipo de material del recipiente y el volumen aproximado), y se requirieron alrededor de 20 minutos para que el agua alcanzara la temperatura de 50° . Resulta evidente que la destrucción del microorganismo se alcanza con amplios márgenes de seguridad con sólo llegar al punto de ebullición. No es necesario sostener ésta.

8. Todas las cepas desarrollan bien en concentración de 3% de NaCl al cabo de 24 horas, pero no al 6% aún después de 72 horas.

BIBLIOGRAFIA

1. BROCK, D.T. 1976. Biología de los Microorganismos. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
2. ZAPATERO, B.E. 1974. Microbiología Médica. Editorial Sever-Cuesta. 7a. edición. Valladolid, España.
3. PELCZAR, M.J. 1988. Microbiología. Editorial Mc Graw-Hill. 2a. edición. México, D.F.
4. LOPEZ, R.M. 1992. Revisión bibliográfica del género vibrio. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
5. BURROWS, W. 1974. Tratado de Microbiología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Vigésima edición. México, D.F.
6. PIATKIN, K. 1968. Microbiología. Editorial MIR. Moscú.
7. ATLAS, R.M. 1990. Microbiología Fundamentos y Aplicaciones. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. México
8. ANONIMO. 1991. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. En: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C.

9. SMITH, T.D./CONANT, F.N./WILLETT, P.H. 1971. Microbiología de Zinsser. Editorial UTEHA. Cuarta edición. México, D.F.
10. KONEMAN, W.E./ALLEN, D.S./ DOWELL, R.V./ SOMMERS, M.H. 1989. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana S.A. Primera reimpresión. México, D.F.
11. DIVO, A. 1971. Microbiología Médica. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Segunda edición. México, D.F.
12. JAWETS, E. 1981. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno S.A. Novena edición.
13. WITHBY, L./ HAYNES, M. 1960. Bacteriología Médica. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
14. BLACK, R.E. 1986. Cholera. En: LAST, J.M. (ed) 1986. Maxcy-Rosenaw, Public Health and Preventive Medicine. Appleton- Century- Crofts/ Norwalk, Connecticut. Decimosegunda edición.
15. KUMATE, R.J. 1991. Manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. México, D.F.
16. CORRALES, M.T./BAINOTTI, A.E./ SIMONETTA, A.C. 1992. Sobrevivencia de *Vibrio cholerae* O1 en alimentos almacenados a distintas temperaturas. En: La Alimentación Latinoamericana. No. 190.
17. GANGAROSA, E.J. 1974. Base epidemiológica del control del cólera. Bol. of San Panam. 77: 281-291

18. GUENTGEL, M.N./ BERRY, J.L. 1975. Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect. Imm.* 11: 890-897.
19. KING, C.A./ VAN HEYNINGEN, W. E./ GASCOYN, N. 1976. Aspects of interaction of *Vibrio cholerae* toxin with the pigeon red cell membrane. *J. Inf. Dis. Suppl.* 133: 75-81.
20. BRYAN, F.L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by waste water. *J. Food Prot.* 40: 45-56.
21. RICHARDS, K.L./ DOUGLAS, S.D. 1978. Patho physiological effects of *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* and their exotoxins on eucaryotic cells. *Microb. Rev.* 42: 592-613.
22. HOLMGREU, J./ LONROTH, I./ SUENNERHOLM, L. 1973. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulate structure from studies with GM₁ ganglioside and related glycolipids. *Infect. Imm.* 8: 208-214.
23. GILL, D.M./ KING, C.A. 1975. The mechanism of action of cholerae toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250: 6424-6432.
24. VAN HEYNINGEN, S./ KING, C.A. 1975. Subunit A from cholera toxin is an activator of adenylate cyclase in pigeon erythrocytes. *Biochem. J.* 146: 269-271.
25. RENNELS, M.B./ LEVINE, M.M./ RAYA, V./ ANGLE, P./YOUNG, C. 1980. Selective vs nonselective media and direct plating vs enrichment technique in isolation of *Vibrio cholerae*: recommendation for clinical laboratories. *J. Inf. Dis.* 142: 328-331.