



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“Efecto del estrés fisiológico en células de *Vibrio* spp. causado por ácido cítrico sobre la formación de biopelículas y en la modulación genética del proceso”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

PRESENTA

M. en C. José Eduardo Lucero Mejía

DIRIGIDO POR

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Santiago de Querétaro, Querétaro, octubre 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto del estrés fisiológico en células de *Vibrio* spp.  
causado por ácido cítrico sobre la formación de  
biopelículas y en la modulación genética del proceso

**por**

José Eduardo Lucero Mejía

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQDCC-247041



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“Efecto del estrés fisiológico en células de *Vibrio* spp. causado por ácido cítrico sobre la formación de biopelículas y en la modulación genética del proceso”**

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

M. en C. José Eduardo Lucero Mejía

**Dirigido por:**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez  
Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

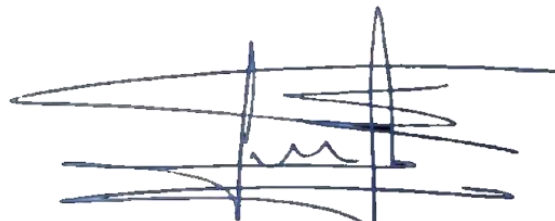
Centro Universitario  
Querétaro, Qro. octubre 2022

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Parte de la información de las secciones: “Prevalencia de *Vibrio* spp. en alimentos y superficies de contacto; Capacidad de *Vibrio* spp. para formar biopelículas; Construcción de un nuevo criterio cuantitativo para la clasificación de IFB; Reclasificación de las cepas de *Vibrio* según el nuevo criterio de clasificación de IFB” forma parte de una publicación:

- Lucero-Mejía, J. E., Romero-Gómez, S. J., & Hernández-Iturriaga, M., 2020. A new classification criterion for the biofilm formation index: A study of the biofilm dynamics of pathogenic *Vibrio* species isolated from seafood and food contact surfaces, *Journal of Food Science*, 85 (8). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15325>



José Eduardo Lucero Mejía

## DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo a  
mi tía Gaby,  
mi abuelo José,  
Carlos,  
y al Dr. Fausto Tejeda,  
esos seres queridos que perdí en este proceso,  
que no me vieron culminarlo,  
pero fueron, son y serán parte de él.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico como becario otorgado durante la realización de este posgrado.

Al Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir usar sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto y por la formación que me permitió desarrollar. Así como al personal administrativo, en especial a Carmelita Campos que siempre me apoyo en todos mis trámites y dudas.

A Mis padres, que sin cuestionar porque hacer otro posgrado o cualquier tipo de dudas me brindaron su apoyo incondicional en todo el sentido de la palabra, desde que presente el examen de admisión y en todo momento hasta ahora que ha terminado este doctorado; alentándome a no claudicar aun cuando todo parecía que no tenía solución y también celebrando cuando todo salía bien. Al igual que mis padres mi hermana se suma a este apoyo que sin lugar a duda fue fundamental, por creer en mí, por sus palabras y porras para no perder de vista mi objetivo y poder hoy decir que lo logré. Agradezco tenerlos a mi lado para verme terminar este objetivo y celebrarlo con ustedes que son mi todo.

A la Dra. Montse, quien me aceptó dentro de su grupo de trabajo, creyó y confió en mí, me aconsejo, me exigió, me acompañó, me animo y echo porras, financió mi doctorado, me escucho, y hasta me regañó cuando fue necesario. Hoy estoy muy feliz por el trabajo que hemos construido y por formarme como el doctor que siempre quise ser. Hoy no sólo puedo agradecer su papel como directora, sino la amistad y la relación profesional que hemos entablado y que auguro durara por mucho tiempo.

A los miembros de mi comité: La Dra. Sofy, el Dr. Sergio, el Dr. Ramiro y el Dr. Bruno, quienes no solo aportaron a este proyecto, sino que siempre me retaron a dar una mejor versión, por creer en que podía hacerlo mejor y que en efecto, mejoro muchas habilidades, aptitudes y conocimiento que fui adquiriendo y desarrollando.

Agradezco a otra parte de las colaboraciones académicas que tuve en este proceso. Al Dr. Gerardo Marrufo, la Dra. Ma. Soledad Vázquez y el Dr. Adrián Gómez de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo; al Dr. Andrés de Luna y el M. en C. Mario Flores del CINVESTAV Querétaro; al Dr. José Santos y el M. en C. Bruno Flores de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Todos ellos colaborando con sus equipos, técnicas, conocimientos e ideas para complementar parte de este proyecto.

A Carlos, por su compañía, enseñanzas, ideas, apoyo en todo momento, sus palabras, por estar en las celebraciones y en los ratos malos y todas las experiencias vividas. Hoy no estas más con nosotros, pero formaste una parte fundamental en este proceso y estaré eternamente agradecido.

Otra parte fundamental que me acompañó en este proceso y a quienes debo agradecer son mis amigos. Angélica, Crystabel, Betty, Yuri, Alma, Jorge, Alex, Adrián, Manuel, Gio, Javier, Charlito; la lista es larga, pero mi agradecimiento especial para ustedes que estuvieron más cerca en este proceso, me aguantaron, me aconsejaron, me apoyaron, me consolaron, y hasta celebramos, les agradezco todas las experiencias y momentos, y se que será para siempre.

A mi apoyo en el laboratorio, iniciando con la Sra. Martha, quien no sólo apoya en lo técnico, sino también en lo personal y pase lo que pase siempre estuvo ahí, sin duda se ganó un lugar especial. Agradezco a los alumnos de servicio que siempre fueron un gran apoyo para las largas jornadas de trabajo.

A mis alumnos, quienes también me ayudaban a tener un “respiro” del laboratorio, de quienes también aprendí como tenía que ser un doctor, me llevo de ellos que pude lograr mi cometido, e inclusive inspirar a algunos.

A mi equipo de cuidado personal, mi fisio, mi nutri y mi terapeuta, quienes me apoyaban a cuidarme a mi mismo, porque a veces lo olvidamos, pero si no estamos bien con nosotros mismos no funcionamos correctamente.

Por último, pero no menos importante, a MI. Por alcanzar este logro con el que siempre soñé.

## ÍNDICE

	RESUMEN	xvi
	ABSTRACT	xvii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	Género <i>Vibrio</i>	3
2.1.1	Características generales del género <i>Vibrio</i>	3
2.1.2	Especies de importancia	3
2.2	Presencia de <i>Vibrio</i> en alimentos	3
2.2.1	Brotos de infecciones asociadas al consumo de alimentos contaminados con <i>Vibrio</i>	4
2.2.2	Factores implicados en brotes de enfermedad causados por <i>Vibrio</i>	5
2.3	Persistencia de <i>Vibrio</i> en superficies inertes	6
2.3.1	Formación y regulación de biopelículas formadas por <i>Vibrio</i> spp.	6
2.4	Estrés fisiológico y su asociación con la regulación de la formación de biopelículas	10
2.4.1	Estrés fisiológico	10
2.4.2	Regulación del estrés	12
2.4.3	Papel del estrés en la formación de las biopelículas	14
2.4.4	Importancia del estrés bacteriano y su implicación en la inocuidad alimentaria	16
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVOS	20
5.1	Objetivo general	20
5.2	Objetivos específicos	20
6.	METODOLOGÍA	21
6.1	Aislamiento de cepas de <i>Vibrio</i> spp. a partir de alimentos de origen marino y superficies de contacto con alimentos	21
6.1.1	Obtención de muestras	21



6.1.2	Detección e identificación de <i>Vibrio</i> spp.	21
6.2	Evaluación de la capacidad de <i>Vibrio</i> spp. para formar biopelículas	24
6.2.1	Preparación del cultivo	24
6.2.1	Preparación del cultivo	24
6.2.2	Ensayo en microplaca	24
6.2.3	Análisis estadístico	26
6.3	Evaluación del efecto del ácido cítrico en la viabilidad de células planctónicas de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i>	26
6.3.1	Selección de cepas	26
6.3.2	Exposición de las cepas seleccionadas a los tratamientos estresantes	26
6.3.3	Cuantificación de células estresadas y no estresadas en medios de cultivo	27
6.3.4	Cuantificación del daño celular por medio de citometría de flujo	27
6.3.5	Determinación de la recuperación celular en caldo de cultivo	28
6.3.6	Análisis estadístico	28
6.4	Evaluación del efecto del estrés causado por ácido cítrico sobre células de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en la formación de biopelículas	29
6.4.1	Evaluación de la formación de biopelículas en microplaca	29
6.4.1.1	Análisis estadístico	30
6.4.2	Evaluación de la formación de biopelículas en superficies inertes con residuos acidificados de pescado	30
6.4.2.1	Preparación del extracto de pescado	30
6.4.2.2	Preparación de las superficies inertes	30
6.4.2.3	Formación de biopelículas en superficies inertes	31
6.4.2.4	Composición de los biopolímeros en las biopelículas formadas por <i>V. cholerae</i> en superficies inertes	32
6.4.2.5	Determinación de la estructura de las biopelículas formadas por células de <i>V. cholerae</i> expuestas a ácido cítrico	32
6.4.2.6	Análisis estadístico	33

6.5	Análisis transcriptómico de <i>V. cholerae</i> durante la formación de biopelículas en superficies inertes	34
6.5.1	Formación de biopelículas, extracción y secuenciación de RNA	34
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1	Prevalencia de <i>Vibrio</i> spp. en alimentos y superficies de contacto	38
7.2	Caracterización de cepas de <i>Vibrio</i> spp. en función de la formación de biopelículas	41
7.2.1	Capacidad de <i>Vibrio</i> spp. para formar biopelículas	41
7.2.2	Construcción de un nuevo criterio cuantitativo para la clasificación de IFB	43
7.2.3	Reclasificación de las cepas de <i>Vibrio</i> según el nuevo criterio de clasificación de IFB	45
7.3	Efecto del ácido cítrico en el estado fisiológico de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i>	47
7.3.1	Cuantificación de la población estresada en medios de cultivo	48
7.3.2	Respuesta fisiológica y citológica	52
7.3.3	Recuperación de células estresadas: tiempo de detección y velocidad de desarrollo	57
7.4	Capacidad de formación de biopelículas por células de <i>Vibrio</i> spp. expuestas a ácido cítrico	63
7.4.1	Formación de biopelículas en microplaca: células estresadas en caldo de cultivo en condiciones óptimas	63
7.4.2	Formación de biopelículas en microplaca: células no estresadas en caldo de cultivo acidificado	69
7.4.3	Formación de biopelículas en microplaca: células estresadas en caldo de cultivo acidificado	75
7.4.4	Formación de biopelículas por <i>V. cholerae</i> en superficies inertes en presencia de residuos de pescado acidificado	75
7.4.5	Caracterización de los biopolímeros de las biopelículas formadas en superficies de acero inoxidable y plástico	83

7.4.6	Morfología de biopelículas formadas por células de <i>V. cholerae</i> expuestas a ácido cítrico en superficies de plástico	88
7.5	Transcriptoma de células planctónicas y en biopelículas formadas por <i>V. cholerae</i> expuestas a ácido cítrico en superficies de plástico	95
8.	CONCLUSIONES	107
9.	REFERENCIAS	109
10.	ANEXO I	131
11.	ANEXO II	135
12.	ANEXO III	137
13.	ANEXO IV	138
14.	ANEXO V	139
15.	ANEXO VI	140
16.	ANEXO VII	141
17.	ANEXO VIII	142
18.	ANEXO IX	145
19.	ANEXO X	146

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de formación de biopelículas.	7
Figura 2.	Vías de señalización de los procesos de formación de biopelículas.	10
Figura 3.	Adaptaciones y transición bacteriana, a un nuevo entorno.	12
Figura 4.	Niveles de regulación diferencial de <i>rpoS</i> , de acuerdo con estímulo estresante.	13
Figura 5.	Esquematzación de mecanismos que se activan en las bacterias ante la exposición a estrés ácido: A) Descarboxilación de aminoácidos; B) Bombas de protones; C) Proteínas de membrana.	14
Figura 6.	Peligros asociados con la adaptación al estrés de patógenos durante la cadena de procesamiento de alimentos.	17
Figura 7.	Criterio de clasificación cuantitativa del IFB basado en dinámica de IFB, el grado de IFB y su asociación con el nivel de riesgo desde la perspectiva de la inocuidad alimentaria.	45
Figura 8.	Comparación de medias de Tukey del ensayo de recuperación de la población de <i>V. alginolyticus</i> (VA3 y VA11) y <i>V. cholerae</i> (VCO y VC6) en medios de cultivo después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min.	51
Figura 9.	Porcentaje de células de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en fase logarítmica y estacionaria después de la exposición a ácido cítrico por 180 min teñidas con yoduro de propidio.	53
Figura 10.	Porcentaje de células teñidas con bromuro de etidio de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en fase logarítmica y estacionaria después de la exposición a ácido cítrico por 180 min.	54
Figura 11.	Comparación de medias de los ensayos de duración del tiempo de detección de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en CSTN a 37 °C después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min.	59

Figura 12.	Comparación de medias de los ensayos de velocidad de desarrollo de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en CSTN a 37 °C después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min.	61
Figura 13.	Correlación entre velocidad de desarrollo y TD de <i>V. alginolyticus</i> , y <i>V. cholerae</i> expuestos a ácido cítrico por 180 min en dos diferentes fases de cultivo.	62
Figura 14.	Formación de biopelículas en caldo de cultivo en condiciones óptimas por células estresadas de <i>V. alginolyticus</i> en dos fases de cultivo.	65
Figura 15.	Formación de biopelículas en caldo de cultivo en condiciones óptimas por células estresadas de <i>V. cholerae</i> en dos diferentes fases de cultivo.	68
Figura 16.	Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer.	65
Figura 17.	Formación de biopelículas por células no estresadas de <i>V. alginolyticus</i> en dos diferentes fases de cultivo en medio acidificado.	71
Figura 18.	Formación de biopelículas por células no estresadas de <i>V. cholerae</i> en dos diferentes fases de cultivo en medio acidificado.	72
Figura 19.	Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer.	74
Figura 20.	Dinámica de desarrollo de <i>V. cholerae</i> en superficies de acero y plástico en presencia de caldo y residuos de pescado.	77
Figura 21.	Gráfico de interacciones primarias significativas de las poblaciones de <i>V. cholerae</i> como resultado de la prueba de Tukey-Kramer.	78
Figura 22.	Biopolímeros formados por <i>V. cholerae</i> sobre superficies de acero y plástico durante 72 h, en presencia de caldo y residuos de pescado.	80
Figura 23.	Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer.	82

Figura 24.	Espectros Raman de los biopolímeros formados por <i>V. cholerae</i> en dos fases de cultivo sobre superficies de acero inoxidable durante 72 h, y con la presencia de residuos de caldo de cultivo a pH 7.0 y pH 5.0.	84
Figura 25.	Espectros Raman de los biopolímeros formados por <i>V. cholerae</i> en dos diferentes fases de cultivo sobre superficies de plástico durante 72 h, y con la presencia de residuos de caldo de cultivo a pH 7.0 y 5.0.	85
Figura 26.	Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer	89
Figura 27.	Micrografía con MFA de biopelículas formadas por células de <i>V. cholerae</i> en fase logarítmica después de la exposición a ácido cítrico en superficies de plástico con residuos de caldo de cultivo durante 72 h.	92
Figura 28.	Micrografía con MFA de biopelículas formadas por células de <i>V. cholerae</i> en fase estacionaria después de la exposición a ácido cítrico en superficies de plástico con residuos de caldo de cultivo durante 72 h.	93
Figura 29.	Distribución de los genes diferencialmente expresados en grupos ontológicos.	98

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Iniciadores para la identificación de especies del género <i>Vibrio</i> .	22
Tabla 2.	Condiciones de reacciones de PCR para identificación de especies del género <i>Vibrio</i> .	23
Tabla 3.	Criterios para clasificar el IFB.	25
Tabla 4.	Prevalencia de especies de <i>Vibrio</i> en mariscos expedidos en Querétaro.	38
Tabla 5.	IFB de especies de <i>Vibrio</i> aisladas de alimentos de origen marino y superficies inertes.	41
Tabla 6.	IFB propuesto de especies de <i>Vibrio</i> aisladas de alimentos de origen marino y superficies inertes.	46
Tabla 7.	Análisis de varianza de las poblaciones de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> sobrevivientes a la exposición a ácido cítrico.	49
Tabla 8.	Análisis de varianza de los factores evaluados en el tiempo de detección de cepas de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> estresadas con ácido cítrico.	57
Tabla 9.	Análisis de varianza de los factores evaluados en la formación de biopelículas por cepas de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> estresadas con ácido cítrico	67
Tabla 10.	Tasa de formación de biopelícula de cepas de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en CSTN a 37°C que fueron sometidas a tratamientos estresantes.	68
Tabla 11.	Análisis de varianza de los factores evaluados en la formación de biopelículas de cepas de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en CSTN acidificado.	73
Tabla 12.	Análisis de varianza de los factores evaluados en la cuantificación de la población de cepas de <i>V. cholerae</i> en superficies de acero y plástico.	78
Tabla 13.	Análisis de varianza de los factores evaluados en la cuantificación de biopolímeros formados por cepas de <i>V. cholerae</i> en superficies de acero y plástico.	81

Tabla 14.	Asignación de picos en el espectro Raman de los biopolímeros producidos por <i>V. cholerae</i> durante la formación de biopelículas	87
Tabla 15.	Análisis de varianza de los factores evaluados en la medición de altura de picos y rugosidad de la biopelícula formada por células estresadas y no estresadas de <i>V. cholerae</i> en plástico.	89
Tabla 16.	Valores obtenidos en la medición de altura de picos y rugosidad de la biopelícula formada por células estresadas y no estresadas de <i>V. cholerae</i> en plástico durante 72 h.	90
Tabla 17.	Genes inducidos y reprimidos en las diferentes etapas de formación de biopelículas por <i>V. cholerae</i> VC6 en condiciones óptimas y estresantes.	96
Tabla 18.	Listado de cepas de <i>Vibrio</i> aisladas de alimentos y superficies.	131
Tabla 19.	Poblaciones cuantificadas en placa, DO 600 nm e IFB de cepas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de alimentos de origen marino y superficies de contacto con alimentos.	133
Tabla 20.	Poblaciones de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> posterior a la exposición a ácido cítrico cuantificadas en placa en diferentes medios selectivos y no selectivos.	136
Tabla 21.	Porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> después de la exposición a ácido cítrico.	138
Tabla 22.	Porcentaje de células teñidas con bromuro de etidio de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> después de la exposición a ácido cítrico.	139
Tabla 23.	Tiempo de detección de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> posterior a la exposición a ácido cítrico.	140
Tabla 24.	Velocidad máxima de desarrollo de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> posterior a la exposición a ácido cítrico.	141
Tabla 25.	Poblaciones de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> al inicio y al finalizar la formación de biopelículas posterior a la exposición a ácido cítrico.	142



Tabla 26.	Poblaciones de <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> al inicio y al finalizar la formación de biopelículas y tasa de formación de biopelículas que fueron formadas a pH 5.5.	145
Tabla 27	Genes inducidos y reprimidos en las diferentes etapas de formación de biopelículas por <i>V. cholerae</i> (VC6) en condiciones óptimas y de estrés ácido	146

## RESUMEN

Se evaluó el efecto del estrés fisiológico causado por ácido cítrico (AC) a cepas de *Vibrio cholerae* sobre su capacidad para formar biopelículas (BP) en superficies inertes (SI) y los cambios en la expresión genética asociada. Se colectaron 136 muestras de alimentos marinos y 14 de SI, y se determinó la presencia de *Vibrio* spp. Se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas de *Vibrio* spp. con base en su índice de formación de biopelículas. Se seleccionaron dos cepas de *V. alginolyticus* y dos de *V. cholerae*. y se sometieron a estrés subletal a pH (4.5, 5.0, 5.5) durante 180 min; periódicamente se cuantificaron las células sobrevivientes (cultivo en placa), el daño celular (citometría de flujo), parámetros cinéticos (tiempo de detección y velocidad de desarrollo) y la formación de BP (microplaca y superficies de acero y plástico). Las BP formadas en superficies se caracterizaron por espectroscopía de Raman y microscopía de fuerza atómica, y se realizó un análisis transcriptómico del proceso. Se detectó *Vibrio* spp. en 74 (49.3%) muestras; identificándose: *V. alginolyticus* (25), *V. vulnificus* (12), *V. cholerae* (7), *V. parahaemolyticus* (6) y *V. mimicus* (1). Basándose en la dinámica de formación de BP se propuso una escala de clasificación cuantitativa y asignándose un valor para representar el nivel de riesgo, obteniéndose trece perfiles. El estrés causado por el AC no se pudo cuantificar por cultivo tradicional; sin embargo, la citometría de flujo y los parámetros cinéticos mostraron un estrés ligero; siendo mayor a cuando la exposición es de 60 min a pH 4.5. La formación de BP en microplaca se inhibió a pH 5.0 y 4.5; y en SI expuestas a AC, la población y los biopolímeros disminuyeron. Las BP formadas en plástico poseen mayor contenido de eDNA y carbohidratos que las BP en acero. Las BP en superficies formadas por células de VC expuestas a AC presentaron menor altura de picos y rugosidad con respecto a las no expuestas. El análisis transcriptómico indicó que los factores sigma no regulan simultáneamente los mecanismos de respuesta a estrés y formación de BP, pero si genes comúnmente involucrados como el *toxR*.

Palabras clave: Biopelículas, citometría de flujo, composición de biopolímeros, estrés celular, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholera*, *toxR*.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of physiological stress caused by citric acid in *Vibrio cholerae* strains of biofilm (BF) formation capacity on inert surfaces and the associated changes in the genetic expression. Seafood (136) and inert surfaces (14) samples were collected and determinate *Vibrio* spp. presence. Were isolated, identified and characterized based on BF formation index. Two *V. alginolyticus* and two *V. cholerae* strains were selected and were exposed to acidic sublethal stress (pH 4.5, 5.0, 5.5) up to 180 min; periodically survivor population was quantified (plate count), cellular damage (flow cytometry), kinetic parameters (detection time and growth rate) and BF formation (microtiter plate and stainless-steel and plastic surfaces) were quantified. Formed BF were characterized by Raman spectroscopy and atomic force microscopy. Transcriptomic analysis of BF formation was performed. *Vibrio* spp. was detected in 74 (49.3%) samples, 51 strains were isolated and identified as *V. alginolyticus* (25), *V. vulnificus* (12), *V. cholerae* (7), *V. parahaemolyticus* (6) y *V. mimicus* (1). Based on BF dynamics a quantitative classification criterion was proposed and assigned a risk ranking value, having thirteen profiles. The stress caused by citric acid could not quantify by traditional culture, however, could by flow cytometry and kinetic parameters, showing a mild stress; exposition to citric acid at pH 4.5 for 60 min generated the higher stress level. The BF formation on microtiter plate was inhibited at 4.5 and 5.0; on inert surfaces exposed to acid the population and biopolymers were decreased. eDNA and carbohydrates in the BF formed on plastic were more abundant than in the BF on stainless-steel. The BF formed on surfaces by citric acid exposed VC cells have lower peaks and roughness. Transcriptomic analysis showed the sigma factors could not simultaneously regulate the acid response and BF process and did not have a convergence in both regulatory pathways, however, some genes were commonly involved as a *toxR*.

Key words: Biofilm, biopolymers composition, cellular stress, flow cytometry, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholera*, *toxR*.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Vibrio* spp. es un patógeno asociado a infecciones por el consumo de agua y alimentos contaminados que afecta a la población mundial. En las últimas décadas, el número de infecciones causadas por este patógeno ha incrementado, lo que lo posiciona como uno de los patógenos más frecuentes, sólo por debajo de *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, norovirus y virus de la hepatitis A.

La mayoría de los brotes ocasionados por *Vibrio* spp. han sido asociados a alimentos de origen marino, los cuales pueden estar contaminados con el patógeno desde su formación. Adicionalmente, la aparición de brotes de infección por este patógeno tiene un vínculo con las deficiencias en las prácticas sanitarias en los establecimientos durante la preparación y venta de este tipo de alimentos; dentro de las más comunes se encuentra el almacenamiento inadecuado de los pescados y mariscos crudos, que pueden propiciar una contaminación cruzada con otros alimentos o superficies de contacto.

*Vibrio* es un género bacteriano que tiene la capacidad de formar biopelículas al estar en contacto con superficies bióticas o abióticas. Una biopelícula se define como el conjunto de microorganismos adheridos irreversiblemente a una superficie y rodeados de una matriz conformada de exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular; estas estructuras permiten a las bacterias sobrevivir en ambientes donde las condiciones son hostiles, ya sea por la falta de nutrientes o por la exposición a factores ambientales adversos. La presencia de biopelículas en sitios de preparación de alimentos es un problema sanitario, debido a que se ha reportado que las bacterias inmersas en estas estructuras adquieren resistencia a agentes antimicrobianos y puede favorecer la diseminación de los microorganismos a los alimentos.

Por otro lado, algunos alimentos de origen marino como los bivalvos o algunos crustáceos, se consumen crudos, o insuficientemente cocidos y con la adición de ingredientes como salsas, jugo de cítricos, entre otros. Dichos tratamientos, no eliminan eficazmente bacterias patógenas. Sin embargo, las células que permanecen viables expuestas a esas condiciones pueden

desarrollar estrés fisiológico y con ello desencadenar un proceso de adaptación con la finalidad de garantizar su sobrevivencia. En el proceso de adaptación, las bacterias expresan se encuentran cambios en las rutas metabólicas, en el nivel de virulencia, en la movilidad y en la formación de biopelículas. Se sabe que el proceso de modulación del estrés esta mediado por el gen *rpoS* (modulador maestro del estrés) y *rpoE*; sin embargo, en el caso de *Vibrio* spp. se desconoce el papel que tienen estos moduladores durante la formación de biopelículas una vez que las células de *Vibrio* spp. se encuentran estresadas.

Específicamente hablando de las biopelículas formadas por *Vibrio*, surgen varios cuestionamientos tales como: ¿qué sucedería si la bacteria proveniente de un alimento que fue tratado con ácidos orgánicos está en contacto con superficies?, ¿formará o no biopelículas?, ¿qué características tendrá esa biopelícula? ¿los factores sigma (*rpo*) tienen una participación central en el proceso de regulación de ambos procesos? La respuesta a estos cuestionamientos permitirá conocer el alcance de la capacidad de sobrevivencia y persistencia de este patógeno en superficies inertes cuando se encuentra en un estado de estrés fisiológico, y ayudará a diseñar estrategias de control eficientes para evitar la contaminación de los alimentos en su sitio de preparación y por ende la aparición de brotes.

La realización de este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del estrés fisiológico causado por ácido cítrico en la capacidad de cepas de *Vibrio cholerae* para formar biopelículas en superficies inertes y elucidar si existe una modulación del proceso asociada a los factores sigma.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Género *Vibrio***

#### **2.1.1 Características generales del género *Vibrio***

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, rectos y curvos, móviles, no esporulados, halófilicos, termolábiles, fermentadores de carbohidratos (sacarosa, lactosa, arabinosa D-celobiosa, D-manosa, D-manitol) y se comportan como anaerobios facultativos. Se encuentran ampliamente difundidos en ambientes acuosos (Franco-Monsreal, 2015; Mizan *et al.*, 2015).

#### **2.1.2 Especies de importancia**

Las especies del género *Vibrio* son ubicuas o autóctonas de la biota bacteriana del medio acuático (aguas costeras, mares, lagos de agua dulce y estuarios), constituyendo desde el 0.1 al 60 % del total de las bacterias heterotróficas encontrándose en un amplio rango de nichos ecológicos (Urakawa y Rivera 2006). Es por ello, que a este patógeno se le considera la principal causa de gastroenteritis asociada al consumo de mariscos a nivel mundial (López *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2012).

Se han descrito varias especies de este género, siendo *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*, las especies patógenos más relevantes, debido a: 1) su frecuente implicación en brotes de infecciones, y 2) su sobresaliente potencial patogénico para causar infección con respecto a las otras especies (Franco-Monsreal, 2015).

Sin embargo, en la última década se ha descrito un incremento de casos de infecciones causadas por *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. mimicus* (CDC, 2016), que ha propiciado la investigación de la presencia de estos patógenos principalmente en productos de origen marino (Hernández-Díaz *et al.*, 2015; Zavala-Norzagaray *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2018).

### **2.2 Presencia de *Vibrio* en alimentos**

*Vibrio*, habita principalmente en el ambiente marino, siendo los alimentos provenientes del mar los que están más expuestos a la contaminación con este

patógeno, representando un peligro para el consumidor ya que de ser consumidos pueden generar casos aislados de enfermedad e incluso llegar a ocasionar brotes.

### **2.2.1 Brotes de infecciones asociados al consumo de alimentos contaminados con *Vibrio***

Específicamente hablando de las enfermedades transmisibles por alimentos de origen marino, las bacterias patógenas del género *Vibrio* han cobrado importancia, ya que en los últimos años los brotes e infecciones causadas por estas bacterias están aumentando en número (Baker Austin *et al.*, 2012; Martínez-Urtaza *et al.*, 2013; Crim *et al.*, 2014; OMS, 2015; CDC 2021), especialmente aquellas asociadas al consumo de mariscos crudos y/o poco cocidos, como las ostras (Rodgers *et al.*, 2014; Rodríguez Camacho *et al.*, 2014; Crim *et al.*, 2014; CDC, 2021, 2022).

Este fenómeno se ha observado en todo el mundo según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (2015). En las regiones donde más se presentan infecciones entéricas asociadas al consumo de alimentos (África, Medio Oriente y Sureste de Asia), *Vibrio* es una causa importante, tan sólo por debajo de *Salmonella enterica*, *Mycobacterium bovis*, virus de la hepatitis A y *Cryptosporidium* spp.

En los Estados Unidos (EE. UU.), a pesar de que las enfermedades causadas por este patógeno son de reporte obligatorio al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), existe un gran número de casos no reportados; se estima que alrededor de 84,000 estadounidenses contraen una infección por *Vibrio* spp., de los cuales aproximadamente 52000 son asociados a la ingesta de alimentos cada año (CDC, 2013; Crim *et al.*, 2014; CDC, 2022).

En México no se cuenta con información precisa sobre los brotes de infecciones causadas por *Vibrio* asociadas al consumo de alimentos. Sin embargo, la Secretaría de Salud mantiene una vigilancia epidemiológica continua, basándose en dos premisas: 1) el cólera (ocasionado por *V. cholerae*) en nuestro país ha estado presente desde la epidemia de los años 90, y en los últimos años se han registrado casos aislados, como los ocurridos en 2010, 2011 y 2012 en

el estado de Sinaloa, y en 2013, en brotes y casos en la Ciudad de México, Hidalgo, Veracruz y San Luis Potosí (SSA, 2020); 2) Se ha considerado a *V. parahaemolyticus* como un microorganismo endémico del pacífico mexicano (León-Robles *et al.*, 2013), por lo que pudiera atribuirse a este patógeno algunas infecciones gastrointestinales (Velázquez *et al.*, 2012).

### **2.2.2 Factores implicados en brotes de enfermedad causados por *Vibrio* spp.**

El estudio epidemiológico de los brotes de infección causados por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, incluido *Vibrio*, permite identificar los factores que contribuyeron a gestar una situación peligrosa tales como el origen del alimento implicado, el tipo de cepa, las prácticas de preparación y manejo del alimento que causaron la contaminación, sobrevivencia y/o desarrollo del patógeno, entre otros.

En el caso de infecciones ocasionadas por algunas especies de *Vibrio* los alimentos marinos son los mayormente implicados en los brotes (crustáceos y bivalvos principalmente), debido a que este ambiente al igual que estuarios es el hábitat del microorganismo (Quiñones-Ramírez *et al.*, 2010). A este mecanismo de contaminación se le conoce como contaminación de origen.

El hecho de que una zona geográfica se considere endémica de ciertos microorganismos indudablemente está asociada a una elevada frecuencia de infecciones vinculadas al consumo de los alimentos en cuestión. Tal situación ocurre en México en donde se ha demostrado que en algunos sitios como Sinaloa (Velazquez *et al.*, 2012; León-Robles *et al.*, 2013) y Campeche (Franco-Monsreal *et al.*, 2010) son zonas en donde predomina *V. parahaemolyticus*. En otras regiones del mundo como el sureste de Asia o África donde la prevalencia de *V. cholerae* en el ambiente acuático y alimentos es alta y se ve reflejada en un número elevado de infecciones en la población humana causadas por este microorganismo (OMS, 2015).

Teniendo en cuenta la presencia de origen de *Vibrio* spp. en peces y mariscos destinados para el consumo humano, es importante que los consumidores tengan en cuenta acciones que se deben implementar para prevenir una infección asociada a su consumo, tales como no consumir este tipo de alimentos



crudos o insuficientemente cocidos (ya que esta práctica es el principal factor identificado como causal de brotes de enfermedad asociado a estos de alimentos), y la implementación de buenas prácticas de manejo e higienización en las cocinas, sobre todo de los instrumentos y superficies que tienen contacto con el producto sin cocinar, para evitar la contaminación cruzada de los alimentos cocinados (CDC, 2022). Como se puede citar un brote en EE.UU., en donde se detectó la presencia de *Vibrio mimicus* en el alimento implicado y en el contenedor en donde fue almacenado antes y después de su cocción, sin haber un lavado y desinfección entre los procesos, lo que sugirió que en el sitio había ocurrido contaminación cruzada (Mac Eachein *et al.*, 2010; Haendiges *et al.*, 2014).

### **2.3 Persistencia de *Vibrio* en superficies inertes**

Como se mencionó previamente, las superficies inertes contaminadas con *Vibrio* pueden ser el factor que contribuya a la diseminación del microorganismo a otros alimentos. Entre los factores que favorecen la sobrevivencia de microorganismos patógenos en el ambiente se encuentra la formación de biopelículas (Wang *et al.*, 2022).

#### **2.3.1 Formación y regulación de biopelículas formadas por *Vibrio* spp.**

Las biopelículas son estructuras complejas de microorganismos que se forman sobre superficies bióticas o abióticas, caracterizadas por la interacción entre las poblaciones inmersas en ella y por la producción de estructuras exopoliméricas, proteínas de matriz y ADN extracelular (Jahid *et al.*, 2012; Mizan *et al.*, 2015; Townsley *et al.*, 2016).

El desarrollo de una biopelícula representa probablemente un factor clave para la sobrevivencia de las bacterias en el entorno. Se ha reportado que el crecimiento habitual de las bacterias en la naturaleza ocurre dentro de biopelículas, ya que el estar embebidas en estas estructuras, se favorece su supervivencia y multiplicación en superficies bióticas o abióticas favoreciendo el acceso a nutrientes y brindando protección ante factores estresantes y compuestos antimicrobianos (Alam *et al.*, 2007; Marrero-Domínguez *et al.*, 2011; Townsley *et al.*, 2015).

El uso de técnicas microscópicas para observar el desarrollo de las biopelículas producidas por diferentes microorganismos ha conducido a que a este fenómeno se le describa como un proceso que depende del tiempo, y que involucra la transición a través de distintas etapas de una organización multicelular (Mizan *et al.*, 2016). Estas etapas han sido identificadas como: i) células libres aisladas (planctónicas), ii) células aisladas unidas a una superficie, iii) formación de microcolonias, iv) formación de macrocolonias y v) dispersión (Figura 1).

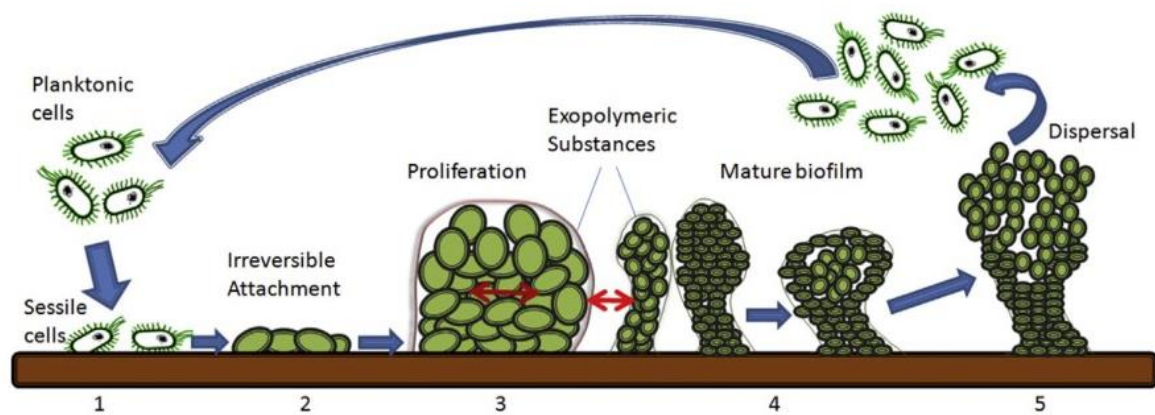


Figura 1. Esquema de formación de biopelículas (Mizan, 2016)

Particularmente, en las etapas de la formación de biopelículas de *Vibrio* spp. se destacan los siguientes aspectos:

1. Las células planctónicas deben contar con un flagelo para desplazarse hacia o en la superficie y establecer la interacción célula-superficie (Yildiz *et al.*, 2008; Mizan *et al.*, 2016). La presencia del flagelo depende de la expresión de los genes de construcción de flagelo de clase III, y las subunidades FlaABCDEF (González-Tinoco *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2019) (Figura 2).
2. La intervención del pili tipo IV: hemaglutinina sensible a manosa (MSHA por sus siglas en inglés mannose-sensitive haemagglutinin type IV pili) (Zhu *et al.*, 2003; Dharmaprakash *et al.*, 2014), que es importante para facilitar la adherencia de las células y establecer una interacción permanente con la superficie (Moorthy *et al.*, 2005).

Además de MSHA, existen otros pilis que contribuyen a la formación de la biopelícula (Figura 2, recuadros amarillos). El pili co-regulado con la toxina (TCP, del inglés toxin co-regulated pilus) (Reguera *et al.*, 2005) y el

pili regulado por quitina (ChiRP, del inglés chitin-regulated pili), denominado anteriormente Pila (Meibom *et al.*, 2004), ambos participan en las interacciones célula-superficie y célula-célula.

3. Una vez ancladas las células a la superficie se produce una sustancia polimérica llamada exopolisacarido (EPS) para mantener, estabilizar y dar una estructura tridimensional a la biopelícula (Watnick *et al.*, 1999; Yildiz *et al.*, 1999; Marrero-Domínguez *et al.*, 2011). En la síntesis de los EPS, intervienen las proteínas VpsR y VpsT (Figura 2, recuadros azules), quienes activan los genes *vps* y con ello la formación de las estructuras tridimensionales típicas de la biopelícula, debido a la producción de los polímeros que conforman la matriz (Yildiz *et al.*, 2001). Recientemente se vinculó directamente la expresión de los genes de virulencia y síntesis de EPS, al gen regulador de la virulencia AphA, que se requiere para activar la expresión de TCP (quien tiene un rol en la adhesión primaria de la superficie) y se demostró que se une a la región promotora de *vpsT* (Yang *et al.*, 2010).

Sumado al EPS, existe otra matriz extracelular que contiene a las proteínas RbmA, RbmC y Bap1 (Watnick *et al.*, 1999; Fong *et al.*, 2006; Fong *et al.*, 2007). Es en esta etapa donde el *quorum sensing*, interviene para regular la maduración de la biopelícula y la densidad de población en ella (Gu *et al.*, 2016).

4. En el *quorum sensing* (QS), se involucra la producción, secreción y subsiguiente detección de moléculas difusibles que sirven como señales, denominadas autoinductores, cuya concentración aumenta cuando la densidad celular del organismo que las produce se incrementa. Una vez que estos autoinductores alcanzan cierta concentración, son detectados por las células e inducen respuestas fisiológicas (Figura 2, recuadros rojos) (Miller *et al.*, 2001; Marrero-Domínguez *et al.*, 2011).

En *Vibrio* se han reportado dos moléculas autoinductoras: CAI-1 (del inglés, *cholerae autoinducer-1*) y AI-2 (del inglés, *autoinducer-2*) (Zhu *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2002; Marrero-Domínguez *et al.*, 2011). CAI-1 es producida por la enzima CqsA y AI-2 es sintetizado por LuxS.

En presencia de los autoinductores del QS en un sistema el receptor CqsS detecta a la molécula CAI-1 y en un segundo sistema, el complejo receptor

LuxU, LuxO-Q responde a la molécula AI-2 *Vibrio* reprime la producción de biopelículas o producción de factores de virulencia vía HapR (Hammer *et al.*, 2003; Marrero-Domínguez *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2021).

El monofosfato cíclico de diguanosina (c-di-GMP, por sus siglas en inglés *cyclic diguanylic acid*) es un segundo mensajero ubicuo, regulador central de la transición del estado de vida libre, motil, a la formación de una biopelícula en muchas bacterias, incluyendo *Vibrio* (Figura 2, recuadros verdes) (Marrero-Domínguez *et al.*, 2011). La producción y degradación del c-di-GMP es controlada por las enzimas diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEAs), respectivamente (Romling *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2021).

Las DGCs generalmente promueven la formación de la biopelícula mientras que las PDEAs la inhiben, lo que indica que el c-di-GMP es un regulador positivo de la formación de la biopelícula (Hoffman *et al.*, 2005). Incrementos de la concentración del c-di-GMP aumenta la formación de la biopelícula estimulando la transcripción de los genes *vps* y los reguladores transcripcionales *vpsR* y *vpsT* (Beyhan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010).

En particular, el QS y el c-di-GMP actúan recíprocamente sobre la formación de la biopelícula: el QS reprime y el c-di-GMP activa el desarrollo de esta estructura.

Evidencias recientes muestran que el regulador HapR, producido en densidades celulares elevadas, reprime la formación de la biopelícula mediante HapR que controla la transcripción de 14 genes que codifican para un grupo de proteínas que sintetizan y degradan el c-di-GMP, lo que resulta en una reducción neta de la concentración celular del c-di-GMP a una densidad celular elevada y, por lo tanto, una disminución de la formación de la biopelícula (Waters *et al.*, 2008).

5. La activación del *quorum sensing* también promueve la diseminación de células planctónicas a partir de las biopelículas (Lee *et al.*, 2013). Este proceso es importante para controlar el grosor y la arquitectura de la biopelícula y es mediado a través de la inducción temporal de los sistemas de *quorum sensing*, que inhiben la síntesis del VPS, a través de su regulador terminal HapR (Liu *et al.*, 2007). Otro causal de la diseminación

de las células puede ser atribuida a la acción de proteasas, las cuales son reguladas por el gen *hapA* en bacterias del género *Vibrio* (Mewbron *et al.*, 2017), y cuya acción se ha observado en el desprendimiento de *Vibrio* de células epiteliales.

Otro sistema de dos componentes recientemente descrito es DbfS/DbfR, quien se encarga de reprimir la dispersión de la biopelícula, sin embargo, la represión de este sistema favorece que las enzimas LapG (adhesinas), RbmB (degradación de la matriz polimérica) actúen y favorezcan la dispersión, que puede verse favorecida con la acción de CheY3, quien se encarga del movimiento a través de la quimiotaxis y por tanto la liberación de las bacterias al medio (Bridges *et al.*, 2020), los autores sugieren que este sistema de liberación pudiera estar asociado no al censo de población sino a el monitoreo de las condiciones ambientales y favorecer la dispersión de las células fuera de la matriz polimérica.

6. Tanto la movilidad flagelar, la producción de HapA, que participan en el desprendimiento de los vibriones de la biopelícula pueden llegar a estar regulados por c-di-GMP (Mewbron *et al.*, 2017).
7. Las células planctónicas liberadas pueden generar una biopelícula diferente o persistir de manera independiente en el ambiente.

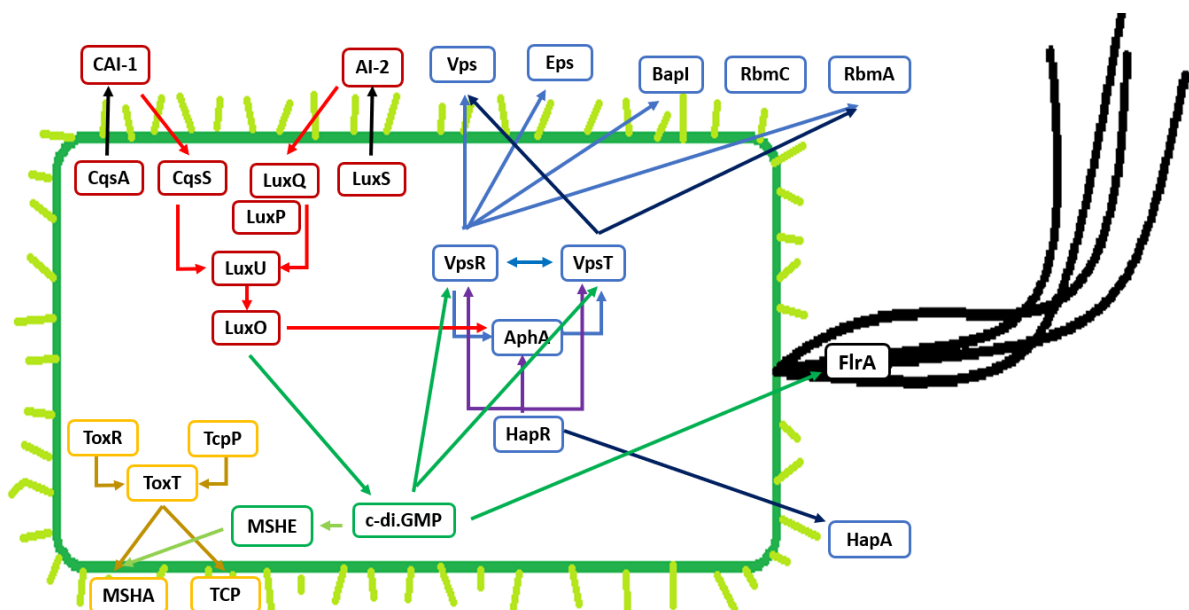


Figura 2. Vías de señalización de los procesos de formación de biopelículas.

## **2.4 Estrés fisiológico y su asociación con la regulación de la formación de biopelículas**

### **2.4.1 Estrés fisiológico**

El estrés en las células bacterianas se presenta cuando existen condiciones o factores adversos que perjudican o afectan su crecimiento o supervivencia (Yousef y Juneja, 2003).

Se han descrito diferentes niveles o estadios de estrés y diversas respuestas de los microorganismos ante este fenómeno. Por ejemplo, cuando un agente estresante tiene un nivel bajo en la agresión hacia la célula, se hace mención a un daño ligero, en el cual la célula puede recuperarse del daño o adaptarse a las condiciones adversas del medio. A mayor daño, menor es la capacidad de recuperación y mayor es la probabilidad de que la célula muera (Yousef y Juneja, 2003).

El término adaptación hace referencia a un proceso integral, que incluye cambios en regulaciones, eventos epigenéticos y mutacionales heredadas que contribuyen a la adecuación a un nuevo ambiente para tener una fisiología óptima (Ryall *et al.*, 2012).

Se han descrito tres tipos de adaptación.

- 1) La regulación mediada por mecanismos codificados en el genoma (mecanismos innatos). Los mecanismos regulatorios que participan en la adaptación al medio, maximizando las posibilidades de sobrevivencia y éxito evolutivo (Ryall *et al.*, 2012).
- 2) Las adaptaciones mediadas por mutaciones. Un mutante presente en una gran población con una ventaja de crecimiento en el nuevo entorno puede enriquecerse mucho en función de su aumento de aptitud (Ryall *et al.*, 2012).
- 3) Combinación de ambos. En la Figura 3 se esquematiza la conjunción de ambos factores para que la célula logre una adecuada adaptación a un nuevo ambiente.

Es necesario precisar, que el nivel de aptitud mencionado anteriormente puede estar determinado por la combinación de las transiciones ambientales que la célula sufre (historia de la célula) (Hengge- Aronis, 2002), o por la capacidad de regulación genética que posee la cepa (Ryall *et al.*, 2012). Esto podría explicar algunas de las adaptaciones que algunas cepas han sufrido, manifestando comportamientos que antes no se habían observado, y por ende cambios en la regulación de los procesos que suceden en la fisiología bacteriana.

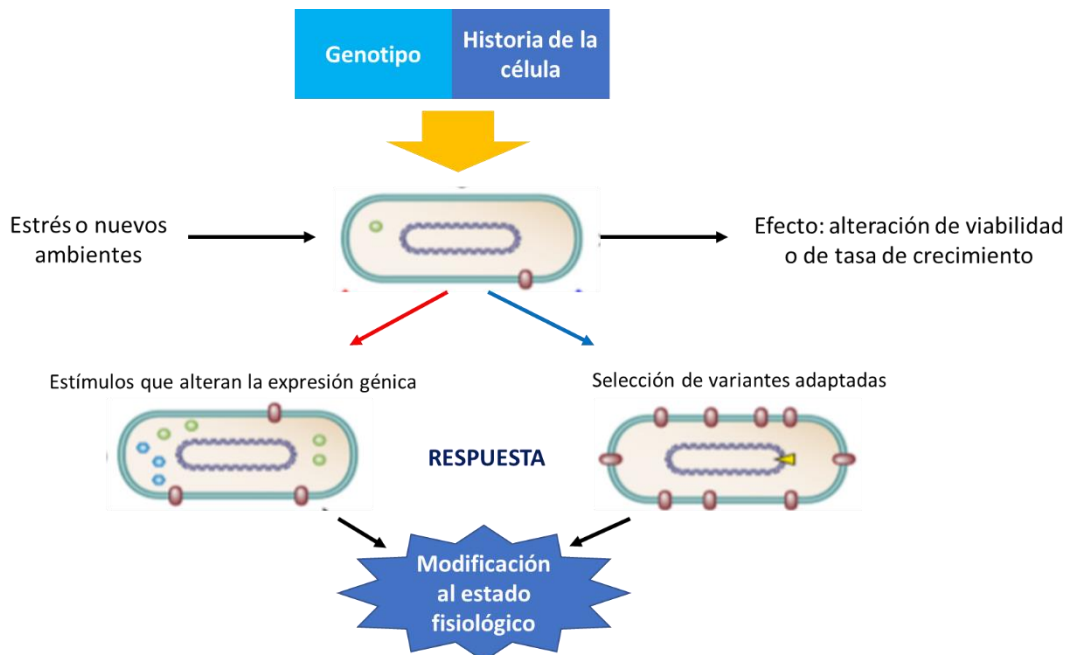


Figura 3. Adaptaciones y transición bacteriana a un nuevo entorno.

### 2.4.2 Regulación del estrés

En cada proceso celular existe una regulación, que activa o reprime a cada efector de la vía, esta regulación puede ser inducida o constitutiva. Cuando existe un entorno adverso (restricción de nutrientes esenciales, la acumulación de metabolitos tóxicos, cambios de pH, temperatura, etc.) las células comienzan a activar la respuesta para adaptación celular al estrés, la cual, se ha observado es homóloga a lo observado en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, es decir, en esta fase del crecimiento bacteriano los efectores involucrados se activan y/o reprimen (Jaishankar *et al.*, 2017).

Los mecanismos sensores que se activan ante una situación adversa al microorganismo de estrés, desencadenan la activación del control maestro del estrés: el gen *rpoS* (Guan *et al.*, 2015). Este gen está ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas y se expresa bajo condiciones de estrés subletal, como también lo hace en la fase estacionaria del desarrollo microbiano.

El gen *rpoS* codifica para la subunidad sigma de la RNA polimerasa, que promueve el proceso de transcripción de genes promotores y por ende la expresión de genes reguladores de la fase estacionaria (Hengge-Aronis, 2002; Guan *et al.*, 2015), genes codificantes de enzimas del metabolismo central, transporte de proteínas y genes involucrados en la resistencia a varios factores estresantes tales como: inanición, altos niveles de especies reactivas de oxígeno, estrés osmótico (Guan *et al.*, 2015). Todo ello no sólo tiene impacto en la tolerancia a los factores, sino en toda la fisiología bacteriana bajo condiciones subóptimas de crecimiento.

El nivel de expresión *rpoS* en la célula responde a presiones externas e internas y está influenciado por más de 20 señales ambientales, regulándose diferencialmente en cada una de ellas (Figura 4) (Hengge-Aronis, 2002; Ryall *et al.*, 2012). Los factores que afectan la expresión de *rpoS* proporcionan formas degeneradas de afectar la regulación (Wang *et al.*, 2010; Ryall *et al.*, 2012).

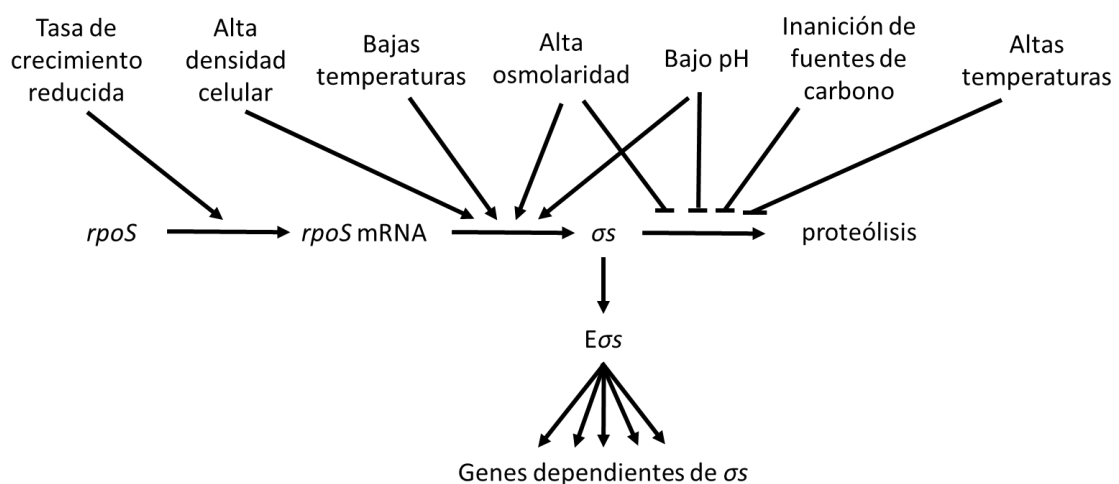


Figura 4. Niveles de regulación diferencial de *rpoS* de acuerdo con el estímulo estresante (Hengge-Aronis, 2002).



Existen mecanismos subregulados por *rpoS* que activan otros mecanismos que combaten las situaciones estresantes específicas, tal es el caso de *rpoE* y *rpoH*, que se encargan de combatir situaciones asociadas al daño intracelular y de temperatura elevada, respectivamente; y *rpoX* el cual de acuerdo con Gu *et al.*, (2019) puede estar regulado bajo RpoE, que en conjunto orquestan una respuesta conjunta ante situaciones estresantes.

Las bacterias activan diversos mecanismos para revertir el estrés generado por factores estresantes incluida la exposición a ácido cítrico, siendo en este caso específico, la activación del sistema de descarboxilación de aminoácidos, las bombas de protones y las proteínas de membranas los principales mecanismos para combatir la acidificación del ambiente (Ante *et al.*, 2015) (Figura 5). Sin embargo, en algunas ocasiones estos mecanismos pueden estar asociados a otros fenómenos simultáneos, como la formación de biopelículas; como se ha reportado en *Edwarsiella tarda*, donde el operón CadAB no sólo es indispensable para la respuesta al estrés ácido, sino también se ha descrito como una proteína que participa en la etapa de adhesión a la superficie e inicio de formación de biopelículas (Du *et al.*, 2021).

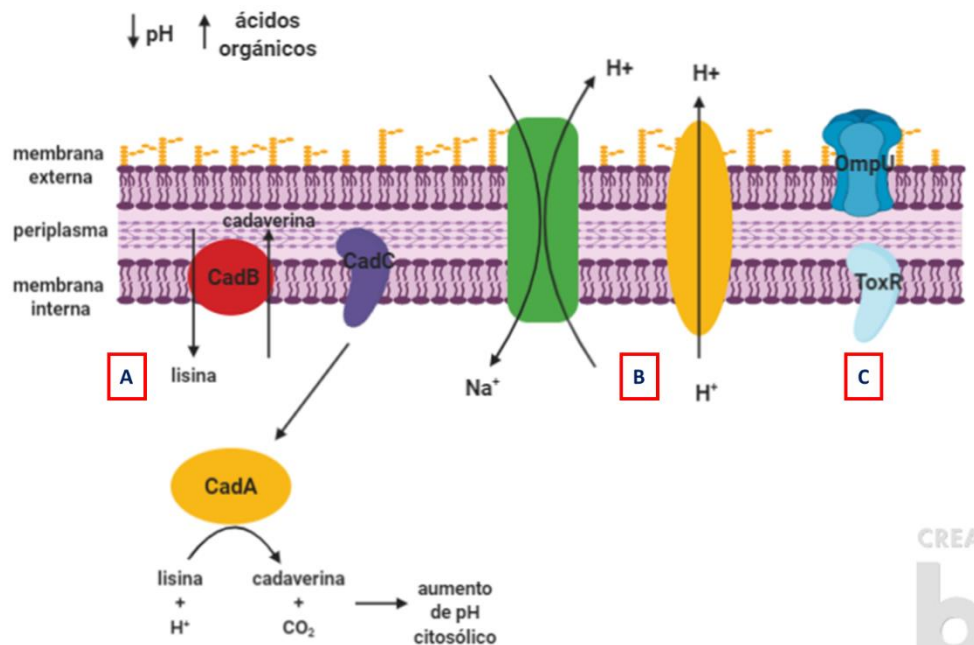


Figura 5. Esquematización de los mecanismos que se activan en las bacterias ante la exposición a estrés ácido: A) Descarboxilación de aminoácidos; B) Bombas de protones; C) Proteínas de membrana (Ante *et al.*, 2015)

### 2.4.3 Papel del estrés en la formación de las biopelículas

Cuando se propician condiciones desfavorables una de las alternativas por las que optan las bacterias para sobrevivir y protegerse, es la formación de biopelículas.

Anteriormente se mencionó al gen *rpoS* como modulador del estrés que regula los mecanismos para la sobrevivencia de las bacterias ante condiciones desfavorables. Sin embargo, la correlación de *rpoS* con el proceso de formación de biopelículas no se ha elucidado completamente en el caso del género *Vibrio*. Lo que hasta ahora se ha estudiado es la regulación de algunos procesos mediados por *rpoS*, los cuales participan en la formación de biopelículas (pero no son exclusivos).

Por ejemplo, se ha estudiado la intervención de *rpoS* en procesos como la formación de flagelos y el *quorum sensing* (Guan *et al.*, 2015). También se ha sugerido que la quimiotaxis, un tipo de movilidad que puede ocurrir cuando existe un cambio de ambientes, puede ser regulada por *rpoS* (Ringgaard *et al.*, 2015). No se ha descrito una asociación entre el incremento de la producción de las proteínas de la quimiotaxis y el movimiento del flagelo para sensar la superficie y comenzar la producción de biopelículas (González-Tinoco *et al.*, 2015).

Se tiene el conocimiento de que las etapas de reconocimiento de la superficie y la adhesión de la célula bacteriana no dependen directamente de señales provenientes del ambiente (Silva *et al.*, 2003); por lo tanto, aún no se ha descrito si los mecanismos de regulación frente al estrés tienen un efecto significativo en TCP y MSHA, y por ende una repercusión en esta etapa de la formación de biopelículas.

Finalmente, en la última etapa en la que se pudiera observar la repercusión directa del estrés en la formación de biopelículas es en la multiplicación y síntesis

de polímeros (EPS y VPS) y proteínas (RbmA, RbmC y Bap1) que conforman la arquitectura de la biopelícula. Cuando estos componentes no logran estar presentes se forman biopelículas estructuralmente inestables (Moorthy *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2007).

Se ha descrito que síntesis de VPS es codificada por el grupo de genes *vpsA* a *vpsK* y *vpsL* a *vpsQ* (Muller *et al.*, 2007). Anteriormente se mencionó que la promoción de la producción de VPS y EPS, puede ser mediada por AphA; sin embargo, existe evidencia de que a su vez puede ser regulada por HapR (Yildiz *et al.*, 2004). Lo que se sabe es que a su vez HapR, puede ser modulado por *rpoS* (Wang *et al.*, 2014). Por lo tanto, no se conoce si *rpoS* interviene en estos procesos.

Uno de los moduladores que pudieran regular algún proceso en la formación de biopelículas es *rpoX*, quien modula la síntesis de flagelo en *V. alginolyticus*, que a su vez puede ser regulado por RpoE, quien es más activo en situaciones de estrés causado por el incremento de temperatura (Gu *et al.*, 2019). Adicionalmente, en respuesta a situaciones de estrés ompU (proteína transmembranal) y el sistema ToxRS en conjunto regulan la expresión de RpoE, para combatir la situación de estrés (Haines-Menges *et al.*, 2014); esta respuesta conjunta puede regular positiva o negativamente otros mecanismos como la expresión de MSHA y TCP, quienes participan en la etapa de unión irreversible a la superficie.

Adicionalmente ToxR se ha descrito que participa en la respuesta a estrés en condiciones ácidas en conjunto con LeuO (Ante *et al.*, 2015); esta respuesta conjunta también se ha asociado en la modulación de la remodelación de la membrana celular en condiciones de estrés (Bina *et al.*, 2016), lo cual podría tener repercusión en la formación de biopelículas.

Por último, Townsley *et al.* (2016), describieron que en un cambio de temperaturas es posible detectar un cambio en la expresión de los genes *aphA*, *hapR*, *vpsR*, *vpsT* y *vpsL*, que se asocian con un cambio estructural en la matriz de las biopelículas, concluyendo que cada uno de los reguladores antes mencionados tiene un papel fundamental en la construcción de la biopelícula, y que un cambio en su expresión podría tener repercusión en la estructura de la biopelícula.

#### 2.4.4 Importancia del estrés bacteriano y su implicación en la inocuidad alimentaria.

Las bacterias pueden estar expuestas a condiciones adversas en cualquier punto de la cadena de preparación de alimentos (Figura 6).

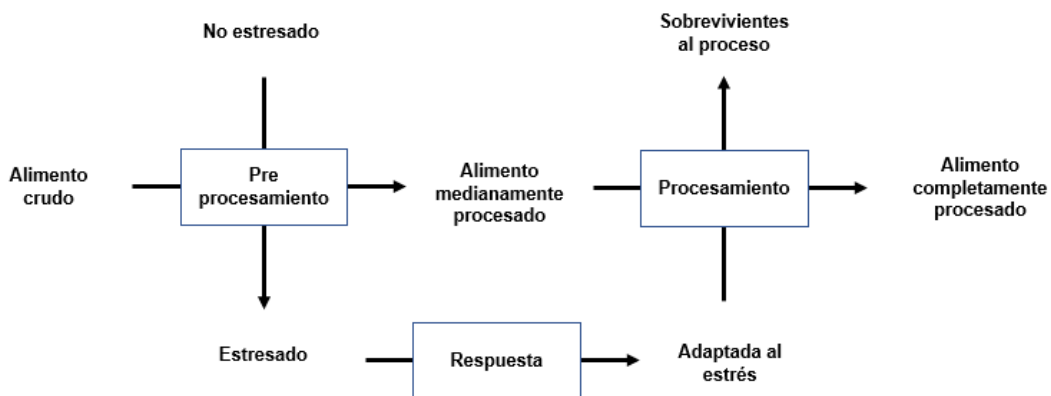


Figura 6. Peligros asociados con la adaptación al estrés de patógenos durante la cadena de procesamiento de alimentos. Adaptada de Yousef y Juneja 2003.

En el preprocesamiento, las bacterias suelen estar expuestas a una serie de factores como cambios en el pH que pueden causar estrés celular. La exposición a un estrés ligero puede conferirles una tolerancia adicional a las células, en cuyo caso, podrían resistir los tratamientos a los que los alimentos son sometidos durante su procesamiento (Yousef y Juneja, 2003). Los microorganismos que sobreviven a los tratamientos aplicados durante el preprocesamiento de los alimentos son de especial cuidado, ya que pueden adquirir tolerancia a dichos factores, y modificar la capacidad para formar biopelículas, la expresión de genes de virulencia, la resistencia a desinfectantes y antimicrobianos, su sobrevivencia y multiplicación en alimentos (Byun *et al.*, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por bacterias del género *Vibrio* han ido en aumento en los últimos años y se han asociado a la ingesta de alimentos marinos principalmente aquellos que se consumen crudos, insuficientemente cocidos o marinados con ingredientes como jugo de cítricos. Estos tratamientos no garantizan la eliminación del patógeno, y sí generan un ambiente hostil que causa estrés fisiológico a las células. Las células en esta condición de estrés pueden adaptarse modificando sus procesos metabólicos para favorecer su sobrevivencia. Al favorecer la sobrevivencia de las células se incrementa la probabilidad de estar en contacto con otros alimentos o superficies, propiciando la dispersión del patógeno.

La persistencia y sobrevivencia de *Vibrio* spp. en superficies se favorece con la producción de biopelículas. Los mecanismos que regulan tanto la formación de biopelículas como la adaptación al estrés se han descrito puntualmente. Específicamente, en la regulación de la respuesta ante el estrés la participación de factores sigma (*rpo*), y otros mecanismos reguladores como la descarboxilación de aminoácidos, las bombas de flujo y la sobreexpresión de porinas en la membrana, juegan un papel fundamental en la regulación del proceso. Hasta ahora, no se ha descrito el papel específico de los factores sigma (*rpo*) durante la formación de biopelículas generadas por células bacterianas estresadas, o la subregulación mediada por otros factores sigma para la expresión o silenciamiento de funciones que combaten el estrés y que pueden estar participando en la formación de biopelículas. Esta información es necesaria para poder entender la capacidad de sobrevivencia y permanencia de *Vibrio* spp. en superficies inertes y las implicaciones que esta situación tendría sobre la salud del consumidor.

#### **4. HIPÓTESIS**

El ácido cítrico genera un daño subletal a células de *Vibrio* spp. que incrementa su capacidad para producir biopelículas en superficies inertes cambiando en la biopelícula la composición química y estructura, favoreciendo su estabilidad. Mientras que, a nivel genético, la modulación de los factores sigma (*rpo*) activa las cascadas de señalización de los mecanismos de recuperación de las células estresadas y de la formación de biopelículas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del estrés fisiológico causado por ácido cítrico a cepas de *Vibrio* spp. sobre su capacidad para formar biopelículas estables en superficies inertes y elucidar el papel de los factores sigma en la modulación.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar cepas de *Vibrio* spp. de alimentos de origen marino y superficies de contacto, y determinar su capacidad para formar biopelículas.
2. Evaluar el efecto del ácido cítrico sobre el estado fisiológico de *Vibrio* spp. y su influencia en la formación de biopelículas en superficies inertes empleadas en sitios de preparación de alimentos.
3. Determinar las características morfológicas y la composición de las biopelículas formadas en superficies inertes por células de *Vibrio* spp. expuestas a ácido cítrico.
4. Elucidar el papel de los factores sigma como moduladores en la formación de biopelículas en superficies inertes y establecer posibles convergencias en las cascadas de regulación con la respuesta al estrés ácido.

## **6. METODOLGÍA**

### **6.1 Aislamiento de cepas de *Vibrio* spp. a partir de alimentos de origen marino y superficies de contacto con alimentos**

#### **6.1.1 Obtención de las muestras**

Se realizaron muestreos de alimentos de origen marino y de superficies de contacto en marisquerías ubicadas en mercados públicos de la ciudad de Querétaro. Los alimentos se adquirieron a granel (aproximadamente 250 g), y las tablas de picar (25 x 20 cm), cuchillos (1 pieza) y charolas (30 x 40 cm) se muestrearon con una gasa estéril humedecida con solución salina estéril (3% m/v) en el sitio de preparación. Las muestras se transportaron en una hielera que contenía geles refrigerantes al Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA) de la Universidad Autónoma de Querétaro para su análisis (no más de 2 horas después de su recolección).

#### **6.1.2 Detección e identificación de *Vibrio* spp.**

La detección de *Vibrio* spp. se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos en el *Bacteriological Analytical Manual* de la FDA (Kaysner y De Paola, 2004). Las muestras de alimentos (25 g) y las gasas se colocaron en una bolsa estéril y se agregaron 225 y 50 mL de agua peptonada alcalina (APA; DIBICO, México), respectivamente. Se homogenizaron automáticamente por 1 min a velocidad normal y se incubaron a 35 °C por 24 h. Posteriormente se estrió una asada del alimento enriquecido en placas de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS; Dibico, México) y se incubaron a 35 °C por 24 h. Las colonias presuntivas (de 2 a 3 mm, lisas, ligeramente aplanadas, con centros opacos y periferias translúcidas) se aislaron en placas de agar soya tripticaseína (Dibico, México) adicionado de 2.5% NaCl (ASTN; Difco, Merck, México) y se incubaron a 35 °C por 24 h. A las colonias que desarrollaron se les realizó la prueba de oxidasa empleando tiras reactivas (Bactident, Merck), y las que resultaron positivas se almacenaron en caldo soya tripticaseína adicionado de 2.5% NaCl (CSTN,



Dibico, México) y 15% de glicerol (Merck, México) a -70 °C para su uso en estudios posteriores.

Las colonias amarillas se consideraron presuntivas a las especies *V. cholerae*, *V. alginolyticus* o *V. fluvialis*, mientras que las colonias verdes a las especies *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* o *V. mimicus*. De acuerdo con la morfología colonial observada, se amplificaron los genes específicos para cada especie mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 1).

Para ello a partir de los cultivos en congelación, se transfirió una alícuota (100 µL) a CSTN y se incubó a 35 °C por 24 h; este procedimiento se repitió una vez. Se realizó el lavado del cultivo y la extracción del ADN. Brevemente, a partir de la última transferencia se tomó una alícuota del cultivo (1 mL) y se colocó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 11 000 x g durante 3 min, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con solución salina estéril (2.5%). Posteriormente, se colocaron los tubos en una placa de calentamiento (Eppendorf, EE.UU.) a 92 °C durante 20 min y posteriormente se enfriaron en un contenedor con hielo.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 10 µL, que consistió en 5 µL GoTaq green master mix (Promega, México), 0.5 µL de cada iniciador, 3 µL de agua libre de nucleasas grado molecular y 1 µL de ADN genómico. La reacción se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones especificadas en la Tabla 2 para cada reacción en el termociclador Verity Flex (Applied Biosystems, EE.UU.). Para comprobar la amplificación de los productos se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Bioline, UK) teñido con una solución de 0.004% de SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen, EE. UU.), la electroforesis se llevó a cabo por 45 min a 90 V y la imagen se obtuvo en un fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

Tabla 1. Iniciadores empleados para la identificación de especies del género *Vibrio*.

Especie	Gen	Iniciador	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
VP	<i>tlh</i>	F	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	Bej <i>et al.</i> , 1999
		R	GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC		
VC	<i>ompW</i>	F	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG	427	
		R	CGTTAGCAGCAAGTCCCAT		
VA	<i>gyrB</i>	F	GAGAACCCGACAGAAGCGAAG	337	Wei <i>et al.</i> , 2014
		R	CCTAGTGCGGTGATCAGTGTTG		
VV	<i>vwA</i>	F	TTCCAAC TTCAAACCGAACTATGA	205	
		R	ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG		
VF	<i>toxR</i>	F	GACCAGGGCTTTGAGGTGGACGAC	217	Vinothkumar <i>et al.</i> , 2013
		R	AGGATACGGCACTTGAGTAAGACTC		
VM	<i>vmh</i>	F	GGTAGCCATCAGTCTTATCACG	300	Shi <i>et al.</i> , 2000
		R	ATCGTGTCCCAATACTTCACCG		

\*VP: *V. parahaemolyticus*, VC: *V. cholerae*, VA: *V. alginolyticus*, VV: *V. vulnificus*, VF: *V. fluvialis*, VM: *V. mimicus*.

Tabla 2. Condiciones de las reacciones de PCR para la identificación de especies del género *Vibrio*.

Especie	Gen	Condiciones		Referencia
VP	<i>Tl</i>	Desnaturalización inicial		Bej <i>et al.</i> , 1999
			94 °C, 3 min	
			94 °C, 60 s	
		30 ciclos	58 °C, 60 s	
			72 °C, 60 s	
	Elongación final	72 °C, 5 min		
VC	<i>ompW</i>	Desnaturalización inicial		Wei <i>et al.</i> , 2014
			94 °C, 3 min	
			94 °C, 30 s	
	30 ciclos	60 °C, 30 s		

			72 °C, 120 s	
		Elongación final	72 °C, 10 min	
		Desnaturalización inicial	94 °C, 3 min	
VA	<i>gyrB</i>	30 ciclos	94 °C, 30 s 60 °C, 30 s	
			72 °C, 120 s	
		Elongación final	72 °C, 10 min	
		Desnaturalización inicial	94 °C, 3 min	
VV	<i>vvhA</i>	30 ciclos	94 °C, 30 s 60 °C, 30 s	
			72 °C, 120 s	
		Elongación final	72 °C, 10 min	
		Desnaturalización inicial	94 °C, 5 min	
VF	<i>toxR</i>	30 ciclos	94 °C, 30 s 62 °C, 45 s 72 °C, 60 s	Vinothkumar <i>et al.</i> , 2013
		Elongación final	72 °C, 10 min	
		Desnaturalización inicial	94 °C, 1 min	
VM	<i>Vmh</i>	29 ciclos	94 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C, 30 s	Shi <i>et al.</i> , 2000
		Elongación final	72 °C, 5 min	

\*VP: *V. parahaemolyticus*, VC: *V. cholerae*, VA: *V. alginolyticus*, VV: *V. vulnificus*, VF: *V. fluvialis*, VM: *V. mimicus*.

## **6.2 Evaluación de la capacidad de *Vibrio* spp. para formar biopelículas**

### **6.2.1 Preparación del cultivo**

A partir de las cepas aisladas mantenidas en congelación, se transfirió una alícuota (100  $\mu$ L) a CSTN y se incubó a 35 °C por 18 h; este procedimiento se repitió una vez. De la última transferencia se tomó una alícuota del cultivo (1 mL) y se transfirió a microtubos de 1.5 mL, y se centrifugó a 11 000 x g durante 3 min, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del pellet con solución salina estéril (2.5%). Se prepararon diluciones decimales en solución salina estéril (2.5%) hasta obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. La cuantificación del inóculo inicial se llevó a cabo por extensión en superficie en ASTN y las placas se incubaron a 37 °C por 24 h.

### **6.2.2 Ensayo en microplaca**

A las cepas aisladas se les determinó la capacidad para formar biopelículas *in vitro* mediante el ensayo en microplacas de 96 pozos, según la metodología descrita por Han *et al.* (2016).

En cada uno de los pozos de la microplaca, se colocaron 180  $\mu$ L de CSTN y se inocularon independientemente con 20  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de cada una de las cepas a probar, resultando una concentración final de aproximadamente  $10^4$  UFC/mL en cada pozo; se incluyó como blanco un pozo con caldo sin inocular. Las microplacas se incubaron a 35 °C sin agitación, y se realizaron mediciones de la densidad óptica (DO) a 600 nm en un lector de microplacas (Multiskan 60, Thermo Scientific) a las 24, 48 y 72 h. Posterior a la lectura se realizó la tinción con cristal violeta. Brevemente, se decantó el cultivo y se realizaron 2 lavados con solución salina al 2.5%; posteriormente se añadieron 200  $\mu$ L de metanol (Merck, México) y se dejó reposar por 15 min, se decantó y se dejó secar totalmente, a temperatura ambiente. Se le añadieron 200  $\mu$ L de una solución de cristal violeta (0.1% m/v; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el colorante y se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se añadieron

200 µL de ácido acético (30%, v/v) (Merck, México) y se midió DO a 595 nm en un lector de placas.

Con los datos obtenidos se calculó el índice de formación de biopelículas (IFB) aplicando la siguiente ecuación:

$$IFB = \frac{AB - CW}{GB - GW}$$

Donde: AB es la absorbancia de los pozos teñidos con cristal violeta; CW es la absorbancia del blanco (pozos con medio de cultivo no inoculado y tratado con cristal violeta); GB es la absorbancia de los cultivos en suspensión y GW es la absorbancia del pozo con medio sin inocular; GB y GW se midieron a 600 nm. Para la clasificación de IFB se tomó como referencia los criterios establecidos por Han *et al.* (2016) (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de Han *et al.* (2016) para la clasificación del IFB.

Criterio	Valor de IFB
Nulo	<0.35
Débil	0.35 - 0.69
Moderado	0.70 - 1.09
Fuerte	>1.10

Adicionalmente, la cuantificación de la población final en las biopelículas formadas (72 h) por cada una de las cepas se llevó a cabo por extensión en superficie en ASTN y las placas se incubaron a 37 °C por 24 h.

### 6.2.3 Análisis estadístico

Todos los ensayos de formación de biopelículas en microplaca por las cepas de *Vibrio* spp. aisladas se realizaron por triplicado y con 5 réplicas independientes. Adicionalmente se realizó una prueba de correlación entre la formación de biopelículas y el crecimiento bacteriano. Se usó el programa estadístico JMP versión 8.0.

### **6.3 Evaluación del efecto del ácido cítrico en la viabilidad de células planctónicas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae***

#### **6.3.1 Selección de cepas**

Se seleccionaron dos cepas de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) ya que resultó ser la especie de mayor frecuencia de aislamiento, y dos cepas de *V. cholerae* (VCO y VC6) por ser la especie de mayor importancia epidemiológica en México. Adicionalmente se utilizó el IFB como otro criterio, y de cada especie se seleccionó una cepa débil y otra fuerte formadora de biopelículas.

#### **6.3.2 Exposición de las cepas seleccionadas a los tratamientos estresantes**

Se preparó el inóculo de las cepas de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) como se describió en 6.2.1, con la variación de que los cultivos se incubaron durante 6 h (fase logarítmica) y 18 h (fase estacionaria). Los cultivos de cada una de las cepas se inocularon ( $10^5$  UFC/mL) en tubos con 9 mL de diluyente de peptona adicionados con 1% de NaCl (DPN) ajustado con ácido cítrico (10%) (Merck, México) a pH 4.5, 5.0, 5.5 y 7.0, se homogenizaron y se incubaron a 20 °C por 180 min.

#### **6.3.3 Cuantificación de células estresadas y no estresadas en medios de cultivo**

Después de 0, 60, 120 y 180 min de exposición a los tratamientos se tomaron alícuotas (1 mL) y se inocularon en tubos con solución amortiguadora de fosfatos salinos (0.1 M PBS; pH 7.4), con el objetivo de neutralizar el efecto del pH. A partir de los tubos con PBS, se realizaron las diluciones decimales correspondientes para realizar la cuantificación de las células en ASTN, ASTN adicionado con 1% de glucosa (ASTNG) (Merck, México), ASTN adicionado con 0.1% de piruvato de sodio (ASTNP) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y TCBS (Dibico, México) mediante la técnica de extensión en superficie; las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

#### **6.3.4 Cuantificación del daño celular por medio de citometría de flujo**

De cada uno de los tratamientos (6.3.2) se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos y se colocó en microtubos de 1.5 mL, se centrifugaron (11 000 x g durante 3 min), se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS; después del segundo lavado el paquete celular se resuspendió en 1 mL de DPN ajustado a pH 4.5, 5.0, 5.5 y 7.0.

Para la tinción con los fluorocromos, se siguió la metodología propuesta por Silva *et al.* (2011). Brevemente, a los 0, 60, 120 y 180 min de exposición a los tratamientos, dos tubos de cada tratamiento se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y a un tubo se adicionó 1 mL de una solución de yoduro de propidio (1 µg/mL en PBS) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y al otro tubo se le adicionó 1 mL de una solución de bromuro de etidio (10 µg/mL en PBS) (Bio-Rad, EE.UU.); los tubos se homogenizaron y se incubaron a 37 °C por 15 min. Posterior a la incubación, se centrifugaron y se realizó un lavado con PBS, para proceder a la lectura en un citómetro de flujo (Cytotflex, Beckman-Coulter, EE.UU.) a 488 nm de longitud de onda y flujo medio de 12 µL/min; se ajustó la medición de 20 000 eventos. Las mediciones obtenidas de dispersión de luz (*lightscatter*) y de fluorescencia fueron analizados en el software CytExpert versión 2.4 (Beckman-Coulter, EE.UU.) y graficadas en escala logarítmica usando los filtros correspondientes a la señal de dispersión lateral (*side scatter*, SSC) y PE A/H. Los ensayos de citometría de flujo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

#### **6.3.5 Determinación de la recuperación celular en caldo de cultivo**

Las cepas se expusieron a los tratamientos estresantes como se mencionó en el apartado 6.3.2. A los 0, 60, 120 y 180 min de exposición a los tratamientos se tomó una alícuota (1 mL) y se neutralizó en un tubo con 9 mL PBS, a partir de este tubo se inoculó una microplaca estéril de 96 pozos que contenían CSTN pH 7.0. Se incluyeron como blanco 5 pozos con caldo sin inocular. Las microplacas se incubaron a 35 °C sin agitación, y se realizaron mediciones de la DO a 600

nm en un lector de microplacas (Multiskan FC 60, Thermo Scientific) durante 24 h.

Para conocer la dinámica de desarrollo de las cuatro cepas se inocularon (20  $\mu$ L) individualmente en CST (pH 7.0) y se incubaron a 35 °C durante 24 h; periódicamente se realizaron mediciones de la DO a 600 nm en un lector de microplacas y se tomó una alícuota para la cuantificación de las poblaciones en ASTN por medio de extensión en superficie, las placas se incubaron a 37 °C por 24 h.

Los datos obtenidos de la cuantificación de UFC fueron utilizados para realizar una curva de calibración, transformando los valores de DO obtenidos en cada lectura y se transformaron a UFC, se sometieron a un modelaje primario basado en el modelo de Baranyi y Roberts (Baranyi y Roberts, 1994) utilizando el software DMFit v3.0 (ComBase; <http://www.combase.cc/tools/>) en donde se obtuvo el tiempo de detección y la velocidad de desarrollo.

### **6.3.6 Análisis estadístico**

Los ensayos de cuantificación de poblaciones estresadas y no estresadas en medios de cultivo y recuperación celular en caldo de cultivo (6.3.3 y 6.3.5) se realizaron por triplicado y con 3 réplicas independientes. Los ensayos de citometría de flujo (6.3.4) se realizaron en 2 réplicas independientes. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Se realizó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado en donde los factores y niveles a evaluar fueron: cepa (VA3, VA11, VCO y VC6.), fase de cultivo (logarítmica y estacionaria), pH (4.5, 5.0, 5.5), tiempo de exposición al tratamiento (60, 120 y 180 min), medio de cultivo (TSAN, TSANG, TSANP, TCBS; este factor sólo se consideró para los ensayos de cuantificación de poblaciones estresadas y no estresadas en medios de cultivo). Las respuestas evaluadas fueron: la población cuantificada en cada medio de cultivo (6.3.3); el % de células teñidas con yoduro de propidio (daño a membrana); el % de células teñidas con bromuro de etidio (actividad de bombas de fujo) (6.3.4); la duración del tiempo de detección y la velocidad máxima de desarrollo (6.3.5).



Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer. Considerándose un efecto significativo  $p < 0.05$ . Se usó el programa estadístico JMP versión 8.0.

#### **6.4 Evaluación del efecto del estrés causado por ácido cítrico sobre células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en la formación de biopelículas.**

Se evaluó el efecto de la exposición a ácido cítrico a diferentes pH sobre la capacidad de *Vibrio* spp. para formar biopelículas *in vitro*, y en superficies inertes de uso común en los sitios de preparación de alimentos con presencia de residuos de pescado.

##### **6.4.1 Evaluación de la formación de biopelículas en microplaca**

La capacidad de células estresadas (expuestas a pH 4.5, 5.0 y 5.5 por 180 min) y no estresadas (pH 7.0) de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) para formar biopelículas se determinó mediante el ensayo en microplaca anteriormente descrito (6.2.2.). Brevemente, se prepararon cultivos frescos de las cuatro cepas seleccionadas en CSTN y se incubaron a 35 °C por 6 y 18 h. Los cultivos se lavaron dos veces con solución salina estéril (2.5%). Cada una de las cepas se inoculó ( $10^5$  UFC/mL) en tubos con 9 mL de diluyente de peptona adicionados con 1% de NaCl (DPN) ajustado con ácido cítrico (10%) (Merck, México) a pH 4.5, 5.0, 5.5 y 7.0, se homogenizaron y se incubaron a 20 °C por 180 min. A los 0, 60, 120 y 180 min se tomó 1 mL y se neutralizó en un tubo con 9 mL de PBS. A partir de los cultivos neutralizados se inocularon 20  $\mu$ L en microplacas de 96 pozos, que contenían CSTN (180  $\mu$ L por pozo) ajustado a pH 4.5, 5.0, 5.5 y 7.0. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 72 h; cada 24 h se realizó la tinción con CV y posteriormente la lectura de la DO a 595 nm para determinar la formación de biopelículas.

##### **6.4.1.1 Análisis estadístico**

Los ensayos de formación de biopelículas en microplaca se realizaron por triplicado y con tres réplicas independientes. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Se realizó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado en donde los factores y niveles a evaluar fueron: cepa (VA3, VA11, VCO y VC6), fase de cultivo (logarítmica y estacionaria), pH expuesto antes de la formación de biopelículas (4.5, 5.0, 5.5, 7.0), pH expuesto durante la formación de biopelículas (4.5, 5.0, 5.5, 7.0) tiempo de exposición al tratamiento (60, 120 y 180 min), tiempo de formación de biopelícula (24, 48 y 72 h); la respuesta evaluada fue la producción de biopolímeros.

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer. Considerándose un efecto significativo  $p < 0.05$ . Se usó el programa estadístico JMP versión 8.0.

#### **6.4.2 Evaluación de la formación de biopelículas en superficies inertes con residuos acidificados de pescado**

##### **6.4.2.1 Preparación del extracto de pescado**

Se preparó extracto de pescado estéril con filete de tilapia (adquirido en supermercado) en agua destilada (1:10 m/v) y se homogeneizó durante un minuto a velocidad normal en un homogeneizador peristáltico (Lab-Blender 400, Tekmar Co., Cincinnati, OH, USA). La suspensión se centrifugó a 11 000 x g durante 5 min y el sobrenadante obtenido se filtró dos veces con papel filtro convencional, y un tercer filtrado con un papel filtro Whatman 40 (Whatman, Inglaterra). Finalmente, la suspensión obtenida se ajustó a pH 5.0 con ácido cítrico (10 %) y asépticamente se filtró con una membrana (0.22  $\mu\text{m}$ ) estéril (Merck, USA). El extracto preparado se dispense en viales de 50 mL y se almaceno en congelación (-20° C) hasta su uso; en cada experimento se descongeló a temperatura de refrigeración y se le realizaron pruebas microbiológicas para verificar la ausencia de contaminación.

##### **6.4.2.2 Preparación de las superficies inertes**

Se utilizaron cuadros de acero inoxidable (1 x 1 cm) grado alimenticio (AISI 305, calibre 16) y de tablas de picar de plástico (1 x 1 cm). De manera separada, en

tubos Falcon de 15 mL se colocaron 2 mL de CSTN (pH 7.0 y 5.0 ajustado con ácido cítrico 10%) y dentro se colocaron los cuadros de las superficies sumergiéndolos completamente (un cuadro por tubo), y se esterilizaron por calor húmedo (15 min, 15 psi, 121°C). Se preparó otro lote de tubos Falcon a los cuales se les introdujo un cuadro de acero inoxidable o plástico, se esterilizaron, y posteriormente en condiciones de esterilidad a cada tubo se adicionó el extracto de pescado estéril (2 mL).

#### **6.4.2.3 Formación de biopelículas en superficies inertes**

Se evaluó la formación de biopelículas en superficies inertes con residuos de pescado acidificados con ácido cítrico y almacenados en una cámara de alta humedad relativa controlada (Hernández-Iturriaga *et al.*, 2007), con la finalidad de simular un ambiente de preparación de alimentos de origen marino. Brevemente, se prepararon cultivos en fase logarítmica (6 h de incubación) y estacionaria (18 h de incubación) de las cepas de *V. cholerae* (VCO y VC6). Un mililitro de cada cultivo se inoculó en 9 mL de CSTN (pH 5.0 y pH 7.0) y 9 mL de extracto de pescado acidificado con ácido cítrico (pH 5.0); los tubos se incubaron a 22 °C por 60 min. Posteriormente se inocularon 100 µL de cada uno de los tratamientos en los tubos que contenían las superficies, se homogenizaron en un vortex, y se incubaron estáticamente por 4 h a 22 °C. Al término de la incubación asépticamente se decantó el medio de cultivo, y se realizaron tres enjuagues con solución salina (2%) sin agitación para retirar las células que no se adhirieron fuertemente a las superficies. A cada una de las superficies se les aplicó un enjuague final con CSTN a pH 7.0, CSTN a pH 5.0 o extracto de pescado acidificado estéril según correspondiera. Las superficies con las células adheridas se colocaron asépticamente dentro de cajas Petri estériles sin tapa, y estas a su vez dentro de contenedores de plástico con cierre hermético a una humedad relativa (HR) de 97% ajustada mediante la adición de una solución saturada de sales de sulfato de potasio. El nivel de la actividad de agua de la solución saturada de las sales se midió con el equipo AquaLab LITE (Decagon Device, Inc., EE.UU.) para asegurar el nivel de humedad requerido. Los contenedores se incubaron a 22 °C durante 72 h y a las 4, 24 y 72 h se realizó la cuantificación de células viables y biopolímeros.

Brevemente, para cuantificar las células, cada una de las superficies se colocó en un tubo Falcon estéril (15 mL) y se añadió 1 mL de DPN, se homogenizó en un vortex por 30 s; a partir de la suspensión celular se prepararon diluciones decimales y se cuantificó la población en ASTN mediante extensión en superficie; las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Para cuantificar los biopolímeros, a las superficies previamente enjuagadas (dos enjuagues consecutivos con solución salina) se les añadió 1 mL de una solución de cristal violeta (0.1% m/v; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el colorante y se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, la superficie se colocó dentro de un tubo limpio, se añadió 1 mL de ácido acético (30%, v/v) (Merck, México), se homogenizó en un vortex por 30 s y se transfirió 1 mL a una microplaca de 24 pozos para realizar la medición de la DO a 595 nm.

#### **6.4.2.4 Composición de los biopolímeros en las biopelículas formadas por *V. cholerae* en superficies inertes**

Para evaluar la composición de los polímeros de las biopelículas de *V. cholerae* formadas en superficies inertes [acero inoxidable y plástico (Nitrile-Rubber)] se utilizó la espectroscopía de Raman.

Brevemente, se realizó la formación de biopelículas en superficies de acero y plástico con las cepas *V. cholerae* (VCO y VC6) como se describió en 6.4.2.3. A las 4, 24 y 72 h se tomó un cuadro de cada superficie para su análisis. Las superficies se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y posteriormente se colocaron en 2 mL de agua destilada estéril, se agitaron con un vortex por 1 min. El líquido obtenido se filtró con una membrana estéril (0.22 µm) para tener un extracto libre de células. El extracto libre de células se analizó en un espectrómetro de Raman (Raman microscopy DXR2, Thermo Scientific), usando un láser de 532 nm, por 1 min de exposición, las medidas se obtuvieron en un rango de 400-1500 cm<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos se analizaron en el paquete OriginPro 2017.

#### **6.4.2.5 Determinación de la estructura de las biopelículas formadas por células de *V. cholerae* expuestas a ácido cítrico**

Se realizó la formación de biopelículas en superficies de plástico (Nitrile-Rubber) inoculadas con la cepa VC6 de *V. cholerae* como se describió en el apartado 6.4.2.3. A las 4, 24 y 72 h se cuantificaron las poblaciones viables y se tomó un cuadro de cada superficie para el estudio de microscopía de fuerza atómica (MFA). Las superficies se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente para poder realizar la medición. Las micrografías de MFA se obtuvieron en un microscopio de fuerza atómica (AFM Innova, Bruker). Todas las imágenes se visualizaron en el modo de contacto del microscopio, usando un cantilever de nitruro de silicio con un radio de 10 nm, un índice de barrido de 2 Hz y una escala de barrido entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Los datos acerca de la interacción del cantilever fueron usados para generar imágenes de superficie de las biopelículas en tercera dimensión. Las imágenes obtenidas se procesaron con el paquete Gwyddion (<http://gwyddion.net/download.php>); adicionalmente el software del microscopio proporcionó los datos de altura y rugosidad.

Los estudios de MFA se realizaron en el Laboratorio de Materiales de Baja Dimensionalidad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Querétaro.

#### **6.4.2.6 Análisis estadístico**

Los ensayos de formación de biopelículas en superficies inertes se realizaron por triplicado y con tres réplicas independientes. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Se realizó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado en donde los factores y niveles a evaluar fueron: cepa (VCO y VC6), fase de cultivo (logarítmica y estacionaria), medio de cultivo para la formación de biopelícula (CSTN pH 7.0, CSTN pH 5.0 y extracto de pescado pH 5.0), tiempo de formación de biopelícula (24, 48 y 72 h) y tipo de superficie (acero inoxidable y plástico); la respuesta evaluada fue la cuantificación de la población y la producción de biopolímeros. Los ensayos de determinación de estructuras químicas de los biopolímeros que conforman las biopelículas se realizaron por cuadruplicado y con dos réplicas independientes. Los resultados fueron expresados como la media de los datos.

La determinación de rugosidad y altura de picos se realizó por triplicado en las lecturas con MFA.

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer considerándose un efecto significativo  $p < 0.05$ . Se usó el programa estadístico JMP versión 8.0.

## **6.5 Análisis transcriptómico de *V. cholerae* durante la formación de biopelículas en superficies de plástico**

Se realizó un análisis transcriptómico para determinar la variación en la expresión de genes y posibles rutas de convergencia en la regulación del proceso de formación de biopelículas y mecanismos de respuesta al estrés por ácido cítrico.

### **6.5.1 Formación de biopelículas, extracción y secuenciación de RNA**

En esta etapa se utilizó un cultivo en fase logarítmica de la cepa VC6 de *V. cholerae*. El cultivo se inoculó en tubos con 9 mL de extracto de pescado acidificado con ácido cítrico (pH 5.0) y 9 mL CSTN (pH 7.0; usado como control) y se incubó durante 60 min a 25° C. Después del tratamiento estresante el cultivo se neutralizó en PBS y se tomó una alícuota de 2 mL (células planctónicas) para llevar a cabo la extracción de ARN. El cultivo neutralizado se inoculó independientemente en tubos que contenían 5 mL de CSTN (pH 7.0) y 5 mL de extracto de pescado acidificado (pH 5.0) y un cuadro de plástico en cada tubo para llevar a cabo la formación de biopelículas a 22 °C durante 24 h (apartado 6.4.2.3). Una vez finalizada la incubación, el cuadro de plástico se enjuagó 2 veces con solución salina (2%) y posteriormente se colocaron en 2 mL solución salina (2%), se agitaron con un vortex por 1 min (células en biopelícula); la suspensión obtenida se utilizó para la extracción de ARN.

A partir de las suspensiones obtenidas de las células planctónicas después de la exposición al ácido y de las células en biopelículas, se realizó la extracción de ARN mediante el kit comercial Allprep® PowerViral® DNA/RNA Kit (Qiagen, Mexico) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración del material genético se midió con el equipo NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific)

verificándose que se contaba con una concentración mayor a 50 µg/µL. Para comprobar la integridad del material genético se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Bioline, UK) teñido con una solución de 0.004% de SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen, EE. UU.), la electroforesis se llevó a cabo por 45 min a 90 V y la imagen se obtuvo en un fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®). El ARN extraído se mantuvo en ultracongelación a -70 °C.

La generación de bibliotecas y la secuenciación de ARN (aproximadamente 110 millones de lecturas, sin filtrar 2 x150) se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, unidad Irapuato mediante la plataforma Illumina Next Seq.

Se usó el programa fastp v0.23.2 (<https://github.com/OpenGene/fastp>) para realizar el análisis de control de calidad y recorte de bordes (trimming) por baja calidad. Cada par se procesa por separado, después del filtrado, cada biblioteca presentó una buena calidad con >94% secuencias pasando los filtros.

El genoma de *V. cholerae* usado como referencia fue obtenido de NCBI, usándose las secuencias NZ\_CP043554.1, NZ\_CP043555.1 y NZ\_CP043556.1 (ASM836960v1). Se indexó el genoma para ser usado con HiSAT2 v2.2.1 (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/>) y cada muestra se alineó al genoma con parámetros por defecto solo excluyendo fragmentos no alineados.

Los fragmentos alineados fueron procesados con StringTie v2.2.1 (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>) para obtener un valor estimado de la expresión. Para los modelos génicos se usaron los GFF3 del genoma de referencia, cada muestra generó una tabla de expresión, usando las tablas de abundancia para generar la tabla general con la expresión de los 1406 genes con conteos al convertir el valor de TPM a su valor estimado.

La tabla de expresión se analizó con edgeR v3.36.0 en R v4.0.4, al no tener réplicas suficientes para estimar el valor de dispersión, se usó un valor genérico de 0.2 para los cálculos de genes diferenciales. Para realizar el análisis de la expresión diferencial de genes se realizaron 2 comparaciones principales: 1) la expresión diferencial de los genes en cada una de las etapas de formación de biopelículas, y 2) la expresión diferencial de los genes en las células expuestas o no a ácido cítrico. Para el análisis de enriquecimiento de ontología génica, se agruparon en términos de procesos biológicos y estos a su vez se agruparon en

los subconjuntos de genes indicados en la plataforma en línea del Gene Ontology Consortium ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Prevalencia de *Vibrio* spp. en alimentos y superficies de contacto

En el periodo comprendido de marzo a junio de 2018 en mercados públicos de la ciudad de Querétaro se colectaron muestras de filete de pescado (37), camarón (30), ostiones (25), almejas (21), pulpo (12), alimentos crudos marinados (11) y de superficies inertes que tienen contacto con alimentos (14). *Vibrio* spp. se detectó en 74 de 150 (49.3%) muestras (Tabla 5). La prevalencia de *Vibrio* en filete de pescado fue 27.0%, en camarón 46.7%, en ostiones 76.0%, en almejas 61.9%, en pulpo 50.0%, en alimentos crudos marinados 36.4% y en superficies inertes 57.1%.

Tabla 4. Prevalencia de especies de *Vibrio* en mariscos expedidos en Querétaro.

Tipo de muestra	Prevalencia +/n (%)	Especies detectadas <sup>1</sup>						Otras especies de <i>Vibrio</i>
		VA	VV	VC	VP	VM	VF	
Filete de pescado	10/37 (27.0)	4 <sup>2</sup>	1	2	1	0	0	2
Camarón	14/30 (46.7)	4	1	2	0	1	0	6
Ostión	19/25 (76.0)	4	3	2	4	0	0	6
Almeja	13/21 (61.9)	2	3	0	1	0	0	7
Pulpo	6/12 (50.0)	3	0	0	0	0	0	3
Alimentos crudos marinados <sup>3</sup>	4/11 (36.4)	2	1	1	0	0	0	0
Superficies de contacto <sup>4</sup>	8/14 (57.1)	3	0	0	0	0	0	5
<b>TOTAL</b>	<b>74/150 (49.3)</b>	<b>22</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>29</b>

<sup>1</sup>VA: *V. alginolyticus*, VV: *V. vulnificus*, VC: *V. cholerae*, VP: *V. parahaemolyticus*, VM: *V. mimicus* y VF: *V. fluvialis*. <sup>2</sup>Número de muestras en las que se detectó la especie. <sup>3</sup>Camarón u ostión crudos con jugo de limón. <sup>4</sup>Tablas de picar, cuchillos, charolas y balanzas

La prevalencia de *Vibrio* spp. en alimentos de origen marino es muy variable, oscila entre el 10% (Ahmed *et al.*, 2018) y el 95% (Sperling *et al.*, 2015). La alta presencia de *Vibrio* en alimentos de origen marino es considerada inherente debido a que este habita naturalmente en ambientes acuáticos (Sperling *et al.*,

2015), lo que genera una contaminación de origen en pescados y mariscos, aun cuando estos han sido cultivados y no capturados (Koralage *et al.*, 2012). La alta prevalencia encontrada en este estudio puede asociarse a los meses en que se realizó el muestreo, ya que se ha reportado que de marzo a julio aumenta la temperatura del ambiente, así como la concentración del patógeno en los cuerpos acuáticos (Quiñones, 2010, Koralage *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2013; Sperling *et al.*, 2015; Obaidat *et al.*, 2017). En México en esos meses aumenta la producción y consumo de peces y mariscos (pesca o cultivo) (SAGARPA, 2010; SIAP, 2018).

Se aislaron 80 cepas de las muestras, positivas a la prueba de oxidasa y se identificaron por PCR como: *V. alginolyticus* (22), *V. vulnificus* (9), *V. cholerae* (7), *V. parahaemolyticus* (6) y *V. mimicus* (1). Las veintinueve cepas restantes que no dieron positivo a ninguna de las 6 especies patógenas buscadas fueron denominadas *Vibrio* spp. (Tabla 5).

En las muestras de filete de pescado, camarón y ostión, se encontró mayor diversidad de especies que en el resto de los alimentos. La especie más abundante aislada de alimentos de origen marino fue *V. alginolyticus*, a excepción de los ostiones y almejas en donde las especies más abundantes fueron *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, respectivamente. *V. alginolyticus* es la especie que tuvo mayor prevalencia en Sri Lanka (34.6%) (Koralage *et al.*, 2012), Alemania (35.6%) (Vu *et al.*, 2018) Ecuador (50.2%) (Sperling *et al.*, 2015) y Egipto (16.6%) (Sadat *et al.*, 2021); esta especie ha ganado importancia debido a que es el agente causal de infecciones gastrointestinales que usualmente son mal diagnosticadas (Oh *et al.*, 2011; Jacob-Slifka *et al.*, 2017).

*V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* han sido aisladas de almejas y ostiones (Hernández-Díaz *et al.*, 2015; Lopatek *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2018), ello es de esperarse debido a que son parte de la microbiota de estuarios y cuerpos acuáticos de donde usualmente son colectados (Koralage *et al.*, 2012). En México la prevalencia de *V. parahaemolyticus* reportada en ostiones oscila entre 30 y 50% (Lizárraga-Partida *et al.*, 2009; Quiñones-Ramírez *et al.*, 2010; León-Robles *et al.*, 2013; Hernández-Díaz *et al.*, 2015; Barrera-Escorcía *et al.*, 2016; Fernández-Rendón *et al.* 2018), y es considerada la especie más aislada en las zonas costeras de México, seguida de *V. cholerae* y *V. vulnificus*.

*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los agentes patógenos comúnmente implicados en diversos brotes de infección asociados al consumo de alimentos marinos (CDC, 2016; Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017). Debido a ello, la mayoría de los estudios de prevalencia de *Vibrio*, se han enfocado en la búsqueda e identificación de estas tres especies (Robert-Pillot *et al.*, 2014; Barrera-Escorcia *et al.*, 2016; Fernández-Rendon *et al.*, 2018). Sin embargo, en Estados Unidos los cuadros de infección causados por *V. alginolyticus*, *V. mimicus* y *V. fluvialis* han ido en aumento (CDC, 2016). Por tal motivo, se han implementado protocolos para identificar otras especies de *Vibrio* en alimentos de origen marino, y evidenciar en diferentes partes del mundo su alta prevalencia en estos productos (Huang *et al.*, 2012; Koralage *et al.*, 2012; Sperling *et al.*, 2015).

En este estudio, se aisló a *Vibrio* spp. de alimentos marinados (camarón u ostión crudos, adicionados de jugo de limón y en algunos casos con jitomate, cebolla y cilantro, expendidos como alimentos listos para el consumo); estos alimentos son de importancia debido a que no requieren un tratamiento térmico previo a su consumo; es decir, en caso de contener un patógeno el riesgo al cual está expuesto el consumidor aumenta considerablemente. Obaidat *et al.* (2017), aislaron cepas patógenas pandémicas de *V. parahaemolyticus* de alimentos de origen marino crudos o insuficientemente cocinados; este tipo de alimentos con frecuencia se han implicado como vehículos del patógeno en brotes de enfermedad (CDC, 2022).

Las superficies inertes de contacto con alimentos que se encuentran en el ambiente de preparación de alimentos (charolas, tablas de picar, cuchillos, entre otros utensilios) pueden ser fácilmente contaminados por microorganismos, convirtiéndose en un vehículo que puede favorecer la contaminación cruzada a los alimentos, o un reservorio si el microorganismo patógeno persiste en las superficies. Por ejemplo, en Estados Unidos, se reportó un brote asociado al consumo de un cangrejo de río cocinado, que estaba contaminado con *V. mimicus*; después de la cocción el alimento se almacenó durante la noche en una hielera en la cual se había almacenado al cangrejo vivo y no se lavó y desinfectó previo al almacenamiento del alimento cocinado (Mac Eachen *et al.*, 2010).

Por lo tanto, asegurar que se adquieren pescados y mariscos seguros, así como mantener las buenas prácticas higiénicas durante su preparación, es indispensable para ofrecer al consumidor un alimento seguro.

## 7.2 Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. en función de la formación de biopelículas

### 7.2.1 Capacidad de *Vibrio* spp. para formar biopelículas

Una biopelícula puede servir como mecanismo de sobrevivencia que poseen los microorganismos como *Vibrio* spp., que les permite permanecer en el ambiente por periodos prolongados de tiempo, pudiendo generar una fuente de contaminación constante en ambientes de preparación de alimentos (Mizan *et al.*, 2015). La presencia y contaminación con especies patógenas de *Vibrio* de alimentos de origen marino en los puntos de venta es frecuente (Vu *et al.*, 2018). Esto debido a que, en los puntos de venta existe disponibilidad de nutrientes y condiciones ambientales para que los microorganismos puedan desarrollar, formar una biopelícula, y de esta manera persistir en el ambiente favoreciendo la propagación del patógeno a los alimentos.

A las 51 cepas de *Vibrio* aisladas e identificadas a partir de las muestras de alimentos marinos y de superficies (Anexo I), se les evaluó la capacidad para formar biopelículas en microplaca y medio de cultivo. Esta capacidad se expresó como el índice de formación de biopelículas (IFB), basados en los criterios propuestos por Han *et al.* (2016). El IFB a las 72 h de incubación fue nulo en 29 cepas (56.9%), débil en 12 (23.5%), moderado en 7 (13.7%) y fuerte en 3 (5.9%) (Tabla 6).

Tabla 5. IFB de especies de *Vibrio* aisladas de alimentos de origen marino y superficies inertes.

Especie	IFB			
	Nulo	Débil	Moderado	Fuerte
<i>V. alginolyticus</i>	17	6	1	1
<i>V. cholerae</i>	1	3	2	1
<i>V. mimicus</i>	0	0	1	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	1	1	1
<i>V. vulnificus</i>	8	2	2	0

Total	29	12	7	3
-------	----	----	---	---

Mizan *et al.* (2016), aislaron cepas de *V. parahaemolyticus* de diferentes alimentos de origen marino en donde observaron diferentes IFB; el 32% de las cepas producían una biopelícula débil, 41% moderado y 27% fuerte.

Las diferencias en el IFB pueden estar asociadas principalmente a dos factores: el primero es la variabilidad de las cepas, la cual hace referencia a las diferentes respuestas que presentan las células bacterianas de la misma especie expuestas al mismo tratamiento; el segundo, puede deberse al ambiente nativo del cual la cepa fue aislada (Whiting & Golden, 2002; Fernández- Delgado *et al.*, 2016), en este caso el alimento de donde se aisló la muestra y todo el contexto que representa esa muestra.

En este estudio las cepas aisladas de ostiones, almejas y camarones mostraron mayor capacidad para formar biopelículas, lo cual pudiera estar asociado con la fuente de aislamiento; es decir, ambos tipos de alimentos pueden provenir de estuarios o cuerpos acuáticos, o bien son cultivados en tanques de acuicultura donde las condiciones ambientales (temperatura del agua, salinidad del agua, disponibilidad de nutrientes y presencia de sustancias antimicrobianas) están en continuo cambio (Quiñones *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012; Koralage *et al.*, 2012; Sperling *et al.*, 2015; Obaidat *et al.*, 2017).

El IFB es una correlación entre la biomasa bacteriana y la producción de biopelícula (Naves *et al.*, 2008). De acuerdo con Han *et al.* (2016) el IFB es calculado usando mediciones de DO a las 72 h de incubación. En este estudio, para el monitoreo de la dinámica de formación de biopelículas las mediciones de DO adicionalmente se registraron a las 24 y 48 h. Algunas cepas mostraron un punto de la saturación de la biomasa a las 24 h de incubación con decrementos de los valores de DO a las 48 y 72 h. La presencia elevada de biomasa puede estar asociada con un nivel elevado de formación de biopelícula, y viceversa. Para confirmar la viabilidad de las células se cuantificaron las poblaciones mediante el método de cultivo en placa. Todas las cepas mostraron una población entre 8-9 Log UFC/mL (Anexo II), lo que confirmó que las lecturas elevadas de DO en efecto contenían células viables y, por tanto, el cálculo de IFB se obtuvo en función del número de células viables.

Finalmente, se realizó una prueba de correlación entre la formación de biopelículas y el crecimiento bacteriano, no observando una asociación significativa ( $r^2= 0.0438$ ), lo cual demostró que la formación de biopelículas no estuvo asociada a una cantidad elevada de biomasa bacteriana.

### **7.2.2 Construcción de un nuevo criterio de clasificación cuantitativo de IFB**

El IFB de cada una de las cepas se calculó a las 72 h; sin embargo, como se expresó anteriormente, para el estudio de la dinámica de formación de biopelículas también se realizó el cálculo a las 24 y 48 h de incubación, lo que permitió observar dos tipos de dinámicas de formación de biopelículas: 1) Continuo incremento del IFB, y 2) Incremento de IFB seguido por una disminución. Adicionalmente, dentro de cada tipo de perfil se observó un comportamiento heterogéneo en la formación de biopelículas; es decir, el incremento o decremento del IFB no ocurrió al mismo tiempo entre cada una de las especies y cepas de *Vibrio*.

Debido a las diferencias encontradas en los datos obtenidos, se propuso un nuevo criterio de clasificación que incluyó los cambios anteriormente descritos en el IFB a las 72 h de incubación. El nuevo criterio cuantitativo de clasificación considera: 1) La dinámica del IFB: sin formación, incremento continuo, e incremento seguido de decremento; 2) Tiempo de máximo IFB: temprano (24 h) y tardío (48 o 72 h); 3) Grado de formación de biopelícula en el tiempo de máximo IFB: nulo, débil, moderado y fuerte (Han *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la heterogeneidad que se observó en la formación de biopelículas puede deberse principalmente a la variabilidad entre cepas (Whiting & Golden, 2002; Mizan *et al.*, 2015; Beshiru *et al.*, 2018).

El tiempo para completar el ciclo de formación de biopelículas (desde la etapa de adhesión hasta la dispersión) es un factor importante que determina la dinámica del IFB en condiciones del ensayo en microplaca. En este estudio algunas cepas mostraron perfil de incremento continuo del IFB, el cual no tiene una etapa de dispersión significativa antes de las 72 h, pero pudiera ocurrir posteriormente. En contraste, también se observaron cepas con el perfil de

incremento de IFB seguido de un decremento, el cual significaría la terminación del ciclo de formación de biopelícula dentro del periodo en estudio (Figura 7).

Cabe destacar que desde el punto de vista de inocuidad microbiana, que una biopelícula pueda tener una dispersión (llámese parte de su ciclo) significaría la posibilidad de que los microorganismos por si mismos puedan abandonar la biopelícula y contaminar otros sitios formando otra biopelícula, significando la creación de otra fuente de contaminación. No así una biopelícula que no llega a esta dispersión natural, lo cual indicaría que en este periodo (72 h) la única manera de dispersión que tendría sería por efecto mecánico de remoción, lo cual no lo hace parte natural del ciclo.

Además del criterio cuantitativo de clasificación propuesto, también se asignó un nivel de riesgo asociado a cada una de las dinámicas de IFB, que se calculó a partir de la suma de valores numéricos establecidos para cada nivel de los factores incluidos en la construcción del criterio. La ponderación incluyó: a) La dinámica de IFB: sin formación (0), incremento continuo (1), e incremento seguido de decremento incluyendo el grado de IFB final: nulo (5), débil (4) y moderado (3); b) El tiempo de máximo IFB: temprano (2) y tardío (1); c) El grado de formación de biopelícula en el tiempo de máximo IFB: nulo (0), débil (1), moderado (2) y fuerte (3). El nivel de riesgo asignado fue un valor entre 0 y 10, resultando una correlación directa entre el incremento del valor y el nivel de riesgo.

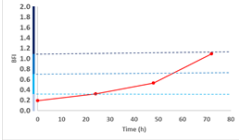
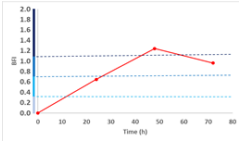
Perfil de IFB	Tiempo de máximo IFB – Grado de formación de biopelícula	IFB			Nivel de riesgo
		24 h	48 h	72 h	
Nulo					0
Incremento de la formación  Incremento en la formación seguido por decremento 	Tardío-Débil				3
	Temprano-Débil				4
	Tardío-Moderado				4
	Temprano-Moderado				5
	Tardío-Fuerte				5
	Temprano-Fuerte				6
	Tardío-Débil				7
	Tardío-Moderado				7
	Tardío-Fuerte				7
	Temprano-Débil				8
	Tardío-Moderado				8
	Temprano-Moderado				8
	Tardío-Fuerte				8
	Temprano-Fuerte				8
	Temprano-Moderado				9
	Tardío-Fuerte				9
	Temprano-Fuerte				9
	Temprano-Fuerte				10

Figura 7. Criterio de clasificación cuantitativa del IFB basado en la dinámica de IFB, el grado de IFB y su asociación con el nivel de riesgo desde la perspectiva de la inocuidad alimentaria.

### 7.2.3 Reclasificación de las cepas de *Vibrio* según el nuevo criterio de clasificación de IFB

Las 51 cepas se reclasificaron de acuerdo con el criterio cuantitativo de IFB propuesto en este trabajo. Dieciocho cepas (34.61%) no mostraron formación de biopelículas, 15 (28.98%) mostraron un incremento continuo de la formación de biopelículas y 18 (34.61%) un incremento seguido de un decremento en la formación de biopelículas.

*V. alginolyticus* y *V. cholerae* fueron las especies que mostraron mayor riqueza de perfiles de IFB, en comparación de *V. parahaemolyticus* y *V. mimicus*. La mayoría de las cepas de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. mimicus* mostraron perfiles con incremento en la formación de biopelículas, mientras que *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*, mostraron perfiles de incremento seguido por un decremento en la formación de biopelículas (Tabla 6).



Tabla 6. IFB propuesto para especies de *Vibrio* aisladas de alimentos de origen marino y superficies inertes.

		Especies <sup>1</sup>					Número de cepas por perfil (n/total cepas)
		VA	VV	VC	VP	VM	
Nulo (35.29%)		10	4	1	3	0	18/51
Incremento (33.30%)	Temprano-Fuerte	0	0	0	0	0	0/51
	Tardío-Fuerte	1	0	1	1	0	3/51
	Temprano-Moderado	0	0	0	0	0	0/51
	Tardío-moderado	1	0	1	1	1	4/51
	Temprano-Débil	1	0	1	0	0	2/51
	Tardío-Débil	3	2	2	1	0	8/51
Incremento seguido por decremento (31.37%)	Temprano-Débil	4	0	0	0	0	4/51
	Tardío-Débil	1	0	0	0	0	1/51
	Temprano-Moderado	1	1	1	0	0	3/51
	Tardío-Moderado	1	0	0	0	0	1/51
	Temprano-Fuerte	2	2	0	0	0	4/51
	Tardío-Fuerte	0	3	0	0	0	3/51

<sup>1</sup>VA: *V. alginolyticus*; VV: *V. vulnificus*; VC: *V. cholerae*; VP: *V. parahaemolyticus*; VM: *V. mimicus*.

La reclasificación de las cepas con el criterio cuantitativo de clasificación de IFB propuesto, demostró la diversidad que existe en las dinámicas de formación de biopelículas entre las cepas aisladas de *Vibrio*, en comparación de la clasificación anterior que sólo incluye cuatro niveles formación de biopelículas a las 72 h.

Con base en el nivel de riesgo establecido para cada perfil de IFB, las cepas con mayor riesgo son las que fueron aisladas de ostiones (5), almejas (3), y camarones (2).

La riqueza y variabilidad de perfiles de IFB entre especies puede ser atribuido al ambiente nativo (fuente de aislamiento) en donde las cepas pueden estar en continuo contacto con factores estresantes como se mencionó anteriormente; esta exposición pudiera propiciar un aumento en la capacidad de formación de biopelículas y por lo tanto, en un ambiente de procesamiento de alimentos aumentar la posibilidad de contaminación cruzada, la cual representa un riesgo elevado en este contexto.

Las cepas con perfil de no formación de biopelículas (según el criterio de Han *et al.*, 2016) representan un 56.85% y al reclasificarlas con el nuevo criterio cuantitativo propuesto, el porcentaje disminuyó a un 34.61%, evidenciando que el 22.25% si tienen la capacidad de formar biopelículas, pero su dispersión fue previa a las 72 h, lo cual subestima la capacidad de formación de biopelículas y el riesgo asociado a esta característica.

La mayoría de las cepas mostraron un perfil en la formación de biopelículas de incremento seguido de decremento; este decremento se asocia a la dispersión de la biopelícula. La dispersión de biopelículas de *V. parahaemolyticus* puede ocurrir después de las 24 h como lo describe Tan *et al.* (2018), o posterior a 48 h como se describe en este trabajo, representando un escenario más riesgoso en comparación con el incremento continuo de la formación de biopelícula.

Aunado a la dispersión, también se tiene que considerar cual es el nivel de IFB final de la biopelícula restante (nulo, débil, moderado), ya que esta situación también modifica el riesgo; es decir, un menor grado de IFB remanente implica mayor dispersión de la biopelícula y por tanto mayor riesgo.

### **7.3 Efecto del ácido cítrico en el estado fisiológico de *V. alginolyticus* y *V. cholerae***

En los establecimientos de venta de pescados y mariscos, el uso de jugo de limón para marinar los alimentos es una práctica frecuente; en consecuencia, las células de *Vibrio* spp. pueden estar en contacto con este ingrediente que puede generar una alteración en sus funciones. En esta serie de experimentos se

evaluó el nivel de daño en células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* causado por la exposición a ácido cítrico. El daño se midió mediante la cuantificación de la población estresada en diferentes medios de cultivo, la medición del daño a la estructura y función celular con citometría de flujo y la estimación de parámetros cinéticos como tiempo de detección y velocidad máxima de desarrollo posterior a la exposición al ácido.

### **7.3.1 Cuantificación de la población estresada en medios de cultivo**

La cuantificación de la población viable empleando medios de cultivo generales y selectivos tiene por objeto evidenciar las poblaciones estresadas como resultado de la exposición a un tratamiento que puede generar daño a las células.

En este estudio se evaluó el efecto del medio de cultivo, fase de cultivo, pH, y tiempo de exposición en la viabilidad de las células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* después de la exposición a ácido cítrico. Se empleó el agar selectivo TCBS en el cual desarrollaron las células sin daño aparente, es decir, aquellas células que pudieron contrarrestar el efecto de la presencia de los inhibidores del medio que lo hacen selectivo, por el contrario, las células con daño no son capaces de desarrollar; el agar ASTNG para incrementar la osmolaridad y generar un ambiente estresante (similar a TCBS); el agar ASTN como medio general en el cual desarrolló toda la población (células con y sin daño); y el agar ASTP para promover la recuperación de todas las células viables, incluyendo la población estresada.

Las cepas de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) se expusieron a ácido cítrico a diferentes niveles de pH (4.5, 5.0, 5.5 y 7.0) por 180 min, empleando cultivos en dos fases de desarrollo (logarítmica y estacionaria). Los resultados de las poblaciones bacterianas se muestran en el Anexo III. El análisis de varianza mostró que los factores cepa, pH y tiempo de exposición, así como sus interacciones, tuvieron un efecto significativo en la respuesta ( $p < 0.05$ ) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza de las poblaciones de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* sobrevivientes a la exposición a ácido cítrico.

Factor	Valor p
Cepa	<0.0001*
pH	<0.0001*
Tiempo de exposición	<0.0001*
Medio de cultivo	0.0807
Fase de cultivo	0.3081
Medio de cultivo*Fase de cultivo	0.4100
Tiempo de exposición*Fase de cultivo	0.4229
pH*Fase de cultivo	0.4200
Cepa*Fase de cultivo	0.4087
Tiempo de exposición*Medio de cultivo	0.6470
Tiempo de exposición*Medio de cultivo	0.5641
Cepa*Medio de cultivo	0.2664
Tiempo de exposición*pH	0.0127*
Cepa*Tiempo de exposición	<0.0001*
Cepa*pH	0.0491*

En relación al tipo de medio de cultivo se observó que independientemente de la cepa, la población recuperada después del estrés con ácido cítrico fue  $5.20 \pm 0.78$ ,  $5.24 \pm 0.72$ ,  $5.20 \pm 0.72$  y  $5.16 \pm 0.71$  Log UFC/mL en ASTN, ASTP, ASTG y TCBS, respectivamente (Figura 8a). Debido a que el desarrollo de los microorganismos en los medios de cultivo selectivos (TCBS y ASTNG) fue similar al observado en los medios generales (ASTN y ASTNP), no fue posible estimar la población estresada. Los resultados sugieren que no existe un daño severo, ya que los microorganismos pueden desarrollar de manera adecuada en los medios de cultivo selectivos.

La fase de cultivo tampoco resultó ser un factor que influyó en la cantidad de células estresadas ( $p > 0.5$ ) (Figura 8b), lo cual sugiere que en ambos estados fisiológicos en las células no existe un daño severo por la exposición al medio acidificado con ácido cítrico, y por tanto logran desarrollar en los medios de cultivo selectivos. Chiang *et al.* (2012), describieron que células de *V. parahaemolyticus* en fase logarítmica fueron más susceptibles a la exposición de ácido cítrico que células en fase estacionaria, que posteriormente desarrollaron una tolerancia a la exposición ácida. En contraste Kundukad *et al.* (2020), describieron que células de *Pseudomonas aeruginosa* en fase logarítmica y estacionaria expuestas a ácido cítrico (pH 3.7) permanecieron viables por 3 h; concluyeron que, si las células en fase logarítmica resisten de igual manera las condiciones estresantes que las células en fase estacionaria, las primeras resultan ser metabólicamente más activas y desarrollar una rápida tolerancia a las condiciones ácidas.

El factor tipo de cepa tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la población; las cepas de *V. cholerae* fueron más sensibles que las de *V. alginolyticus* (Figura 8c). La diferencia y variabilidad de la respuesta fisiológica entre cepas a diferentes estímulos incluyendo la tolerancia al ácido ya se ha descrito previamente en cepas de *Vibrio* (Whiting & Golden, 2002; Johnson *et al.*, 2012; Obaidat *et al.*, 2017), siendo principalmente asociado el origen de las cepas.

En cuanto al pH, la población recuperada fue menor a pH 4.5 en comparación con el pH 5.0 y 5.5 ( $p < 0.05$ ) (Figura 8d). Es decir, el efecto de la exposición a ácido cítrico es mayor a medida que el pH disminuye. Alvarez *et al.* (2003), describieron que la viabilidad de *V. cholerae* puede disminuir por debajo de pH 5.5. Se ha descrito que la viabilidad de las bacterias cuando son expuestas a ácido cítrico disminuye a medida que se acercan al valor del pKa 2 (pH 4.76) (Kundukad *et al.*, 2020). Respuestas similares se han descrito para otras especies de *Vibrio*, como *V. vulnificus* (Bang *et al.*, 2005) y *V. parahaemolyticus* (Chinag *et al.*, 2012) expuestas a pH 4.0 y 4.5, respectivamente.

El tiempo de exposición al ácido cítrico tuvo afectó en la viabilidad de las células de *Vibrio* ( $p < 0.5$ ). Independientemente del pH y la cepa, a los 180 min, se obtuvo una reducción en las poblaciones de aproximadamente 0.5 Log UFC/mL (Figura 8e), lo que sugiere que el daño es mayor a medida que el tiempo de exposición aumenta. Resultados similares fueron descritos por Bang *et al.* (2005) cuando

expusieron células de *V. vulnificus* a ácido cítrico (pH 5.5) por 10 h, y por Chiang *et al.* (2012) al exponer células de *V. parahaemolyticus* a ácido clorhídrico (pH 6.0) por 6 h, obteniendo reducciones en las poblaciones bacterianas de 1 y 0.5 Log UFC/mL, respectivamente.

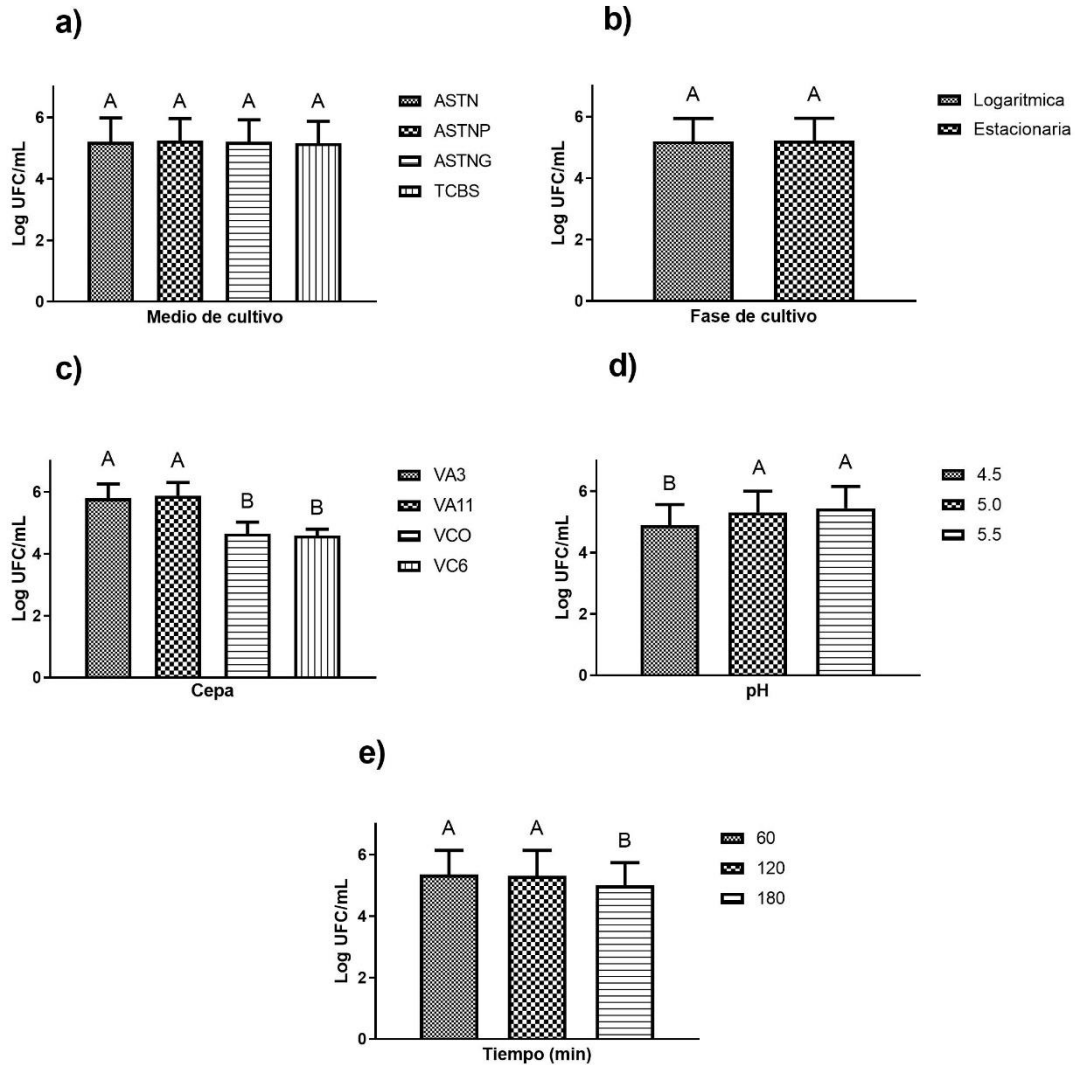


Figura 1. Comparación de medias de Tukey del ensayo de recuperación de la población de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) en medios de cultivo después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). a) Población cuantificada en los diferentes medios de cultivo; b) Población cuantificada según la fase el cultivo; c) Población cuantificada según el tipo de cepa; d) Población cuantificada según el pH al que fue expuesto; e) Población cuantificada según el tiempo de exposición.

Yousef & Juneja (2003), describieron el estrés celular como una condición que afecta la sobrevivencia o la tasa de desarrollo de un microorganismo. De acuerdo con esta definición es posible concluir que las cuatro cepas probadas sufrieron un estrés ligero, ya que no existió una reducción significativa de la viabilidad después de la exposición al ácido cítrico.

### 7.3.2 Respuesta fisiológica y citológica

La citometría de flujo es una técnica rápida y sensible que permite cuantificar los efectos de diversos factores estresantes sobre la fisiología y citología de las células, proporcionando información rápida sobre la heterogeneidad de la respuesta en las bacterias (Ambriz-Aviña *et al.*, 2014).

Uno de los principales daños causados por la exposición a pH ácido es el daño directo a la membrana celular que evidentemente afecta la estabilidad fisiológica bacteriana, y puede ser letal (Stratford *et al.*, 2013). Con la finalidad de cuantificar el daño celular ocasionado a las cepas *V. alginolyticus* y *V. cholerae* expuestas a pH ácido durante 180 minutos, se realizó una tinción con yoduro de propidio, que es una molécula pequeña que puede unirse al ADN pero no difundir pasivamente a través de una membrana íntegra; es decir, la difusión ocurre cuando la membrana está dañada (Crowly *et al.*, 2016). Otro parámetro que es posible evaluar mediante esta técnica es la activación de las bombas de flujo como mecanismo de reparación celular. Para ello se realizó una tinción con bromuro de etidio, colorante que emite una fluorescencia significativa cuando se acumula en el espacio periplásmico de las bacterias y cuando se intercala en el ADN bacteriano; la interacción es irreversible y el sistema de bombas de flujo no puede expulsar el colorante fuera de la bacteria (Rodrigues *et al.*, 2011). Es decir, un mayor porcentaje de tinción refleja una menor actividad de flujo, y por lo tanto menor reparación del daño.

La exposición de las cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* a ácido cítrico por 180 min mostró resultados heterogéneos. Se observó que el daño a la membrana fue diferente dependiendo de la fase de cultivo ( $p < 0.05$ ): las células en fase estacionaria fueron más afectadas (69.66-99.03%) que las células en fase logarítmica (4.14-31.40%) (Figura 9; Anexo IV). Las dos cepas de *V. alginolyticus* mostraron menor población de células con daño en la membrana que las cepas

de *V. cholerae* ( $p < 0.05$ ), la única excepción fue *V. alginolyticus* VA11 expuesta a pH 5.0 por 180 min, condición en la que se observó un porcentaje elevado de daño. El nivel de pH no influyó en el daño a membrana ( $p > 0.05$ ).

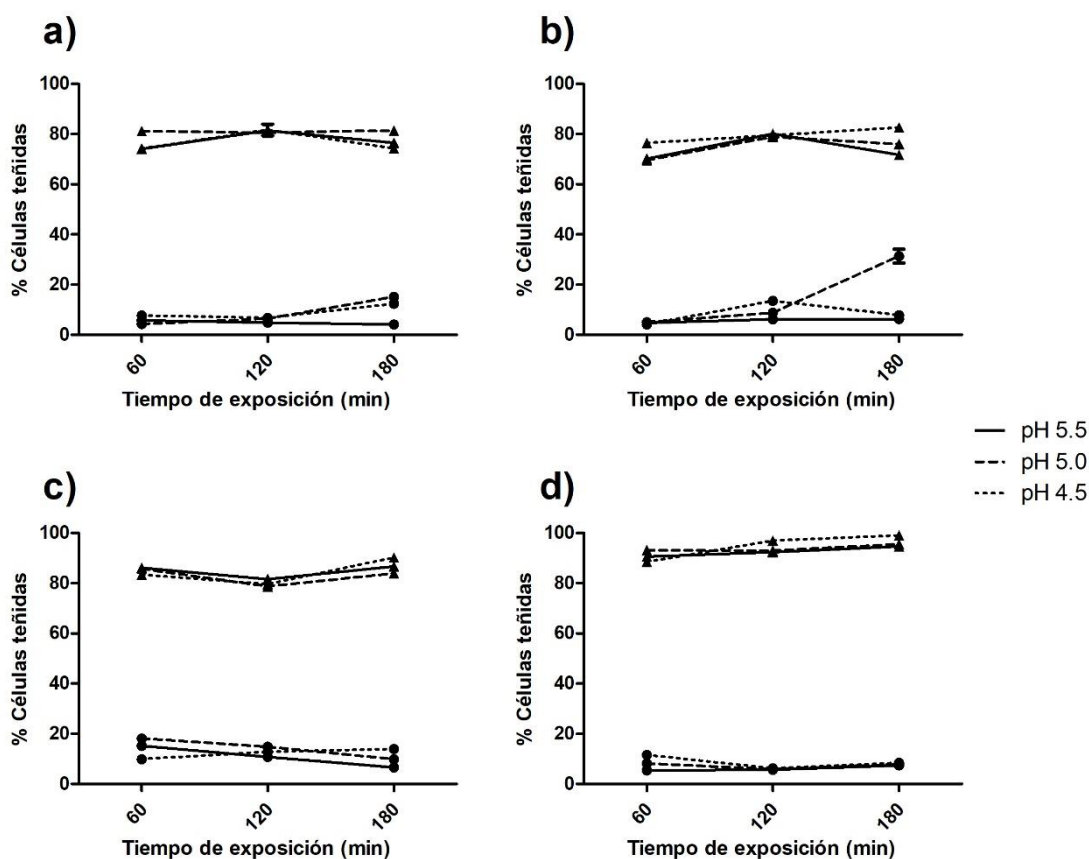


Figura 9. Porcentaje de células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en fase logarítmica y estacionaria después de la exposición a ácido cítrico por 180 min teñidas con yoduro de propidio. a) *V. alginolyticus* VA3; b) *V. alginolyticus* VA11; c) *V. cholerae* VCO; d) *V. cholerae* VC6. Líneas continuas: pH 5.5; líneas discontinuas: pH 5.0; líneas punteadas: pH 4.5. Células en fase logarítmica (●); Células en fase estacionaria (▲). Los datos representan la medición de 20 000 células en cada una de las dos replicas  $\pm$  la desviación estándar.

La actividad de las bombas de flujo en las células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* expuestas a ácido cítrico también fue heterogénea. Independientemente de la cepa, las células en fase logarítmica mostraron más actividad de las bombas de flujo que las células en fase estacionaria ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de células



teñidas osciló entre 6.19 y 37.51 % y entre 68.20 y 99.11% en las células en fase logarítmica y estacionaria, respectivamente (Figura 10; Anexo V).

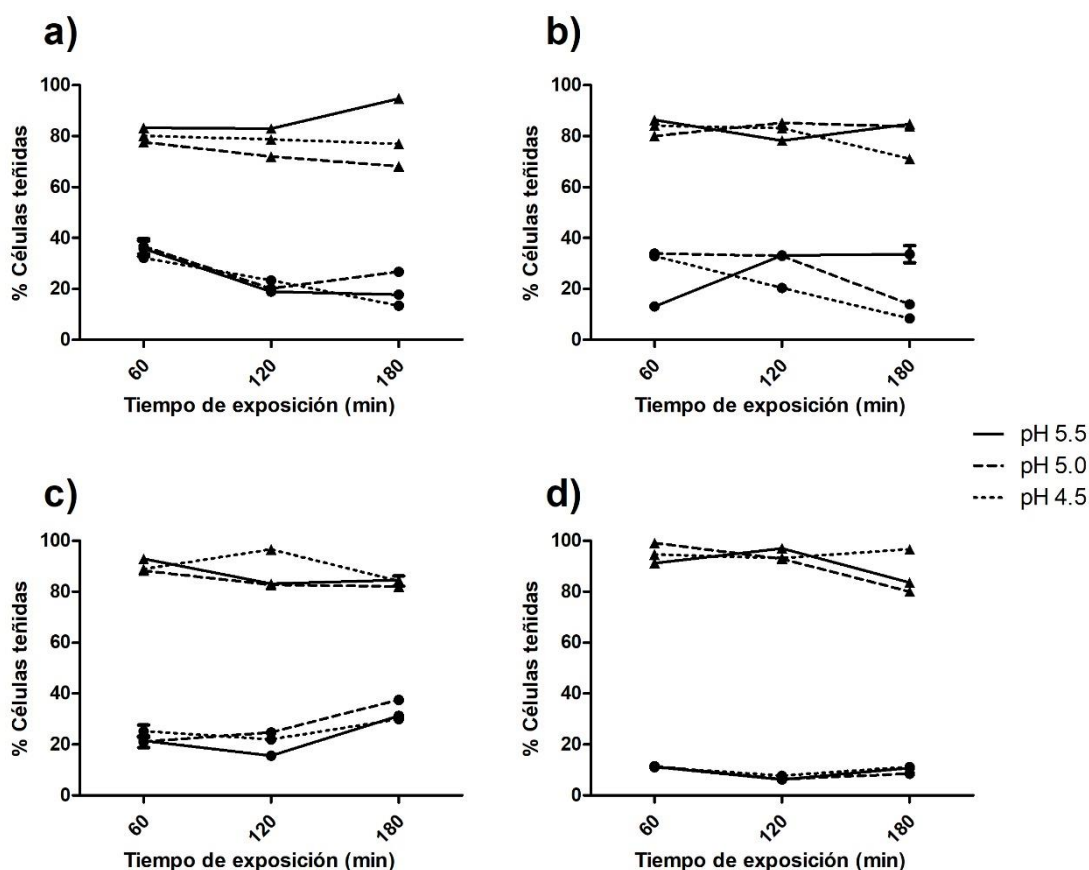


Figura 10. Porcentaje de células teñidas con bromuro de etidio de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en fase logarítmica y estacionaria después de la exposición a ácido cítrico por 180 min. a) *V. alginolyticus* VA3; b) *V. alginolyticus* VA11; c) *V. cholerae* VCO; d) *V. cholerae* VC6. Líneas continuas: pH 5.5; líneas discontinuas: pH 5.0; líneas punteadas: pH 4.5. Células en fase logarítmica (●); Células en fase estacionaria (▲). Los datos representan la medición de 20 000 células en cada una de las dos replicas  $\pm$  la desviación estándar.

El estado fisiológico de las células microbianas que son expuestas a condiciones estresantes es un factor significativo que afecta su respuesta ante nuevos retos (Ambriz-Aviña *et al.*, 2014). Ryall *et al.* (2012) describieron que los

microorganismos en fase estacionaria inducen más fácilmente la expresión de la respuesta general en contra del estrés (niveles elevados de *rpoS*, sistemas de mantenimiento celular, altos cambios en el metabolismo, etc.) en comparación con las células en fase logarítmica. Los resultados de este estudio muestran que las células de *Vibrio* en fase estacionaria expresan mayor daño a la membrana que las células en fase logarítmica, lo cual puede estar asociado a que se encuentran en una etapa en la cual el desarrollo no es una función vital, al contrario, es una etapa en la que mantener activados mecanismos que minimicen el estrés es la función prioritaria. Los ensayos de citometría de flujo demostraron que el ácido cítrico no causa un daño severo a la membrana, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante cultivo que demostraron que la viabilidad de las células no se afectó significativamente (Anexo III).

Integrando las respuestas fisiológicas y citológicas de las cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* expuestas a ácido cítrico a diferentes niveles de pH por 180 min, confirma que las células sufrieron un estrés ligero. Según lo descrito por Yousef & Juneja (2003), el estrés ligero se define como una condición subletal en la cual la viabilidad no es afectada sin embargo reduce o arresta la velocidad de desarrollo.

Silva *et al.* (2011), estudiaron el efecto antimicrobiano de aceites esenciales sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Escherichia coli* ATCC 25922, encontrando altos porcentajes de células teñidas con yoduro de propidio (77.62 a 100 %) y con bromuro de etidio (73.54 a 99.56 %); sin embargo, no recuperaron células viables en los cultivos en placa. La diferencia entre la viabilidad celular en ambos estudios sugiere que la habilidad de recuperación de las células bacterianas es heterogénea y depende del tipo, concentración y mecanismo de acción del agente estresante.

La actividad de las bombas de flujo generalmente se ha estudiado como mecanismo de resistencia a antibióticos (Markham & Neyfakh, 2001). Sin embargo, la expulsión de elementos dañinos (en este caso protones resultantes de la disociación de los ácidos) de la matriz intracelular al espacio extracelular es un mecanismo común para contrarrestar condiciones estresantes, incluyendo bajo pH mismo que incrementa la actividad de las bombas de flujo en las células bacterianas (Nove *et al.*, 2020).

Sousa-Guedes *et al.* (2018), describieron que la acumulación de ácidos disociados en la célula causa una despolarización de la membrana, el incremento de la permeabilidad y el descenso del pH intracelular. Los resultados en el presente estudio sugieren que las bombas de flujo en las cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* después de la exposición a ácido cítrico son funcionales y permiten la recuperación celular y futura adaptación a las condiciones estresantes. Sin embargo, a pesar de la activación de este mecanismo no se pudo evitar el daño a la membrana celular. Lo anterior sugiere que las bacterias activan otros mecanismos de reparación para permitir la recuperación y adaptación a condiciones estresantes.

Previamente se reportó que cepas aisladas del ambiente pueden expresar una respuesta adaptativa al estrés que favorece su sobrevivencia a condiciones ambientales estresantes incluyendo la exposición a ácidos (Huang *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2019). En alimentos acidificados los microorganismos pueden naturalmente adaptarse a estos ambientes. Por ejemplo, el jugo de limón que es añadido a los alimentos de origen marino podría provocar que los microorganismos expresen mecanismos reparadores para sobrevivir. Esta respuesta es conocida como respuesta a la tolerancia a ácidos, la cual se expresa principalmente en células en fase estacionaria, debido a que la célula se encuentra regulando otras respuestas frente a otros tipos de estrés (Chiang *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2014; Trček *et al.*, 2015).

Algunos mecanismos de reparación en condiciones ácidas ya han sido descritos para *Vibrio* spp. (Swenson *et al.*, 2012) que incluyen: 1) el sistema de descarboxilación de aminoácidos, como las enzimas lisina descarboxilasa y el transportador lisina-cadaverina situado en la membrana citoplasmática los cuales se sobre expresan cuando las células son expuestas a ácidos orgánicos (Ante *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2021); 2) las bombas de flujo de protones, que juegan un rol importante en la homeostasis del pH y que incluyen transportadores tipo Vc-NhaP para mantener la viabilidad de células de *V. cholerae* en condiciones ácidas, sobre todo cuando el ambiente también es rico en potasio (Sabatini *et al.*, 2017; Mourin *et al.*, 2019); 3) la expresión de algunas proteínas de membrana como OmpU, que es una porina de membrana externa que se expresa a bajo pH, bajos o altos niveles de temperatura y baja osmolaridad (Merrell *et al.*, 2001; Swenson *et al.*, 2012).

La utilización de las tinciones con yoduro de potasio y bromuro de etidio para la medición con citometría de flujo, evidenciaron que el daño celular provocado por la exposición al tratamiento con ácido cítrico no es significativo, y la funcionalidad y la viabilidad de las células no se ve afectada.

### 7.3.3 Recuperación de células estresadas: tiempo de detección y velocidad de desarrollo

La recuperación celular es un parámetro que al ser evaluado puede dar un indicio del grado de estrés que una célula bacteriana sufrió después de la exposición a un agente estresante. Si una célula estresada es transferida a condiciones óptimas esta tendrá la posibilidad de recuperarse si el daño es reversible y por lo tanto la viabilidad y tasa de desarrollo no se verá afectada (Yousef & Juneja, 2003). En este trabajo se utilizó la medición espectrofotométrica para confirmar la capacidad de desarrollo de las células después de la exposición a las condiciones estresantes. Se midió el tiempo en el cual el desarrollo de las células en condiciones óptimas fue suficiente para enturbiar el medio y ser detectado por el equipo (tiempo de detección).

La duración de la fase de recuperación, medida a través del tiempo de detección (DT), resultó ser una medida efectiva para evaluar el nivel de daño causado a las células por efecto de la exposición al ácido cítrico (Anexo VI). El análisis de varianza mostró que los cuatro factores evaluados y sus interacciones de primer orden fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza del efecto de los factores evaluados en el tiempo de detección de cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* estresadas con ácido cítrico.

Factor	Valor p
Cepa	<0.0001*
pH	<0.0001*
Tiempo de exposición	<0.0001*
Fase de cultivo	<0.0001*

Tiempo de exposición*Fase de cultivo	0.0123*
pH*Fase de cultivo	0.6074
Cepa*Fase de cultivo	<0.0001*
Tiempo de exposición*pH	<0.0001*
Cepa*Tiempo de exposición	<0.0001*
Cepa*pH	<0.0001*

---

En relación al factor cepa, el TD osciló entre 4.69 y 12.93 h, siendo VCO (el aislado clínico) aquella que tardó más tiempo en recuperarse y comenzar a crecer ( $8.45 \pm 1.67$  h), mientras que VA3 ( $6.95 \pm 1.12$  h) y VC6 ( $6.93 \pm 1.05$  h) fueron las más rápidas (Figura 11a). Las células en fase logarítmica mostraron un TD más corto ( $6.89 \pm 1.08$  h) que las células en fase estacionaria ( $7.75 \pm 1.34$  h) (Figura 11b). Ryall *et al.* (2012) describieron que las células en fase logarítmica están más enfocadas en la división celular y por lo tanto pueden ser más susceptibles al estrés, mientras que las células en fase estacionaria son metabólicamente menos activas, y por tanto los mecanismos de reparación del estrés trabajan mejor. Los hallazgos de este estudio muestran resultados opuestos, lo que sugiere que las células en fase logarítmica responden mejor a condiciones de estrés ácido.

Respecto al pH, los valores de TD incrementaron a medida que el pH disminuyó: a pH 4.5 el TD medio fue  $7.99 \pm 1.51$  h, mientras que a pH 5.5 fue de  $6.82 \pm 0.99$  h (Figura 11c). Sorpresivamente, las células que fueron expuestas a ácido cítrico por 60 min mostraron mayores valores de TD ( $7.92 \pm 0.7$  h) a diferencia de aquellas que fueron expuestas durante 180 min ( $6.68 \pm 1.46$  h) (Figura 11d). Esto sugiere que las células de *V. alginolyticus* y *V. cholera* a los 180 min de exposición pueden lograr una adaptación al ácido cítrico y reducir el tiempo en el que inician el desarrollo.

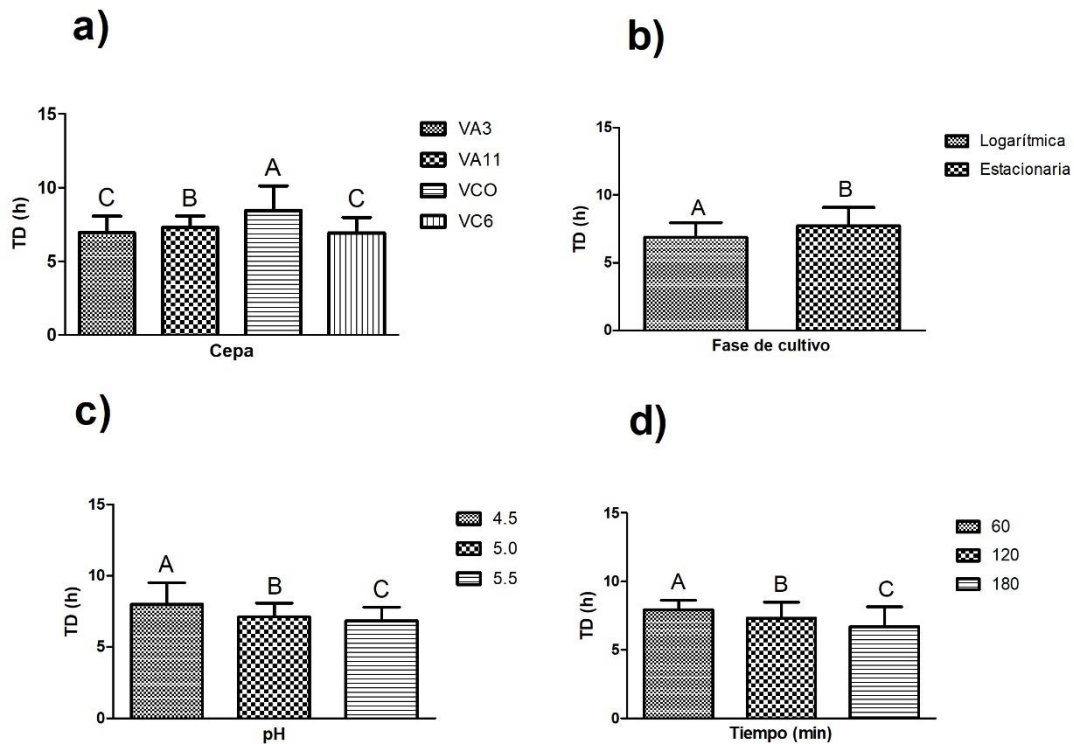


Figura 11. Comparación de medias de los ensayos de duración del tiempo de detección de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) en CSTN a 37 °C después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). a) Tiempo de detección según el tipo de cepa; b) Tiempo de detección según la fase el cultivo; c) Tiempo de detección según el pH al que fue expuesto; d) Tiempo de detección según el tiempo de exposición.

Los resultados de este trabajo se asemejan a lo reportado por Chiang *et al.* (2012) en un estudio en donde expusieron a células de *V. parahaemolyticus* a diferentes niveles de pH ajustados con HCl. Observaron que a medida que se extendía el tiempo de exposición se generaba menor daño en las células que se asociaba con una disminución en la pérdida de la viabilidad de las bacterias. Concluyeron que las funciones celulares no sufrieron daños severos y el desarrollo de las células ocurrió, lo cual se asoció con la expresión gradual de la respuesta de tolerancia a ácidos antes mencionada. Si el daño en las células bacterianas no es severo, la recuperación a un estado fisiológico óptimo ocurre fácilmente y la velocidad de desarrollo no se ve afectada (Yousef & Juneja, 2003; Weche *et al.*, 2009).

La velocidad de desarrollo fue diferente entre las cuatro cepas ( $p < 0.05$ ), siendo VC6 (0.8884 Log UFC/h) la cepa con la velocidad de desarrollo más rápida, seguida de VA11 (0.7799 Log UFC/h), VCO (0.7760 Log UFC/h) y VA3 (0.3081 Log UFC/h) (Figura 12a). La fase del cultivo no afectó significativamente la velocidad de desarrollo ( $p > 0.05$ ) (Figura 12b). El pH y el tiempo de exposición al ácido cítrico tuvieron un efecto significativo en la velocidad de desarrollo en las células de *Vibrio* ( $p < 0.05$ ), siendo más rápida la velocidad a medida que el pH es mayor (0.7761, 0.7114 y 0.5180 Log UFC/h a pH 5.5, 5.0 and 4.5, respectivamente) (Figura 12c) y a menor tiempo de exposición (0.7256, 0.7044 y 0.5756 Log UFC/h a 60, 120 y 180 min, respectivamente) (Figura 12d; Anexo VII).

El efecto negativo observado después de la exposición a ácido y expresado como una disminución en la velocidad de desarrollo, sugiere daño a las funciones fisiológicas y metabólicas. Anteriormente se mencionó que las células que son sometidas a un estrés priorizan el gasto energético manteniendo sus actividades metabólicas esenciales sobre la actividad de reparación, por lo que es de esperarse que la velocidad de desarrollo se vea disminuida entre los tratamientos, es decir, la célula puede tener un grado de daño que no le permite recuperarse óptimamente a pesar de que estén activos los mecanismos de reparación.

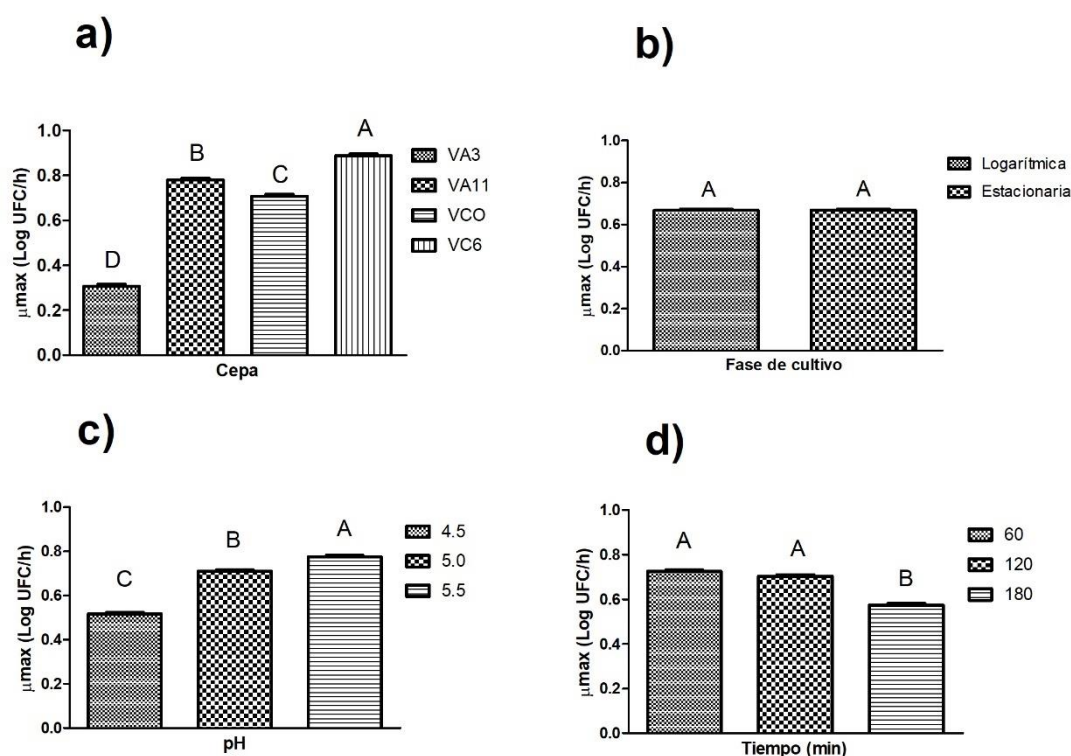


Figura 12. Comparación de medias de la velocidad de desarrollo de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) y *V. cholerae* (VCO y VC6) en CSTN a 37 °C después de la exposición a ácido cítrico durante 180 min. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). a) Velocidad de desarrollo según el tipo de cepa; b) Velocidad de desarrollo según la fase del cultivo; c) Velocidad de desarrollo según el pH al que fue expuesto; d) Velocidad de desarrollo según el tiempo de exposición.

La medición de la velocidad de desarrollo de las células expuestas a un agente estresante aporta información sobre la severidad del daño al estado fisiológico de la célula. La velocidad de desarrollo de la célula se define como la velocidad a la cual la célula se reproduce, y que requiere un estado energético y fisiológico óptimo; por lo tanto, cualquier cambio fisiológico puede verse reflejado en la velocidad de desarrollo de la célula. En ocasiones después de la exposición a agentes estresantes, la fase de adaptación (Lag) se ve afectada, sin embargo, no necesariamente la velocidad de desarrollo (Nguyen *et al.*, 2021).

Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre la velocidad de desarrollo y el TD de *V. alginolyticus* (Figura 13a y Figura 13b) y *V. cholerae* (Figura 13c y Figura 13d). Independientemente de la fase de cultivo, pH y tiempo de exposición



*V. alginolyticus* ( $r= 0.0138$ ) y *V. cholerae* ( $r= 0.0013$ ) no mostraron una correlación lineal entre los parámetros, lo que sugiere que ambos parámetros cinéticos fueron afectados de manera similar por los factores evaluados. Todas las células de *Vibrio* tuvieron la posibilidad de desarrollar en todas las condiciones, lo que reafirma que el daño celular causado por el ácido cítrico no es lo suficientemente severo para detener el desarrollo.

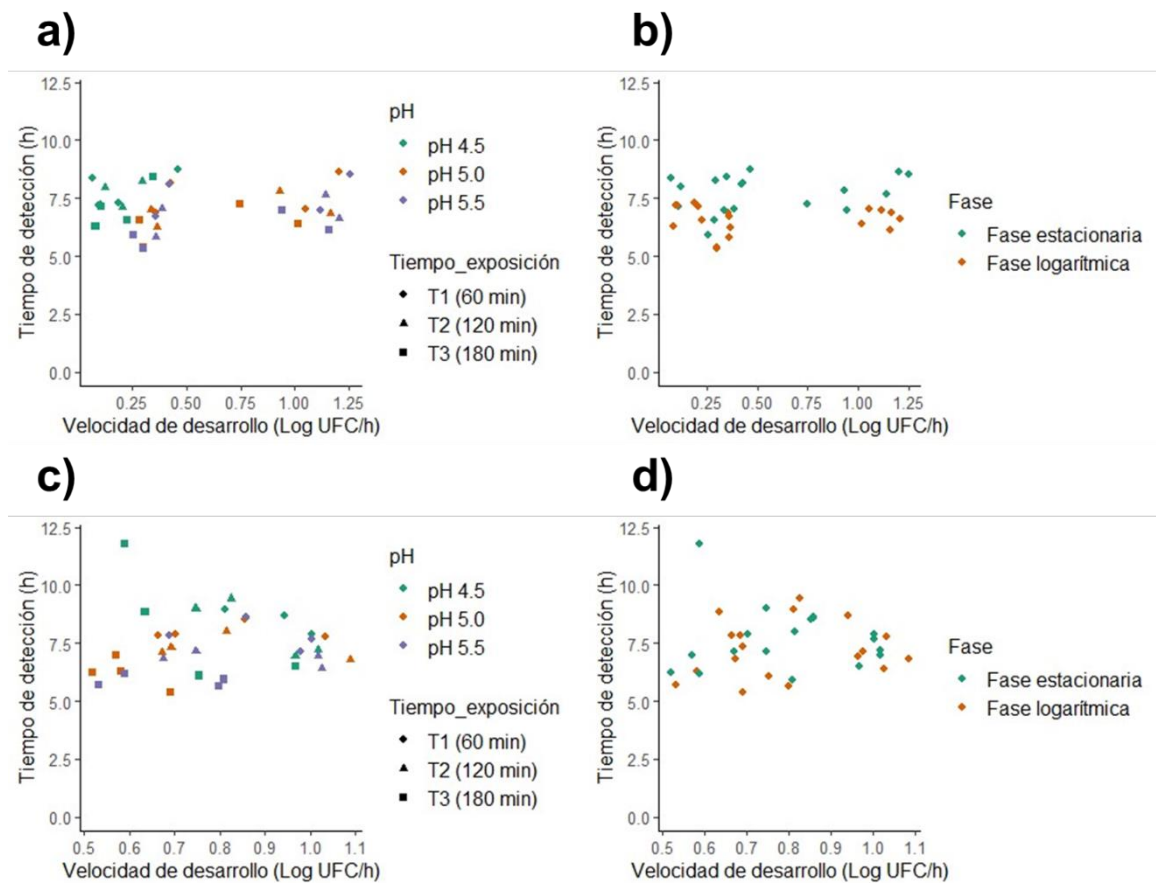


Figura 13. Correlación entre velocidad de desarrollo y TD de *V. alginolyticus* (a, b), y *V. cholerae* (c, d) expuestos a ácido cítrico por 180 min en dos diferentes fases de cultivo.

#### **7.4 Capacidad de formación de biopelículas por células de *Vibrio* spp. expuestas a ácido cítrico.**

En esta etapa se usaron dos cepas de cada especie con diferente IFB. Las cepas de *V. alginolyticus* con perfiles de incremento en la formación débil tardía (VA3) y formación con decremento fuerte temprana (VA11); mientras que las cepas de *V. cholerae* mostraron perfiles de incremento en la formación fuerte tardía (VCO) y formación con decremento moderado temprana (VC6). La capacidad de formación de biopelículas de células de *Vibrio* estresadas (expuestas a ácido cítrico) o no estresadas, se evaluó usando dos modelos experimentales. El primer modelo fue en microplaca en cual se evaluaron tres escenarios: a) capacidad de células estresadas para formar biopelículas en caldo de cultivo en condiciones óptimas; b) capacidad de células no estresadas para formar biopelículas en caldo de cultivo acidificado; c) capacidad de células estresadas para formar biopelículas en caldo de cultivo acidificado. El segundo modelo consistió en llevar a cabo la evaluación sobre superficies inertes (plástico y acero inoxidable) generando escenarios similares a los ambientes de producción y preparación de alimentos de origen marino.

##### **7.4.1 Formación de biopelículas en microplaca: células estresadas en caldo de cultivo en condiciones óptimas**

En el primer escenario evaluado, de manera general se describe que el estrés generado por la exposición al ácido cítrico no disminuyó la producción de biopelículas por las cepas de *V. alginolyticus* (Figura 14) y *V. cholerae* (Figura 15) en un medio de cultivo con un pH neutro. El rango de los valores de DO<sub>595</sub> para *V. alginolyticus* fue de 0.2292-1.532 y para *V. cholerae* de 0.1671-1.9104. El análisis de varianza mostró que la cepa, el tiempo de exposición al ácido cítrico y el tiempo de formación de las biopelículas tuvieron un efecto significativo en la formación de biopelículas (Tabla 12).

La DO de las cepas VA3 (0.2292-1.0261 DO<sub>595</sub>) y VC6 (0.1671-0.8163 DO<sub>595</sub>) se asoció con una menor cantidad de biopolímeros que los producidos por las cepas VA11 (0.2674-1.5328 DO<sub>595</sub>) y VCO (0.4102-1.9104 DO<sub>595</sub>). La diferencia observada era de esperarse, ya que acorde a los resultados, las cepas de

manera intrínseca tenían un perfil de IFB distinto; es decir, las cepas VA3 y VC6 mostraban un perfil de baja formación de biopelículas y VA11 y VCO lo contrario. En relación al tiempo de formación de biopelículas, las dos cepas de *V. alginolyticus* formaron biopolímeros a las 24 h y su concentración disminuyó a partir de 48 h de incubación (Figura 14). Por el contrario, las biopelículas formadas por las cepas de *V. cholerae* no mostraron decremento durante la incubación; la cepa VCO produjo polímeros de manera constante hasta las 72 h, mientras que la cepa VC6 produjo la máxima cantidad de polímeros a las 24 h que se mantuvo hasta las 72 h (Figura 15). Como se esperaba, una interacción significativa de primer orden entre el factor cepa y tiempo de formación de biopelículas (Figura 16 a), en donde se puede observar la influencia del perfil intrínseco de formación de biopelículas y su cambio con respecto del tiempo. El tiempo de exposición al ácido cítrico fue un factor significativo en la producción de biopelículas ( $p < 0.05$ ). En condiciones ácidas, a menor tiempo de exposición se produjo una mayor cantidad de biopelículas. A pesar de que el nivel de pH no influyó en la formación de biopelículas, es importante destacar el comportamiento de la cepa VC6, ya que esta cepa si mostró una disminución de la formación de biopelículas en medio óptimo (Figura 15c y Figura 15d). Adicionalmente, es importante destacar la interacción de primer orden significativa entre tiempo de exposición al ácido y fase de cultivo (Figura 16 b), en donde se observó que las células de a fase estacionaria producen más biopelícula a los 120 y 180 min de exposición, no así a los 60 min, que es el tiempo mínimo de exposición, mientras que lo opuesto se observó con las células de fase logarítmica. Lo anterior sugiere que las células en etapa estacionaria pueden tener una respuesta tardía a la adaptación al estrés, sin embargo, realizan la producción de biopelículas en mayor cantidad que las células de fase logarítmica.

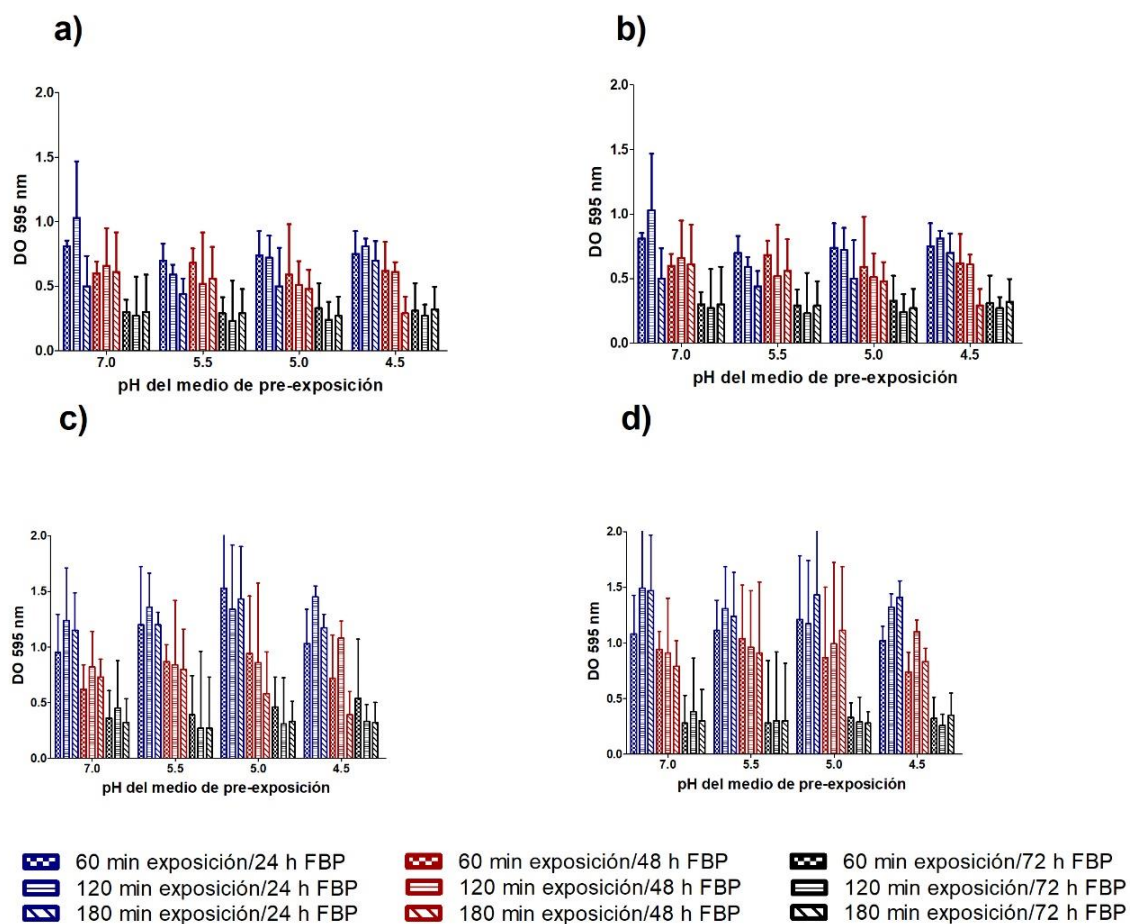


Figura 14. Formación de biopelículas en microplacas con caldo de cultivo en condiciones óptimas (CSTN, pH 7.0) por células estresadas de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) en dos fases de cultivo. a) VA3 en fase logarítmica; b) VA3 en fase estacionaria; c) VA11 en fase logarítmica; d) VA11 en fase estacionaria. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.

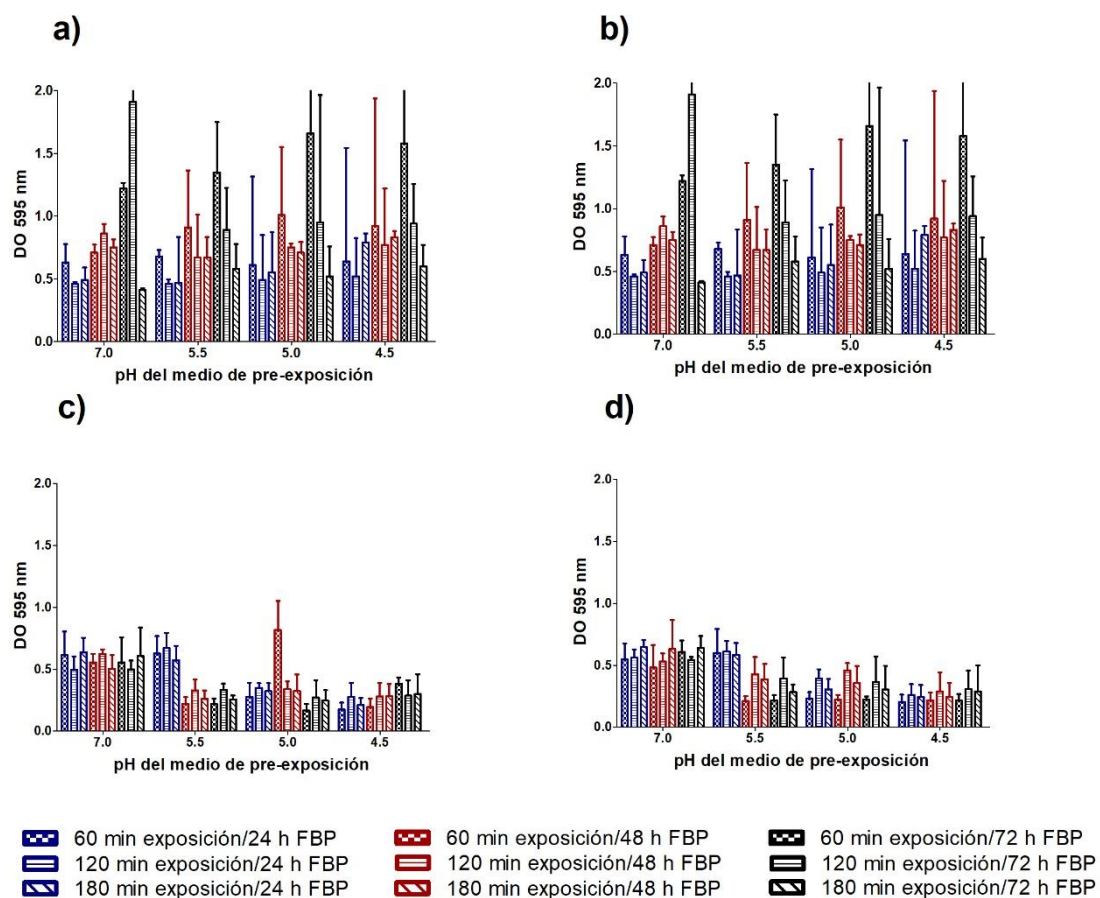


Figura 15. Formación de biopelículas en microplacas con caldo de cultivo en condiciones óptimas (CSTN, pH 7.0) por células estresadas de *V. cholerae* (VCO y VC6) en dos diferentes fases de cultivo. a) VCO en fase logarítmica; b) VCO en fase estacionaria; c) VC6 en fase logarítmica; d) VC6 en fase estacionaria. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.

Tabla 12. Análisis de varianza del efecto de los factores evaluados en la formación de biopelículas por cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* estresadas con ácido cítrico.

Factor	Valor <i>p</i>
Fase de cultivo	0.7213
Cepa	0.0060*
pH	0.2675
Tiempo de exposición	0.0370*
Tiempo de formación de biopelícula	< 0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula*Cepa	<0.0001*
pH*Cepa	0.2179
Tiempo de exposición*Cepa	0.8355
Fase de cultivo*Cepa	0.4992
pH*Tiempo de formación de biopelícula	0.7269
Tiempo de exposición*Tiempo de formación de biopelícula	0.4254
Fase de cultivo*Tiempo de formación de biopelícula	0.4611
Tiempo de exposición*pH	0.8818
Fase de cultivo*pH	0.9013
Fase de cultivo*Tiempo de exposición	0.0031*

Figura 16. Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. A) Factores cepa y tiempo de formación de biopelículas; B) Factores fase de cultivo y tiempo de exposición.

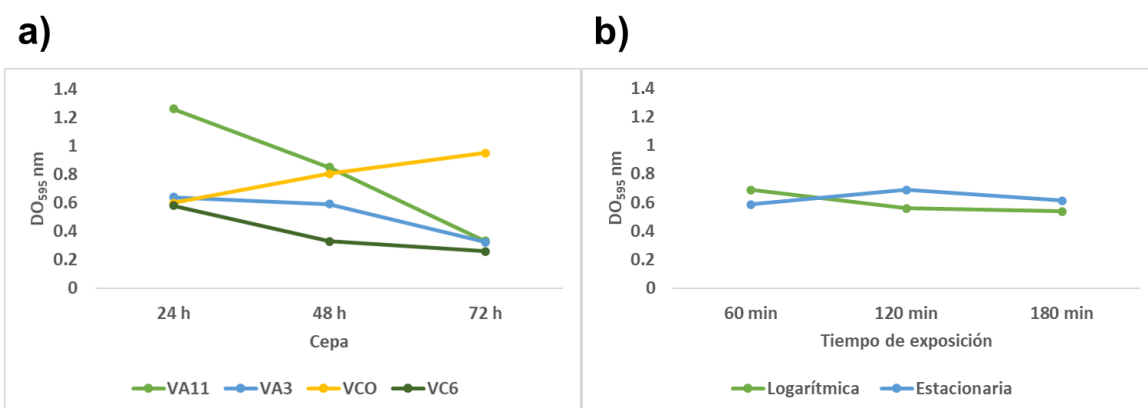


Figura 16. Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. A) Factores cepa y tiempo de formación de biopelículas; B) Factores fase de cultivo y tiempo de exposición.

El hecho de que la formación de biopelículas por células estresadas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en medio óptimo no se modificó en función de lo ocurrido en condiciones óptimas (sin exposición a pH ácido), sugiere que las bacterias recuperaron su estado fisiológico óptimo, lograron desarrollar y formar biopelículas.

El análisis estadístico de la tasa de formación de biopelículas, es decir, de la relación entre la biomasa del cultivo (medido en Log UFC) y los biopolímeros producidos, mostró que la cepa si influyó en la formación de biopelículas ( $p < 0.5$ ), resultado que era de esperarse ya que las cepas tienen de manera intrínseca capacidades diferentes para producir biopelículas (Tabla 13, Anexo VIII). La cepa VCO fue la que presentó las mayores tasas de formación de biopelículas.

Tabla 13. Tasa de formación de biopelícula de cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en CSTN a 37°C que fueron sometidas a tratamientos estresantes.

pH al que fueron pre expuestas las células	Tiempo de exposición (min)	Especies							
		<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>			
		VA3	VA11	VCO	VC6	VCO	VC6	VCO	VC6
		Fase de cultivo							
		L <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>	L	E	L	E	L	E
7.0	60	0.04	0.05	0.04	0.03	0.15	0.07	0.02	0.03
	120	0.03	0.03	0.05	0.04	0.22	0.14	0.03	0.04

	180	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04
5.5	60	0.04	0.05	0.05	0.03	0.17	0.09	0.02	0.02
	120	0.03	0.03	0.03	0.04	0.11	0.14	0.03	0.03
	180	0.04	0.04	0.03	0.04	0.07	0.10	0.03	0.03
5.0	60	0.04	0.07	0.06	0.04	0.20	0.08	0.02	0.03
	120	0.03	0.03	0.04	0.04	0.12	0.17	0.03	0.04
	180	0.03	0.04	0.04	0.03	0.06	0.09	0.04	0.03
4.5	60	0.04	0.06	0.07	0.04	0.19	0.08	0.05	0.03
	120	0.03	0.03	0.04	0.03	0.12	0.13	0.03	0.04
	180	0.04	0.05	0.04	0.04	0.07	0.11	0.04	0.04

---

<sup>1</sup>L: logarítmica; <sup>2</sup>E: estacionaria.

Los resultados obtenidos en esta etapa experimental son útiles para explicar un efecto a corto plazo del agente estresante y su repercusión futura en el fenómeno de formación de biopelículas una vez que son desarrolladas en un ambiente óptimo; un ejemplo claro es lo que sucede en los establecimientos de venta de alimentos de origen marino, en donde la preparación de alimentos marinados con jugo de limón es muy frecuente, y posterior a ello el alimento puede tener contacto con utensilios, superficies y otros alimentos; una vez realizada la transferencia de microorganismos a este nuevo ambiente puede existir las condiciones para persistir y formar biopelículas.

Es de nuestro conocimiento, y basado en una búsqueda en la literatura, que la mayoría de los ensayos de formación de biopelículas en donde se busca probar el efecto de un agente estresante o antimicrobiano en la formación de biopelículas se realiza con la exposición constante a este agente durante el tiempo de formación de biopelículas.

#### **7.4.2 Formación de biopelículas en microplaca: células no estresadas en caldo de cultivo acidificado**



El segundo escenario del modelo en microplaca consistió en evaluar la capacidad de células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* no estresadas para formar biopelículas cuando se encuentran en un medio estresante, es decir, en caldo de cultivo acidificado con ácido cítrico. Los resultados mostraron que la capacidad de las cuatro cepas para producir biopelículas disminuyó drásticamente con respecto a las biopelículas que no fueron expuestas continuamente a el pH ácido (Figura 17 y 18). Con excepción de la fase de cultivo, el resto de los factores evaluados y sus interacciones tuvieron efecto en la cantidad de biopelículas que se formaron ( $p < 0.05$ ) (Tabla 14) (Figura 19).

A pH 5.5 las cuatro cepas desarrollaron discretamente y produjeron polímeros en pequeñas cantidades luego de 72 h (Figuras 17, 18, 19b y 19d; Anexo IX). Y de acuerdo con lo observado en la gráfica de interacciones primarias, la interacción cepa-tiempo de formación de biopelícula (Figura 19 a) logró ser significativa, mostrando la variabilidad en los perfiles de formación de biopelícula. La interacción cepa con respecto al pH del medio (Figura 19 b) muestra que independientemente de la cepa a medida que disminuye el pH la capacidad de formación de biopelículas disminuye.

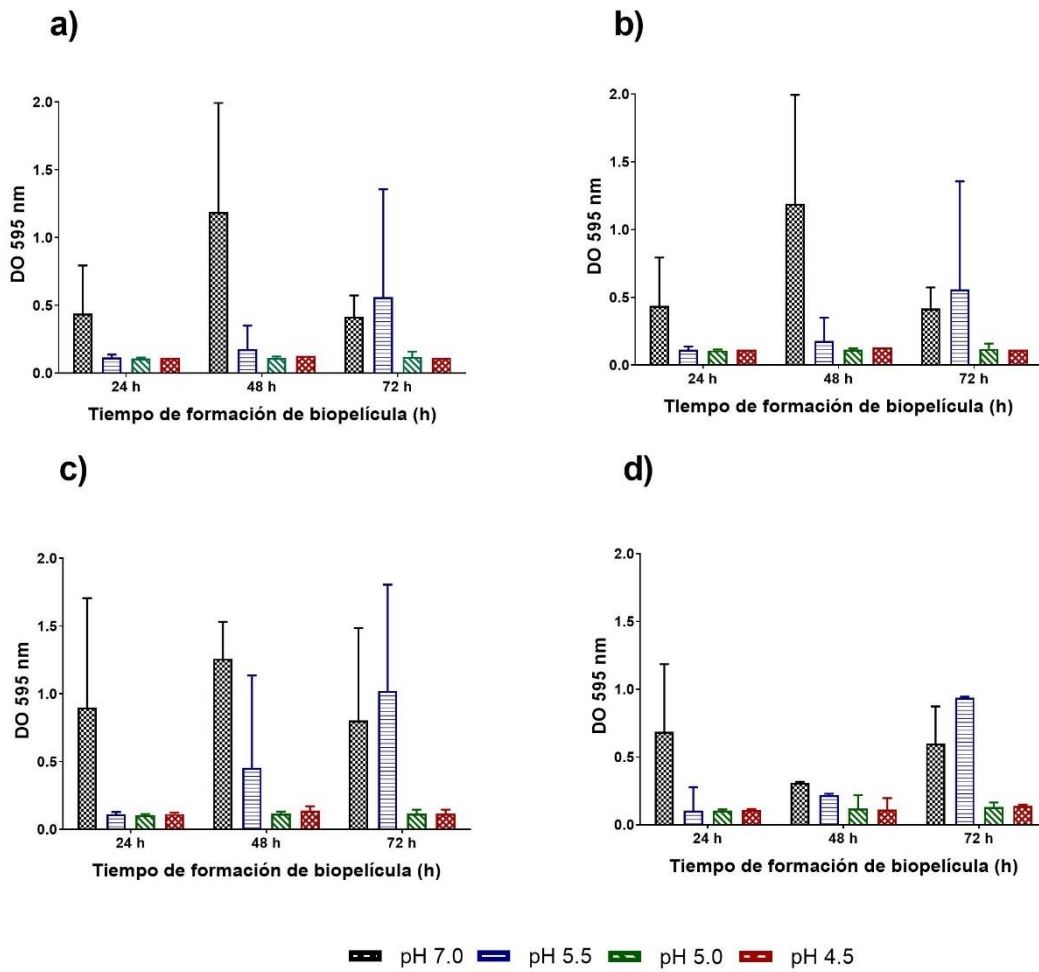


Figura 17. Formación de biopelículas por células no estresadas de *V. alginolyticus* (VA3 y VA11) en dos fases de cultivo en medio acidificado. a) VA3 en fase logarítmica; b) VA3 en fase estacionaria; c) VA11 en fase logarítmica; d) VA11 en fase estacionaria. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.

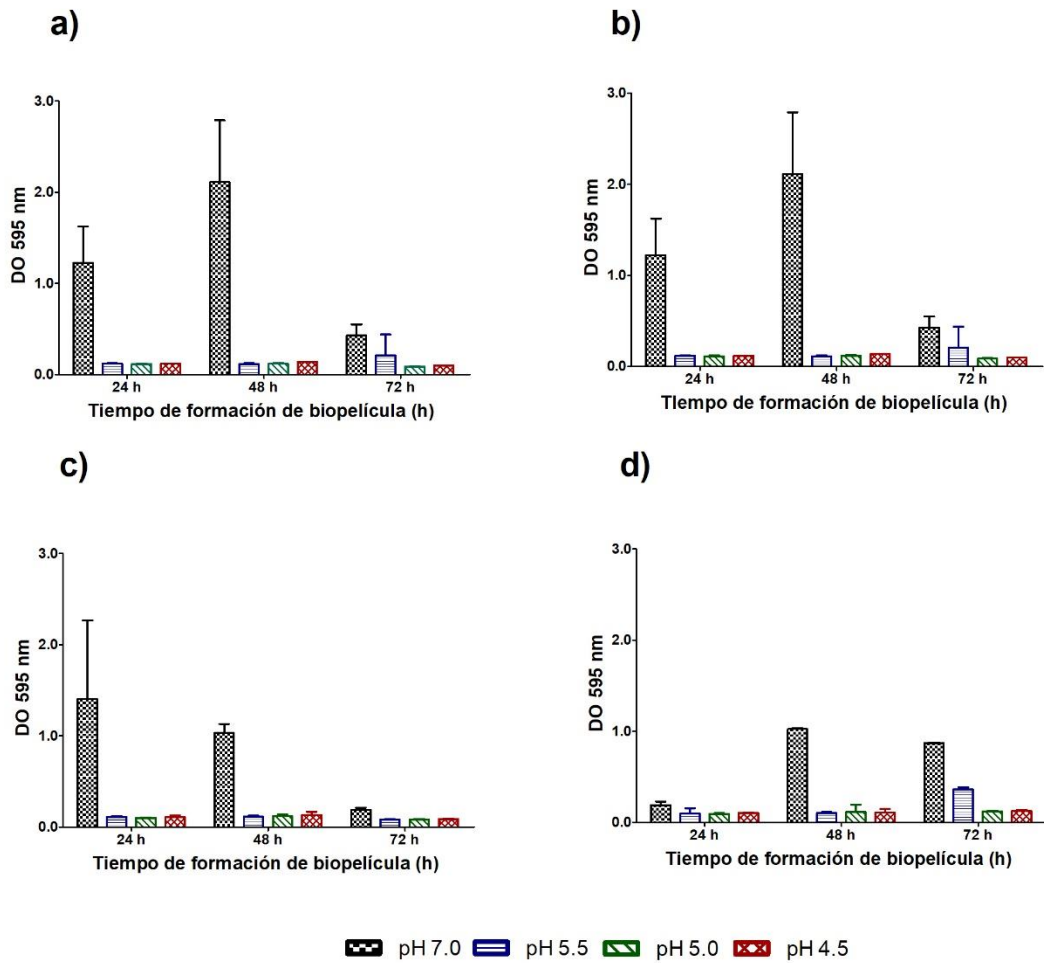


Figura 18. Formación de biopelículas por células no estresadas de *V. cholerae* (VCO y VC6) en dos fases de cultivo en medio acidificado. a) VCO en fase logarítmica; b) VCO en fase estacionaria; c) VC6 en fase logarítmica; d) VC6 en fase estacionaria. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.

Tabla 14. Análisis de varianza de los factores evaluados en la formación de biopelículas por cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* en CSTN acidificado.

Factor	Valor <i>p</i>
Fase de cultivo	0.4294
Cepa	0.0016*
pH de formación de biopelícula	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula*Cepa	0.0346*
pH de formación de biopelícula*Cepa	0.0026*
Fase de cultivo*Cepa	0.0182*
pH de formación de biopelícula*Tiempo de formación de biopelícula	<0.0001*
Fase de cultivo*pH de formación de biopelícula	0.0559
Fase de cultivo*Tiempo de formación de biopelícula	0.6551

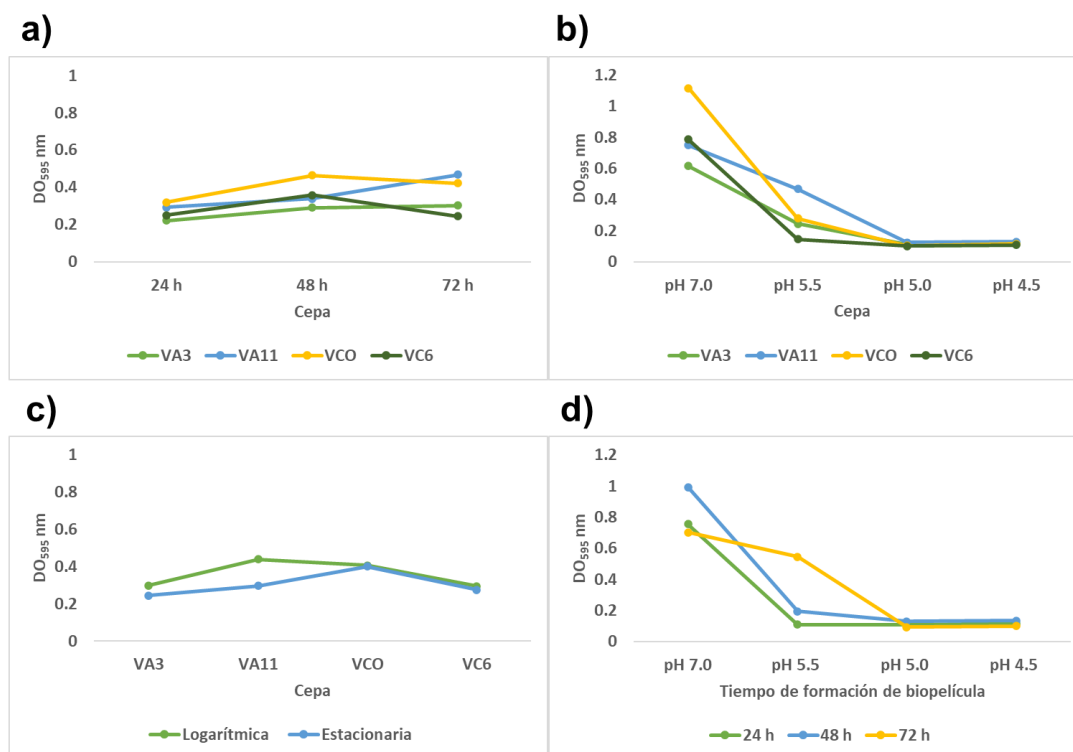


Figura 19. Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. a) Factores cepa y tiempo de formación de biopelículas; b) Factores cepa y pH del medio; c) Factores cepa y fase de cultivo; d) Factores tiempo de formación de biopelícula y pH del medio.

En los ensayos realizados en el medio de cultivo a pH 4.5 y pH 5.0 no se cuantificaron células viables ni biopolímeros. Estos resultados sugieren que a pH 5.5 las células de *Vibrio* activaron mecanismos de reparación, resistencia y adaptación al medio adverso para formar la biopelícula a las 72 h.

Hošťacká *et al.* (2010), realizaron la formación de biopelículas en microplaca por células de *V. cholerae* O1 y no-O1 en medio ATM (anaerobic transport medium) a pH 5.5 y por 18 h, obteniendo lecturas de absorbancia ( $DO_{550\text{ nm}}$ ) entre 0.051 y 0.122 nm. Por otra parte, Han *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la temperatura (4, 10, 15, 20, 25, 30 y 37 °C) en la formación de biopelículas a las 72 h por *V. parahaemolyticus* en microplacas que contenían TSNB, obteniendo que el IFB disminuyó de 1.03 a 0.21 a medida que la temperatura disminuyó. Con base en los estudios descritos, se demuestra que algunos factores estresantes disminuyen la formación de biopelículas de *Vibrio* spp., aunque hay factores que pueden marcar la diferencia entre el efecto observado, por ejemplo, en el caso de Hošťacká *et al.* (2010) el tiempo de formación de biopelículas y medio de formación, o el caso de Han *et al.* (2016), los diferentes niveles de

temperatura y especies evaluados y por último nuestro estudio en donde involucra diversos factores antes descritos.

Al igual que en el primer escenario, se calculó la tasa de formación de biopelículas en el caldo de cultivo a pH 5.5 (Anexo IX). Se obtuvieron valores entre 0.01 y 0.09, los cuales fueron similares a los encontrados en los ensayos de formación de biopelículas en el caldo de cultivo a pH 7.0 con células estresadas (escenario A), es decir, la tasa de formación de biopelículas es una relación entre la población y la producción de biopolímeros cuantificados al final del proceso, lo que nos confiere una estimación de la producción de biopelículas por la cantidad de células presentes.

Por lo que la tasa de formación de biopelículas en esta etapa experimental confirmó que el efecto negativo sobre la producción de biopelículas es debido a la exposición al ácido cítrico durante el almacenamiento, ya que la exposición al ácido afectó negativamente la producción de biopelículas independientemente la disminución de la población o cantidad de biomasa presente (menor cantidad de células).

#### **7.4.3 Formación de biopelículas en microplaca: células estresadas en caldo de cultivo acidificado**

El tercer escenario evaluado, consistió en cuantificar el desarrollo y la producción de polímeros por células de *Vibrio* estresadas en caldo de cultivo acidificado. Las células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* perdieron la viabilidad y por tanto no hubo formación de biopelículas. Es decir, la combinación del estrés celular inducido a las cepas y el ambiente estresante al que se enfrentó durante 72 h produjo un estrés severo en las células bacterianas y no lograron revertir el daño.

#### **7.4.4 Formación de biopelículas por *V. cholerae* en superficies inertes en presencia de residuos de pescado acidificado**

Con base en los resultados anteriores y debido a que *V. cholerae* es un microorganismo de relevancia epidemiológica no sólo en nuestro país, sino en el resto del mundo, la evaluación de la producción de biopelículas en superficies

se llevó a cabo utilizando únicamente las cepas de esta especie. Se definió que el tratamiento estresante a evaluar sería la exposición durante 60 min a pH 5.0, debido a que bajo estas condiciones las células reciben un estrés moderado y la producción de polímeros ocurre.

La formación de biopelículas en superficies inertes es un fenómeno que usualmente se estudia mediante metodologías como el uso de microplacas o el modelo de superficie inerte sumergida. En este trabajo se propuso un nuevo modelo de evaluación que consistió en inocular en una superficie de acero inoxidable o plástico células de *V. cholerae* estresadas (expuestas a ácido cítrico) vehiculizadas en extracto de pescado, y almacenadas en una cámara con una elevada HR (97%) durante 72 h. Mediante este modelo se simuló un microambiente que pudiera ocurrir en el entorno de preparación de alimentos de origen marino.

A las 4 h *V. cholerae* VCO y VC6 se adhirieron a las superficies de acero inoxidable y plástico en un rango de 2.8 a 4.7 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Después de 24 h de almacenamiento las poblaciones alcanzaron entre 5.1 y 8.2 Log UFC/cm<sup>2</sup> y permanecieron constantes hasta las 72 h (Figura 20). Con respecto al tipo de nutrientes presentes en las superficies, el desarrollo de la población fue mayor en CSTN pH 7.0 debido a que es el medio óptimo de desarrollo, sin embargo, el extracto de pescado acidificado resultó ser una mejor fuente de nutrientes para el desarrollo de la población, que el caldo de cultivo acidificado (Figura 21).

Las cepas de *V. cholerae* en superficies de acero y plástico lograron adherirse e incrementar su población durante las 72 h de almacenamiento. El tipo de nutrientes presentes en el vehículo de los microorganismos y el tiempo de almacenamiento, así como su interacción, influyeron en el incremento de las poblaciones ( $p < 0.05$ ) (Tabla 14). El extracto de pescado acidificado resultó ser una mejor fuente de nutrientes para el desarrollo de la población, que el caldo de cultivo acidificado.

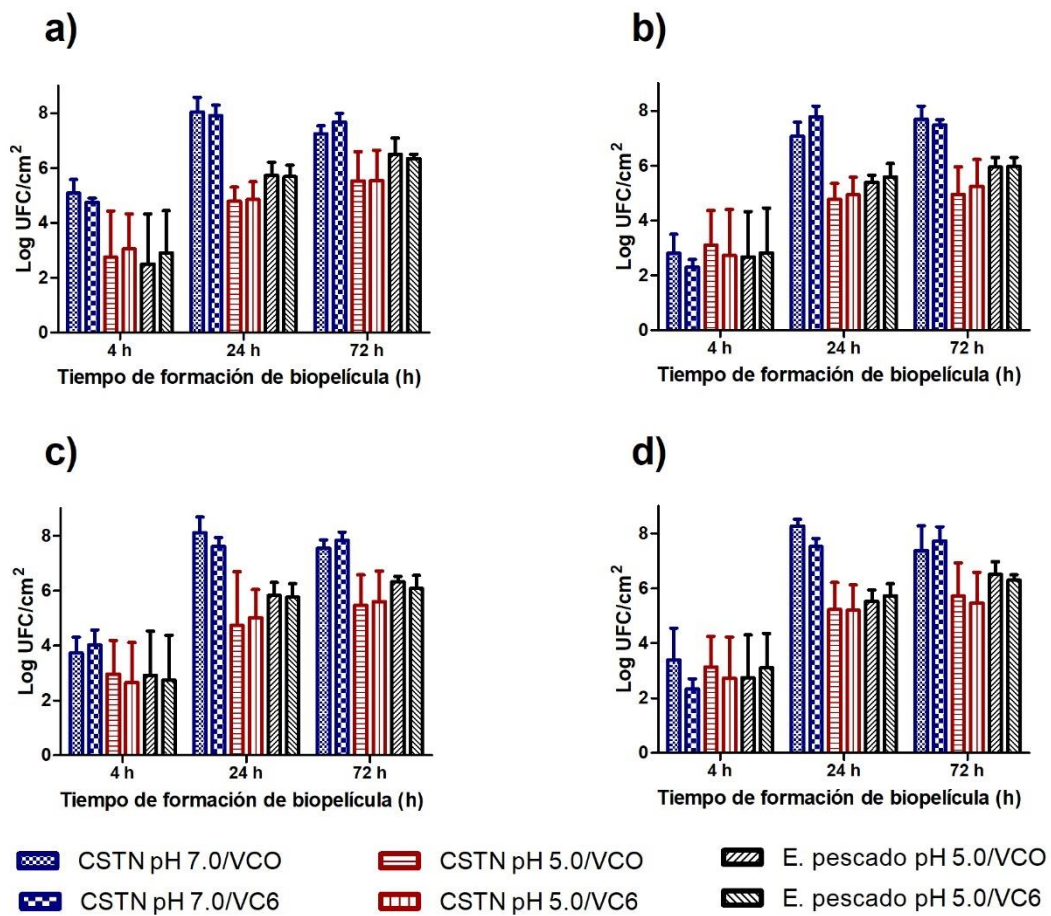


Figura 20. Dinámica de desarrollo de *V. cholerae* (VCO y VC6) en superficies de acero (a y b) y plástico (c y d) en presencia de caldo y residuos de pescado. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.



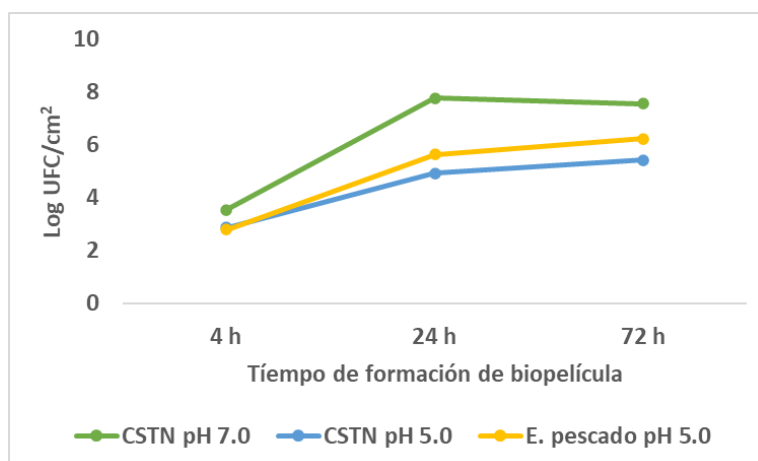


Figura 21. Gráfico de interacciones primarias significativas de las poblaciones de *V. cholerae* como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. A) Factores medio de formación de biopelículas y tiempo de formación de biopelículas.

Tabla 14. Análisis de varianza de los factores evaluados en la cuantificación de la población de cepas de *V. cholerae* en superficies de acero y plástico.

Factor	Valor <i>p</i>
Fase de cultivo	0.7799
Cepa	0.9059
Superficie	0.2031
Medio de formación de biopelícula	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula*Cepa	0.8293
Medio de formación de biopelícula*Cepa	0.7992
Superficie*Cepa	0.4474
Fase de cultivo*Cepa	0.9970
Medio de formación de biopelícula*Tiempo de formación de biopelícula	0.0006*
Superficie*Tiempo de formación de biopelícula	0.8418

Fase de cultivo*Tiempo de formación de biopelícula	0.6200
Superficie*Medio de formación de biopelícula	0.9665
Fase de cultivo*Medio de formación de biopelícula	0.5707
Fase de cultivo*Superficie	0.1606

---

Los resultados sugieren que la existencia de materia orgánica en conjunto con el almacenamiento de las superficies en una cámara de humedad relativa controlada y elevada es un modelo que simula un escenario similar al que se presenta durante la preparación de alimentos, debido a la alta humedad y presencia de nutrientes como ocurre en los ambientes de preparación de alimentos, lo cual permitió evidenciar la formación de biopelículas sobre las superficies que pueden contactar a los alimentos.

Además de cuantificar las células viables, también se determinó el incremento en los biopolímeros durante el almacenamiento de las superficies bajo las mismas condiciones. La cuantificación de los polímeros al igual que la población cuantificada asociada a la superficie en estudio logró aumentar a medida que transcurre el tiempo (Figura 22).

La fase de cultivo, el tipo de superficie y el tipo de nutrientes presentes en las superficies inertes influyeron significativamente en la formación de biopolímeros ( $p < 0.05$ ) (Tabla 15). Sin embargo, de acuerdo con las interacciones principales (Figura 23), la formación de biopolímeros independientemente la cepa fue incrementando hasta las 72 h, siendo mayor en superficies de plástico; a su vez, la producción de biopolímeros disminuyó cuando el medio de formación era en pH ácido, pero mostrándose mayor en la superficie de plástico.

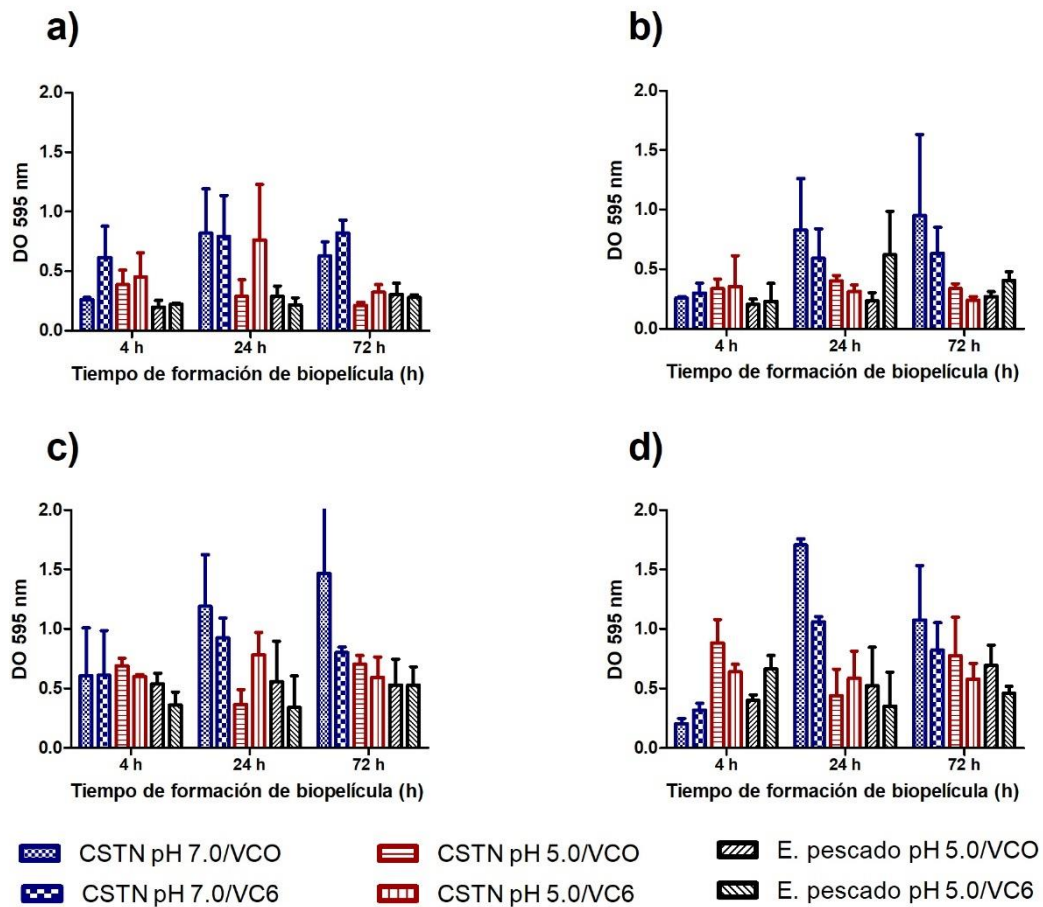


Figura 22. Biopolímeros formados por *V. cholerae* (VCO y VC6) sobre superficies de acero (a y b) y plástico (c y d) durante 72 h, en presencia de caldo y residuos de pescado. Las barras representan la media de nueve datos y las barras de dispersión la desviación estándar.

Tabla 15. Análisis de varianza de los factores evaluados en la cuantificación de biopolímeros producidos por cepas de *V. cholerae* en superficies de acero inoxidable y plástico.

Factor	Valor <i>p</i>
Fase de cultivo	0.0231*
Cepa	0.4534
Superficie	<0.0001*
Medio de formación de biopelícula	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula	0.9610
Tiempo de formación de biopelícula*Cepa	0.0001*
Medio de formación de biopelícula*Cepa	0.5091
Superficie*Cepa	0.0002*
Fase de cultivo*Cepa	0.1893
Medio de formación de biopelícula*Tiempo de formación de biopelícula	0.1049
Superficie*Tiempo de formación de biopelícula	0.0002*
Fase de cultivo*Tiempo de formación de biopelícula	0.6314
Superficie*Medio de formación de biopelícula	0.0029*
Fase de cultivo*Medio de formación de biopelícula	0.1427
Fase de cultivo*Superficie	0.1229

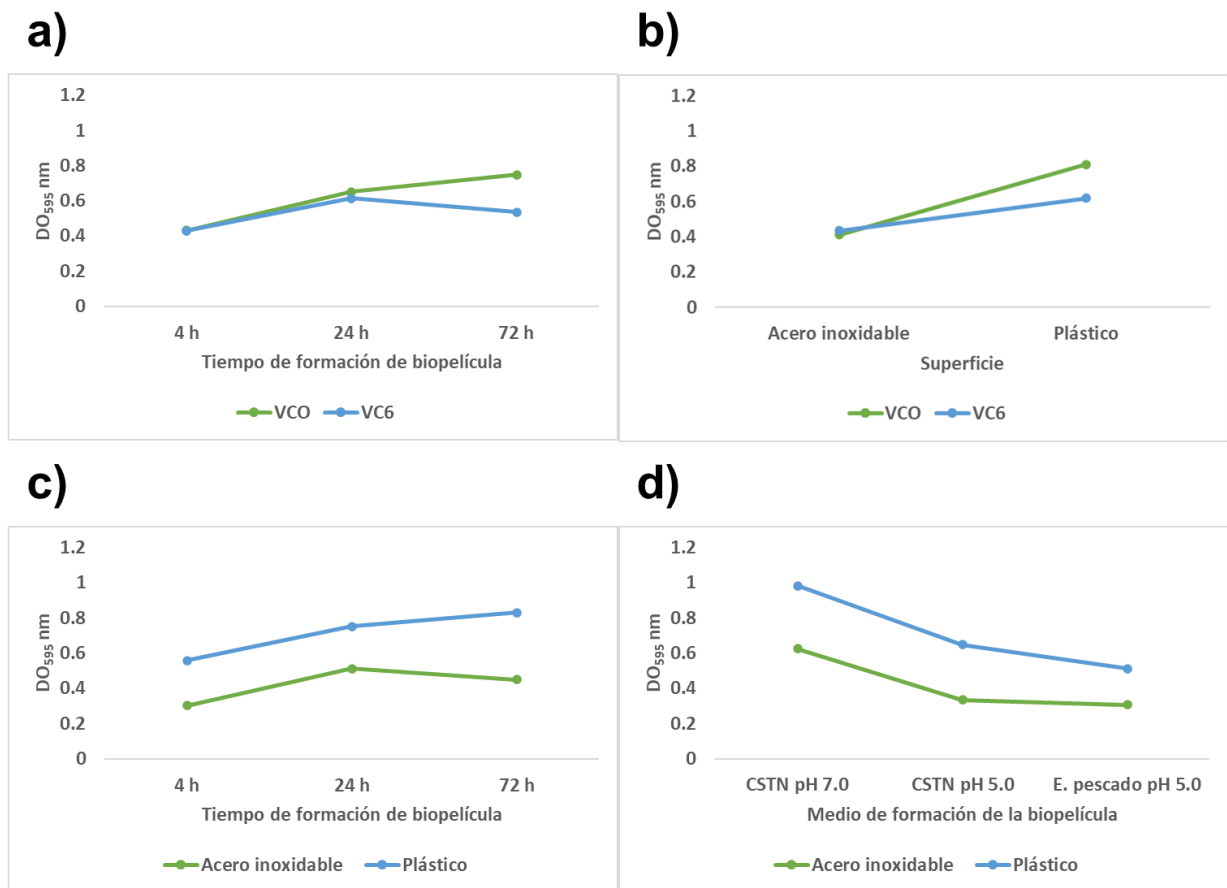


Figura 23. Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. A) Factores cepa y tiempo de formación de biopelículas; B) Factores cepa y superficie; C) Factores superficie y tiempo de formación de biopelículas; D) Factores superficie y medio de formación de biopelícula.

Tan *et al.* (2018), demostraron la formación de biopelículas por *V. parahameolyticus* en una superficie de vidrio almacenada por 72 h; a las 48 h el valor de DO<sub>600</sub> fue 3.3 y disminuyó a 2.5 las 72 h. Ashrafudoulla *et al.* (2021) mencionaron que la formación de biopelículas puede ocurrir si las bacterias establecen una adhesión irreversible a través de mecanismos como la presencia de flagelos, pilis, proteínas de adhesión e interacciones hidrofóbicas, más allá del tipo de superficie y si la superficie posee una fuente de nutrientes que permita la formación de biopelículas. Los resultados obtenidos en este estudio son

similares a los obtenidos por Guo *et al.* (2020), quienes describieron que *V. parahaemolyticus* puede formar más biopelículas en superficies de plástico que en acero inoxidable, y atribuyeron las diferencias a que el plástico posee mayor rugosidad.

A pesar de que la cuantificación tradicional de los biopolímeros con CV es una medida indirecta de la formación de biopelículas, otras metodologías como la espectroscopía de Raman y la microscopía de fuerza atómica (MFA) otorgan información complementaria sobre la composición química de los polímeros y la estructura de las biopelículas, respectivamente, que en conjunto brindan más información sobre las estructuras de las biopelículas.

#### **7.4.5 Caracterización de los biopolímeros de las biopelículas formadas en superficies de acero inoxidable y plástico**

La espectroscopia de Raman es una técnica óptica no destructiva analítica utilizada para la caracterización química y estructural de materiales y compuestos, que puede proporcionar información sobre la composición y conformación química de los polímeros de una biopelícula. En esta etapa experimental se realizó la formación de biopelículas por células de *V. cholerae* expuestas al estrés ácido (pH 5.0 por 60 min) sobre superficies (acero y plástico) en presencia de caldo de cultivo a pH neutro y acidificado con ácido cítrico (pH 5). Se omitió el uso de extracto de pescado acidificado para evitar que su composición tuviera interferencia en el ensayo.

Los resultados obtenidos se analizaron en función del tipo de superficie y se pueden apreciar en los espectros Raman para los biopolímeros formados en superficies de acero inoxidable y plástico las Figuras 24 y 25 respectivamente. De manera general cuando las biopelículas se formaron en superficies de acero inoxidable, independientemente de la fase de cultivo de la cepa y al ser expuestas a ácido cítrico, acorde a lo observado en el espectro Raman la composición de los polímeros no se modificó con respecto a la biopelícula desarrollada sin exposición al ácido (Figura 24). Sin embargo, se observó en el espectro Raman una diferencia entre los espectros de la cepa VCO (Figura 24 I) y la cepa VC6 (Figura 24 II). En los espectros de la cepa VC6, se observan picos con mayor intensidad relativa en las regiones 561-620 y 782-850  $\text{cm}^{-1}$ , los cuales

se asocian a carbohidratos y ácidos nucleicos, respectivamente. Lo anterior sugiere presencia mayoritaria de estos compuestos en la composición del biopolímero (Tabla 16). Adicionalmente en el espectro Raman de la cepa VCO (Figura 24 I) se observa la presencia de señal en la región 561-600  $\text{cm}^{-1}$  a las 4 h, que se asocian a carbohidratos simples, los cuales pueden significar la producción inicial de biopolímeros diferente a la cepa VC6. También se observó un pico débil en 900-950  $\text{cm}^{-1}$  que pudiera tratarse de compuestos como fosfolípidos, los cuales han sido reportados en cantidades mínimas en los biopolímeros producido por *V. cholerae* (Yildiz *et al.*, 2014). La diferencia entre las cepas VCO y VC6 se ha observado a lo largo de este proyecto, y como se comentó previamente, se debe a la diferente capacidad intrínseca de las cepas para formar biopelículas. Adicionalmente, los resultados obtenidos a través de la espectroscopia Raman demostró que no sólo la cantidad de polímeros que producen es diferente, sino también la composición del polímero.

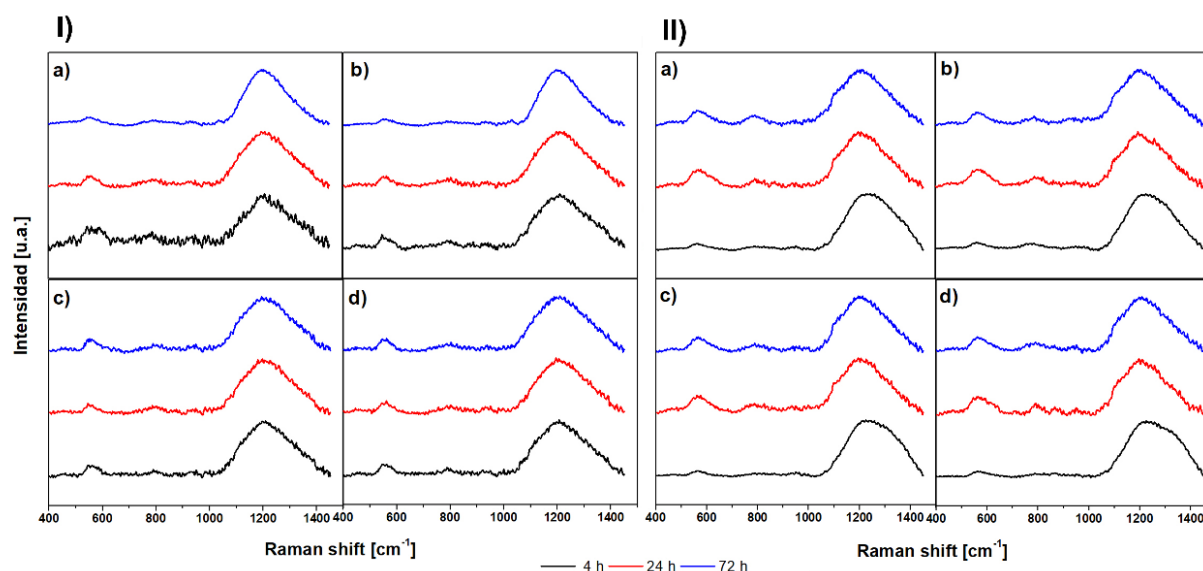


Figura 24. Espectros Raman de los biopolímeros formados por *V. cholerae* (I: VCO; II: VC6) en dos fases de cultivo (a y c: logarítmica; b y d: estacionaria) sobre superficies de acero inoxidable durante 72 h, y con la presencia de residuos de caldo de cultivo a pH 7.0 (a y b) y pH 5.0 (c y d). Los datos representan la media de cuatro datos.

Por otra parte, cuando las biopelículas son formadas en superficies de plástico, se observó una gran diferencia en la composición de los polímeros con respecto a los polímeros formados en superficies de acero (Figura 25).

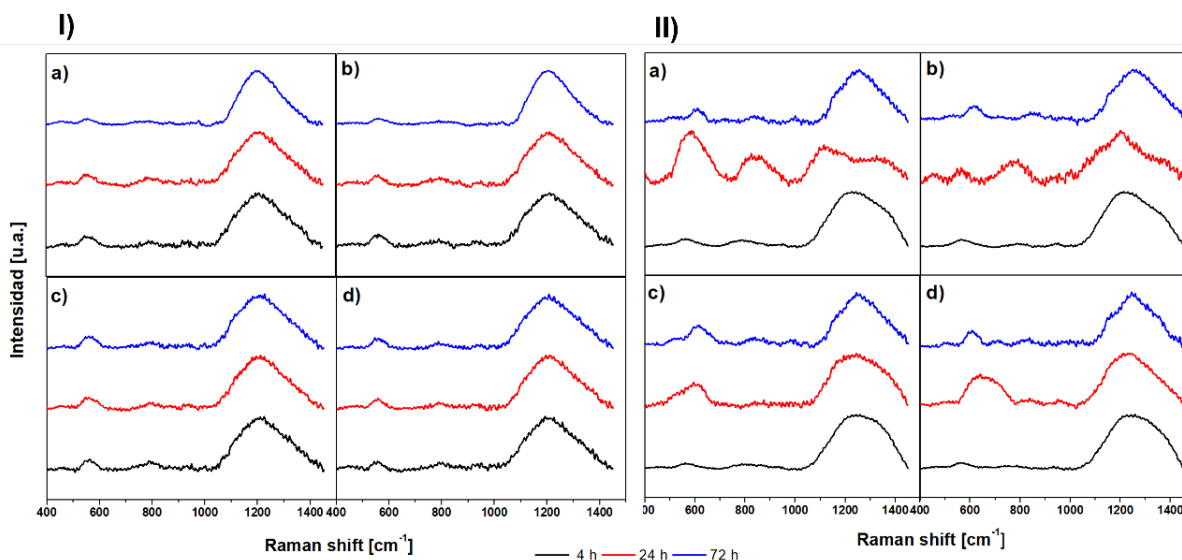


Figura 25. Espectros Raman de los biopolímeros formados por *V. cholerae* (I: VCO; II: VC6) en dos diferentes fases de cultivo (a y c: logarítmica; b y d: estacionaria) sobre superficies de plástico durante 72 h, y con la presencia de residuos de caldo de cultivo a pH 7.0 (a y b) y 5.0 (c y d). Los datos representan la media de cuatro datos.

Al igual que lo observado en las superficies de acero, en las superficies de plástico hubo diferencia entre las dos cepas. En los espectros Raman de los polímeros producidos por la cepa VC6 (Figura 25 II) se observaron picos con mayor intensidad relativa en las regiones 561-620 y 782-850  $\text{cm}^{-1}$ , lo que sugiere una presencia mayoritaria de compuestos glucosídicos y ácidos nucleicos extracelulares, respectivamente, y los cuales están conformando el biopolímero (Tabla 16); la intensidad de la señal de los picos correspondientes a los ácidos nucleicos extracelulares no se habían encontrado presentes en los espectros Raman antes descritos (Figura 24) y su presencia sugiere que pudiera tratarse de una biopelícula más estable, ya que Li *et al.* (2020) y Qian *et al.* (2020) reportaron que la presencia de ácidos nucleicos extracelulares son los responsables de mantener la estabilidad de la estructura de la biopelícula.

Por otra parte, en los espectros Raman de los polímeros producidos por la cepa VCO en plástico se observaron picos característicos de las estructuras de los biopolímeros en las regiones 561-582, 1088-1127 y 1258-1336  $\text{cm}^{-1}$ ,



previamente reportados en otros trabajos (Ivleva *et al.*, 2008, 2009; Tan *et al.*, 2018); sin embargo, la intensidad es menor a la observada en los espectros de la cepa VC6.

Por otra parte, en los espectros Raman de los polímeros producidos por la cepa VC6 expuesta ácido, no se aprecia la señal de los picos de las regiones 561-620 y 782-800  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a compuestos glucosídicos y ácidos nucleicos extracelulares, respectivamente, lo que sugiere que esta exposición al ácido no solo disminuye la cantidad de polímeros, también altera su composición y puede afectar la estabilidad de la biopelícula.

Otra diferencia que se puede desatacar en los espectros Raman de los polímeros producidos cepa VC6, es el aumento de la proporción de la banda de compuestos glucosídicos (561-582  $\text{cm}^{-1}$ ) y la disminución de la proporción del pico de compuestos glucosídicos con amidas (1258-1336  $\text{cm}^{-1}$ ) cuando el cultivo está en fase logarítmica (Figura 25 II a); y la presencia de una señal con poca intensidad en la región de compuestos fosfolipídicos alrededor de 900-950  $\text{cm}^{-1}$  cuando el cultivo está en fase estacionaria (Figura 25 II b).

Por último, independiente de la exposición de las células al ácido o no, se observó que conforme transcurrió el tiempo la composición de los polímeros cambió. La intensidad de la señal de los picos disminuyó cuando los polímeros se produjeron en la etapa tardía (72 h), lo que sugiere que la biopelícula puede ser más estable en la etapa temprana que en la etapa tardía. Adicionalmente estas diferencias se pueden asociar a un reacomodo en la morfología de los polímeros en el proceso de maduración de la biopelícula.

Como anteriormente se mencionó, las biopelículas formadas en superficies inertes después de la exposición a ácido cítrico pueden resultar en biopelículas con una población menor a una biopelícula formada por células en condiciones ideales, y los polímeros que la recubren pueden variar de acuerdo a la superficie en la que fueron desarrolladas. En ese sentido, en el plástico es en donde más diferencias hubo en su composición, y el fenómeno no está determinado por un solo factor.

Durante el análisis de las muestras mediante espectroscopía de Raman se monitoreó el rango de 400-1500  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a las regiones en donde se evidencia la presencia de compuestos que se han reportado forman parte de los polímeros producidos por *V. cholerae* durante la formación de biopelículas.

Estas regiones comprenden picos que corresponden a anillos glicosídicos C-O-C y COO<sup>-</sup> en 561-582, 1088-1127 y 1258-1336 cm<sup>-1</sup> (Ivleva *et al.*, 2008, 2009; Tan *et al.*, 2018); sin embargo, en esta misma región (1258-1336 cm<sup>-1</sup>) puede encontrarse el espectro de compuestos tipo amidas como proteínas o glicoproteínas (Ivleva *et al.*, 2008). Yildiz *et al.* (2014), describieron que en el caso de *V. cholerae* hay un polímero de esta naturaleza que es característico que denominaron vibriopolisacarido (VPS), que es el componente mayoritario de la matriz polimérica de la biopelícula producida por este microorganismo. Otra región observada es un pico a 788 cm<sup>-1</sup> que corresponde a un enlace O-P-O relacionado con ácidos nucleicos extracelulares que pueden estar asociados a biopelículas (Tan *et al.*, 2018) (Tabla 16).

Tabla 16. Asignación de picos en el espectro Raman de los biopolímeros producidos por *V. cholerae* durante la formación de biopelículas.

Posición del pico (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Macromolécula asociada	Referencias
561-582	C-O-C anillo glicosídicos; fracciones COO <sup>-</sup> ; esqueleto C-C	Carbohidratos	Ivleva <i>et al.</i> , 2008; Ivleva <i>et al.</i> , 2009; Tan <i>et al.</i> , 2018
782-788	O-P-O fragmentos de ADN	Ácidos nucleicos	Han <i>et al.</i> , 2017; Tan <i>et al.</i> , 2018
1088-1127	Extensiones C-C; polisacáridos glicosídicos C-O-C; aminoácidos C-N	Carbohidratos	Ivleva <i>et al.</i> , 2008; Ivleva <i>et al.</i> , 2009; Tan <i>et al.</i> , 2018
1258-1336	Amida III; OH, COH, HCO, deformación polisacárido HCC	Carbohidratos, glicoproteínas o proteínas	Ivleva <i>et al.</i> , 2008; Ivleva <i>et al.</i> , 2009; Yildiz <i>et al.</i> , 2014

Durante las 72 h en las que se monitoreó la formación de biopelículas en las diferentes condiciones del ensayo, los espectros de los polímeros contienen los picos que se describen en la literatura, lo que sugiere que la biopelícula permanece hasta la etapa tardía (Tan *et al.*, 2018).

#### **7.4.6 Morfología de biopelículas formadas por células de *V. cholerae* expuestas a ácido cítrico en superficies de plástico.**

La MFA es un tipo de microscopía de sonda (de unos cuantos nanómetros) que proporciona datos en los arreglos conformacionales y morfología de estructuras (a nivel nanométrico), y no sólo imágenes de estas. Por ello fue utilizada para el estudio de la estructura de las biopelículas para conocer si existe un cambio en la estructura durante el proceso de formación de biopelículas por células de *V. cholerae* expuestas al estrés ácido (pH 5.0 por 60 min) sobre superficies de plástico con remanente de nutrientes (CSTN a pH 5.0 y 7.0) e incubadas en condiciones de alta humedad relativa controlada. Las mediciones se realizaron en las etapas de adhesión inicial (4 h), formación temprana (24 h) y formación tardía (72 h) de la biopelícula.

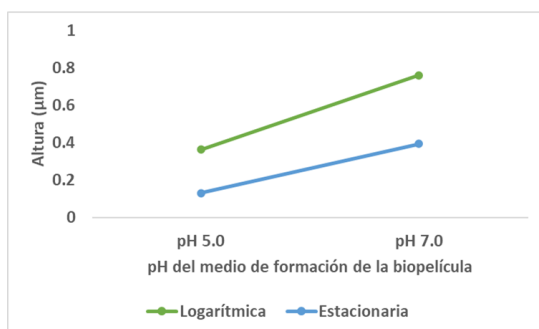
En esta serie de ensayos no se utilizó el extracto de pescado acidificado, debido a que su composición pudo generar una interferencia en la medición en el MFA. Sólo se estudió la cepa VC6, ya que los resultados de la espectroscopia de Raman mostraron que esta cepa presentó cambios en la composición de los biopolímeros producidos en las superficies de plástico posterior a la exposición al ácido cítrico.

Las imágenes de la MFA proporcionan datos cuantitativos en relación a la altura de picos o la rugosidad que se correlacionan con el espesor de la biopelícula. La fase de cultivo y el medio de formación de biopelícula fueron factores que incluyeron en la altura de picos y en la rugosidad de la biopelícula, así como algunas de las interacciones primarias ( $p < 0.05$ ) (Tabla 17).

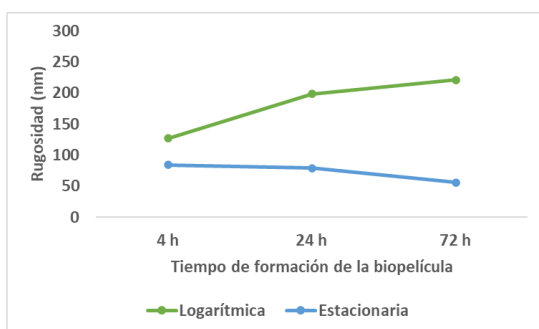
Tabla 17. Análisis de varianza de los factores evaluados en la medición de altura de picos y rugosidad de la biopelícula formada por células estresadas y no estresadas de *V. cholerae* en plástico.

Factor	Valor <i>p</i>	
	Altura de picos	Rugosidad
Fase de cultivo	<0.0001*	<0.0001*
Medio de formación de biopelícula	<0.0001*	<0.0001*
Tiempo de formación de biopelícula	0.3672	0.0780
Tiempo de formación de biopelícula* Medio de formación de biopelícula	0.1489	0.1637
Fase de cultivo*Tiempo de formación de biopelícula	0.3359	0.0019*
Fase de cultivo*Medio de formación de biopelícula	0.0013*	<0.0001*

a)



b)



c)

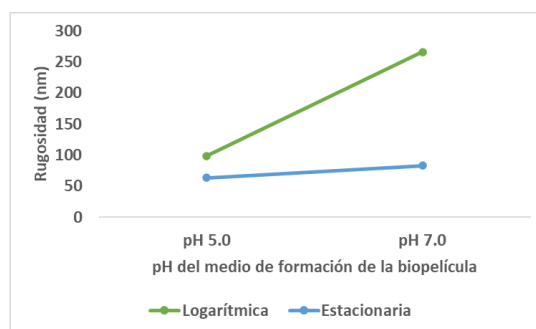


Figura 26. Gráficos de interacciones primarias significativas como resultado de la prueba de Tukey-Kramer. Altura de picos: A) Factores fase de cultivo y pH del

medio de formación de biopelículas. Rugosidad: B) Factores fase de cultivo y tiempo de formación de biopelículas; C) Factores fase de cultivo y pH del medio de formación de biopelículas.

Tabla 18. Valores obtenidos en la medición de altura de picos y rugosidad de la biopelícula formada por células estresadas y no estresadas de *V. cholerae* en plástico durante 72 h.

pH del medio de formación de biopelícula	Tiempo de formación de biopelícula (h)	Altura de picos <sup>1</sup>		Rugosidad <sup>1</sup>	
		Fase de cultivo			
		L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>
7.0	4	0.52 ± 0.33	0.90 ± 0.07	162.98 ± 33.89	140.88 ± 37.79
	24	0.81 ± 0.20	0.25 ± 0.09	314.76 ± 53.09	88.09 ± 20.85
	72	0.96 ± 0.49	0.03 ± 0.02	319.96 ± 68.75	19.14 ± 5.35
5.0	4	0.36 ± 0.18	0.09 ± 0.02	81.68 ± 13.48	27.51 ± 8.11
	24	0.25 ± 0.05	0.09 ± 0.06	91.15 ± 24.80	69.87 ± 27.67
	72	0.48 ± 0.06	0.21 ± 0.13	122.38 ± 17.54	92.53 ± 22.61

<sup>1</sup>Los valores representan la media de cinco valores ± la desviación estándar;

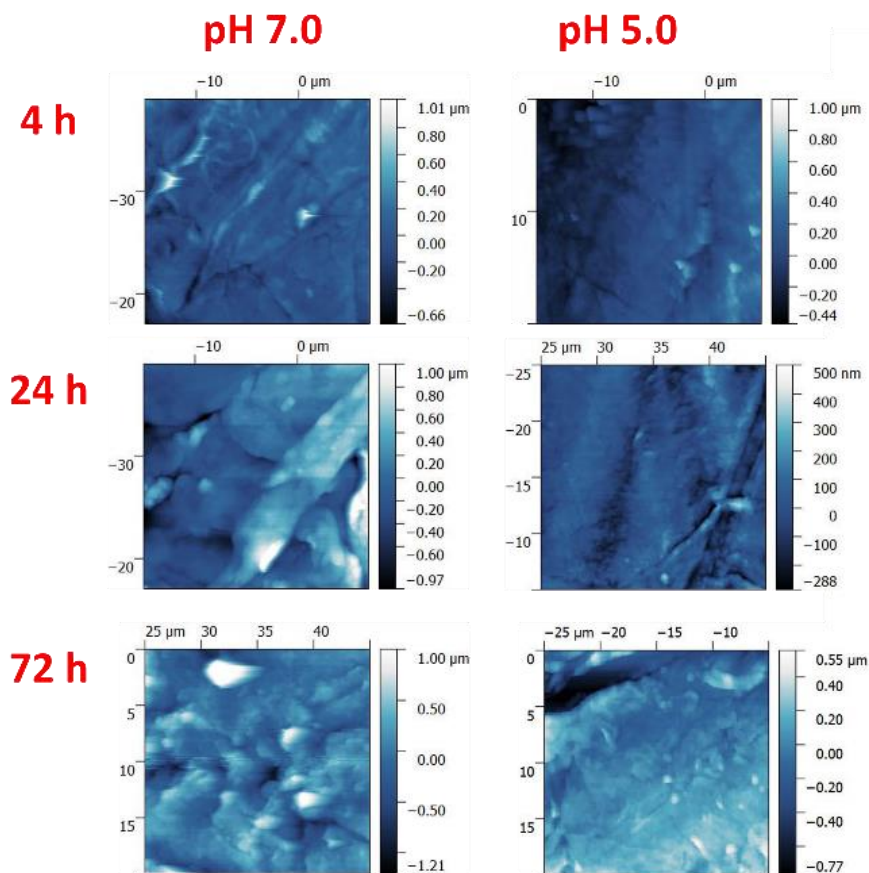
<sup>2</sup>Fase Logarítmica; <sup>3</sup>Fase Estacionaria.

Con base en la interacción significativa observada entre fase de cultivo y tiempo de formación de la biopelícula (Figura 26 a), se observó que la altura de picos fue mayor en las biopelículas que producidas por células en fase logarítmica, sin embargo, en ambas biopelículas se observó una mayor la altura de picos cuando el pH del medio fue 7.0 a. En cuanto a la rugosidad (Figura 26 b y c) las interacciones significativas indicaron la estructura fue más rugosa cuando las biopelículas son formadas por células de fase logarítmica en comparación con las de fase estacionaria, y la rugosidad aumentó al final del almacenamiento y siendo más rugosas a pH 7.0.

Lo anterior pudiera indicar que hay un menor desarrollo estructural como es la apreciación de menos columnas y canales (menor altura de picos y rugosidad)

en las biopelículas que desarrollaron en condiciones estresantes (pH 5.0). Adicionalmente, cabe destacar que la rugosidad de las biopelículas formadas por células en fase estacionaria disminuyó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, lo cual pudiera asociarse a la maduración de la biopelícula, es decir que pudiera compactarse la estructura, o bien conclusión del ciclo de formación de biopelículas, es decir, la dispersión de la misma y por ende el cambio en la conformación.

a)



b)

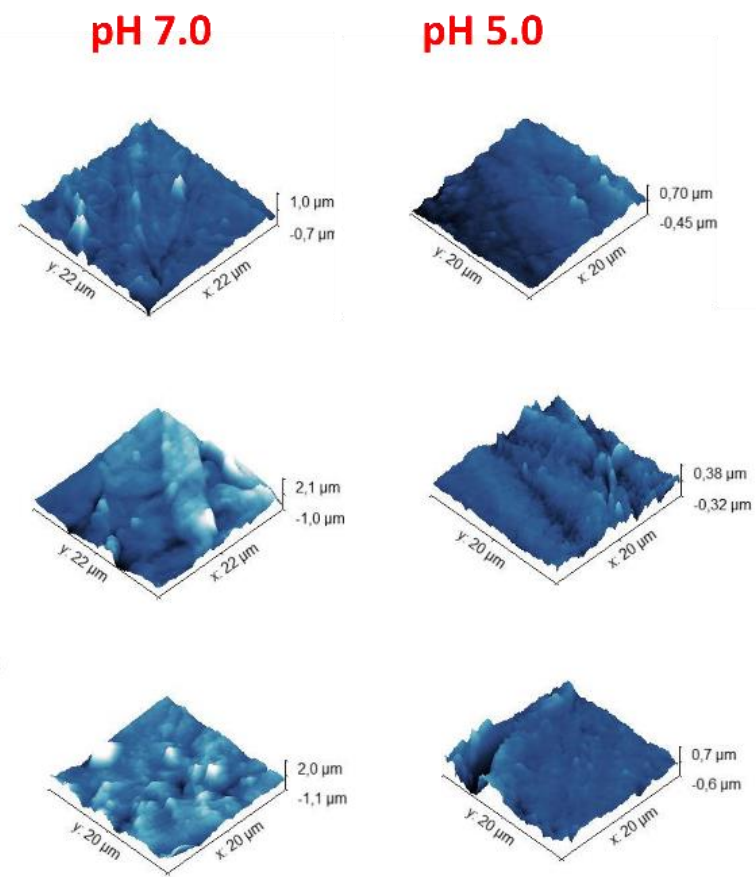
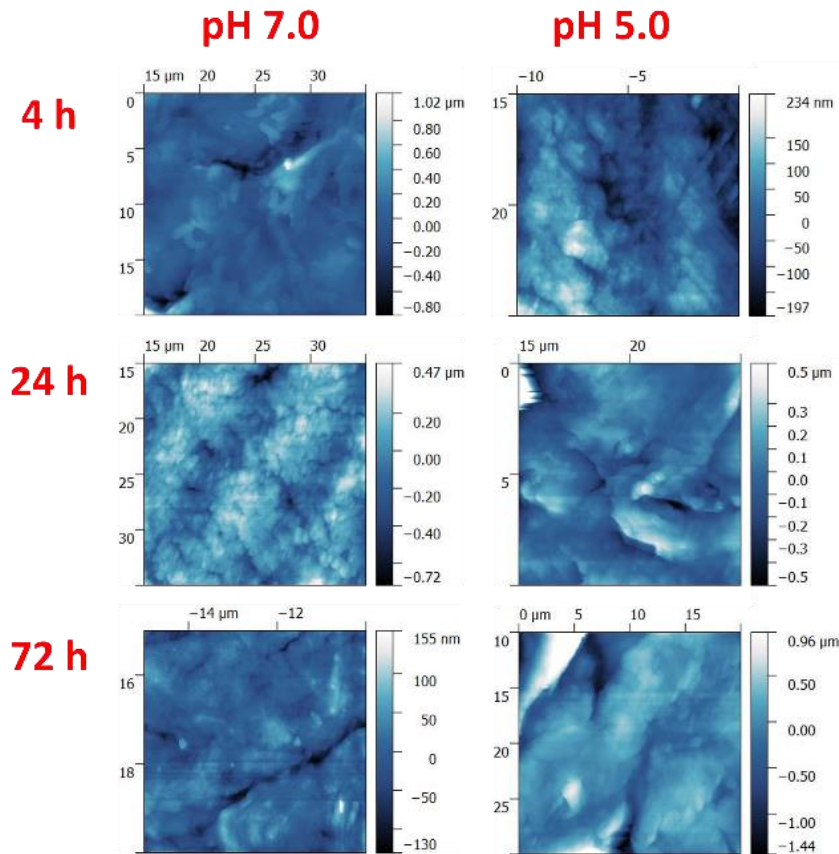


Figura 27. Micrografía con MFA de biopelículas formadas por células de *V. cholerae* en fase logarítmica después de la exposición a ácido cítrico en superficies de plástico con residuos de caldo de cultivo durante 72 h. a) Imágenes en 2D; b) Imágenes en 3D.

a)



b)

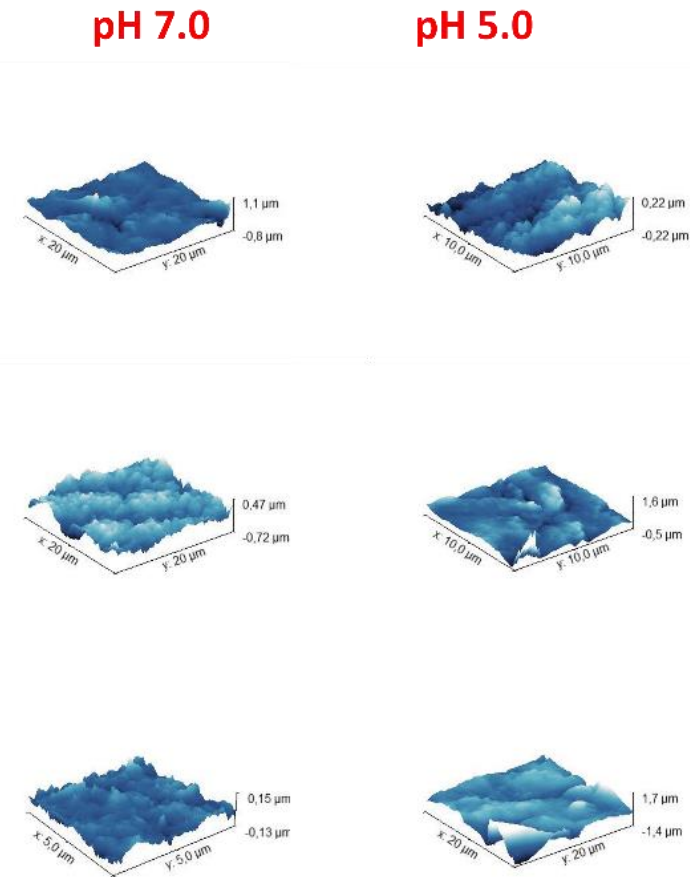


Figura 28. Micrografía con MFA de biopelículas formadas por células de *V. cholerae* en fase estacionaria después de la exposición a ácido cítrico en superficies de plástico con residuos de caldo de cultivo durante 72 h. a) Imágenes en 2D; b) Imágenes en 3D.



En una imagen de MFA las biopelículas se observan como estructuras continuas profundas con zonas oscuras o poros, mientras que los valles son depresiones en la superficie de las biopelículas (Merino-Guzman *et al.*, 2010).

Considerando lo anterior, las biopelículas formadas por células en fase logarítmica (Figura 27) y estacionaria (Figura 28) a las 24 h (fase temprana de formación) presentaron una estructura más detallada, es decir, mejor delimitación de las columnas, y profundidad de canales. No así, a las 72 h donde se puede observar en las imágenes un menor orden de las estructuras o columnas y canales no definidas o de diferente forma, que sugiere que pueden disminuir su tamaño o profundidad.

Mendoza-Hernandez *et al.* (2008), estudiaron los cambios en la morfología durante la formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae*. Describieron la presencia de columnas y canales grandes y profundos hasta las 24 h de formación. Adicionalmente los autores observaron que a pH 6.4 existe la presencia de más canales y columnas más cortas en comparación de las biopelículas formadas a pH 7.0. Los canales de agua son fundamentales para las biopelículas debido a que permiten que el agua y los nutrientes se transporten a través de la matriz de la biopelícula. Los autores también reportaron que en ambientes hostiles las biopelículas contienen mayor cantidad de canales y éstos son más largos. Estas imágenes coinciden con las observadas en las biopelículas que se formaron en presencia de ácido cítrico por células de *V. cholerae* en fase logarítmica, es decir, no se observan columnas muy elevadas, pero canales bien definidos.

La diferencia entre los parámetros estudiados en los factores evaluados y su relación con las imágenes observadas, hacen concluir que las estructuras cambiantes entre las biopelículas pudieran favorecer el intercambio de nutrientes y procesos metabólicos de la comunidad embebida en la biopelícula cuando ha sido estresada, y la reducción de la rugosidad y altura de picos pudiera alterar la estabilidad morfológica de la estructura, ya que cuando esta está formada en el ambiente óptimo no presenta estas reducciones.

## **7.5 Transcriptoma de células planctónicas y en biopelículas formadas por *V. cholerae* expuestas a ácido cítrico en superficies de plástico**

La regulación génica es un proceso biológico complejo compuesto de una serie de efectores, mediadores y reguladores específicos. En ocasiones la investigación de la expresión de genes específicos que codifican para estas moléculas no es suficiente para encontrar una vía de regulación o sus posibles convergencias. El estudio del ARN mediante el uso de la secuenciación masiva arroja millones de datos de expresión de genes que corresponden a la activación o represión de estos y que se involucran en diversos fenómenos biológicos, pudiendo establecer una conexión entre ellos. Por ello se utilizó en el estudio de la expresión genética del proceso de formación de biopelículas para así conocer si existe un cambio en los patrones de expresión de genes durante la formación de biopelículas por células de *V. cholerae* cuando son expuestas a un estrés ácido (pH 5.0 por 60 min) sobre superficies de plástico con remanente de nutrientes (CSTN pH 5.0 y pH 7.0) e incubadas en condiciones de alta humedad relativa controlada.

En estos ensayos sólo se consideró la cepa VC6, debido a que, con respecto a los resultados anteriores, en esta cepa se observaron cambios en la composición de los biopolímeros producidos cuando la biopelícula desarrolla en las superficies de plástico dependiendo de la exposición al ácido. Adicionalmente sólo se evaluó la biopelícula a las 24 h de formación debido a que es de nuestro interés las etapas tempranas de formación por que resultan ser aquellas en donde se pueda ver reflejado el efecto del estrés fisiológico de la célula en la biopelícula formada.

Posterior a la secuenciación de ARN y procesamiento de los datos, se obtuvo que cada biblioteca presentó una buena calidad con >94% secuencias.

Posterior al análisis de alineación y cuantificación de la expresión se pudo determinar los 1284 genes expresados. Dado que no se generaron suficientes réplicas para estimar el valor de dispersión, se usó un valor genérico de 0.2 para los cálculos de genes diferenciales, y la estimación del FDR (false discovery rate). Con base en estos parámetros y las secuencias se realizaron las siguientes comparaciones:

- 1) Células planctónicas en condiciones óptimas vs células en biopelículas formadas en medio óptimo.
- 2) Células planctónicas en condiciones óptimas vs células planctónicas en condiciones de estrés ácido.
- 3) Células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs células en biopelículas formadas en medio acidificado.
- 4) Células en biopelículas formadas en medio óptimo vs células en biopelículas formadas en medio acidificado.

Como resultado de estas comparativas, se obtuvieron que de los 1284 genes expresados 358 (27.9%) fueron expresados diferencialmente en las cuatro comparaciones establecidas (FDR<0.05) (Tabla 19; Anexo X).

Tabla 19. Genes inducidos y reprimidos en las diferentes etapas de formación de biopelículas por *V. cholerae* VC6 en condiciones óptimas y estresantes.

Comparación	Genes inducidos	Genes reprimidos
Células planctónicas en condiciones óptimas vs Células en biopelículas formadas en medio óptimo	103	106
Células planctónicas en condiciones óptimas vs Células planctónicas en condiciones de estrés ácido	114	162
Células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs Células en biopelículas formadas en medio acidificado	169	106
Células en biopelículas formadas en medio óptimo vs Células en biopelículas formadas en medio acidificado	89	177

Los genes diferencialmente expresados se agruparon por ontología según el proceso biológico en el cual estaban involucrados (Figura 29). Se generaron los siguientes grupos: 1) Respuesta a estímulos, que engloba procesos de activación, replicación, transcripción y traducción como parte del proceso celular natural o como respuesta a un efector; 2) Procesos biológicos, los cuales son procesos que se llevan a cabo dentro de la célula y tienen como objetivo garantizar la estabilidad del organismo; 3) Procesos metabólicos, que son los procesos involucrados en la transformación de la materia en energía; 4) Regulación biológica, que involucra aquellos intermediarios para cualquier proceso de replicación, transcripción o traducción; 5) Localización, que engloba procesos de comunicación intra y extra celular; y 6) Locomoción, que involucra los procesos de movilidad celular.

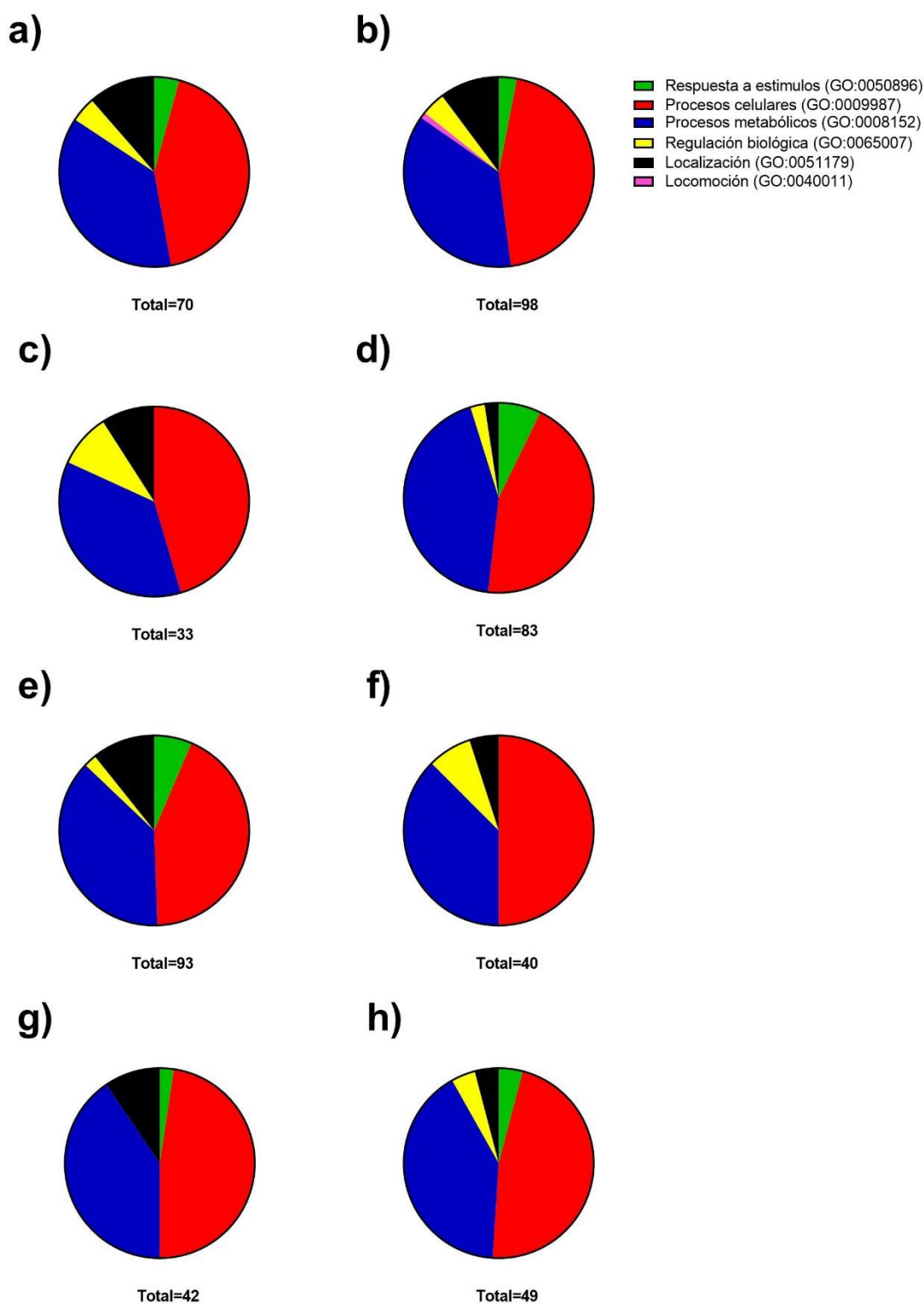


Figura 29. Distribución de los genes diferencialmente expresados en grupos ontológicos. a) Genes inducidos y b) reprimidos en la comparativa de células planctónicas en condiciones óptimas vs células en biopelículas formadas en medio óptimo; c) Genes inducidos y d) reprimidos en la comparativa de células planctónicas en condiciones óptimas vs células planctónicas en condiciones de

estrés ácido; e) Genes inducidos y f) reprimidos en la comparativa de células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs células en biopelículas formadas en medio acidificado; g) Genes inducidos y h) reprimidos en la comparativa de células en biopelículas formadas en medio óptimo vs células en biopelículas formadas en medio acidificado.

La expresión diferencial del análisis resultante incluye únicamente el señalamiento de cuales son los genes que resultaron tener una inducción o represión significativa y una vez realizado el agrupamiento, se revisó la lista de los genes para poder detalladamente determinar en cual de las 2 etapas en comparación ocurre la inducción o la represión y poder generar una interpretación biológica. A continuación, se destacan las diferencias entre las cuatro comparaciones y los genes involucrados de manera significativa en el proceso.

#### 1) Células planctónicas en condiciones óptimas vs Células en biopelículas.

Los resultados de esta comparación (Figura 29 a y b; Anexo X) evidenciaron que al ser procesos que se realizaron en condiciones óptimas representan el escenario ideal, y por tanto es de esperar que se encuentre una inducción y represión de diferentes grupos de genes en las células en biopelículas con respecto a las planctónicas, principalmente asociados con el metabolismo central (procesos celulares, procesos metabólicos y regulación biológica, según los grupos ontólogos). Sin embargo, un grupo ontólogo que se ve reprimido es el del proceso de locomoción. Previamente se ha reportado que los componentes del sistema flagelar (encargado principalmente de la locomoción de la bacteria) se han visto involucrados en la formación de biopelículas; es decir, existe una represión de los componentes del sistema flagelar al haber una interacción con la superficie y posteriormente la formación de la biopelícula (Silva *et al.*, 2016), por lo tanto, esta represión cobra sentido en la ya mencionada etapa.

Es importante destacar una inducción de los genes *hgf*, *toxS*, *vpsR* y *vpsU*, en la etapa de formación de biopelículas, en donde ha sido bien documentado su rol. El gen *hgf* codifica para una proteína chaperona de RNA que ayuda a estabilizarlo y favorece su traducción, y también se ha asociado con la promoción de la expresión de los genes *aphA* (regulador de la expresión de proteínas

relacionadas con la adhesión superficial y también iniciador de la cascada de regulación de producción de biopolímeros), *hapR* y *LuxOU* (moduladores del quorum sensing) quienes adicionalmente participan en la formación de biopelículas (Ding *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2012). El gen *toxS* es el que codifica para una proteína que estabiliza, evita la proteólisis y es un efector de la transcripción de *ToxR*, este modula la patogenicidad de *V. cholerae*, y a su vez la expresión de los TCP y otras proteínas de adhesión y colonización, favoreciendo la adhesión inicial para la formación de biopelículas (Almagro-Moreno *et al.*, 2015). *vpsR* es el modulador maestro de la producción de biopolímeros e iniciador de la formación de biopelículas debido a que el gen codifica para una proteína potenciadora de unión (*enhancer binding protein* o EBP, por sus siglas en inglés), quien favorece la transcripción de otros genes y efectores clave para la formación de biopelículas por *V. cholerae*, tal como *aphA*, *rbmA*, *vpsA*, *bap1*, *cdgC*, *rbmC*, *vpsT* y *vpsU* (Hsieh *et al.*, 2020); siendo *vpsU* inducido en las células en biopelículas en nuestro estudio.

## 2) Células planctónicas en condiciones óptimas vs Células planctónicas en condiciones de estrés ácido.

En este escenario, existe un proceso de exposición al estrés, lo cual se ve reflejado en la expresión diferencial de genes; es decir, existe mayor represión de genes involucrados en procesos metabólicos y en aquellos asociados a los procesos de respuesta a estímulos (Figura 29 c y d; Anexo X). Por otra parte, existe una mayor inducción en los procesos de regulación biológica y localización.

De los genes diferencialmente expresados que lograron ser significativos, los genes *cadAB* y *vexABR* se encontraron inducidos en las células planctónicas que fueron expuestas al ácido cítrico. Estos genes codifican para proteínas que forman parte de la respuesta de tolerancia a ácido en *V. cholerae*. Los genes *cadAB* forman parte del operon *cadBA*, encargado de la descarboxilación de aminoácidos, que es de utilidad para mantener la omeostasis del pH intracelular y neutralizar el ambiente extracelular (Ante *et al.*, 2015). Los genes *vexABR* forma parte del grupo *vex* (*vexABDEHKR*) una de las 5 clases diferentes de bombas de flujo asociadas a la resistencia a antibióticos y a otros compuestos antimicrobianos (Saier *et al.*, 2001); que a su vez está incluido en la superfamilia

de resistencia a la nodulación de la división celular (RND, por sus siglas en inglés) (Bina *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2012).

También se observó la inducción del gen *pspG* en las células planctónicas que fueron expuestas al ácido cítrico. Este gen comprende parte de la familia de las proteínas de shock a fagos (*psp*, por sus siglas en inglés) y que han sido descritos como en la respuesta del ataque de fagos a células bacterianas, y en donde adicionalmente también se han asociado a la protección de la disrupción de la membrana celular (DeAngelis *et al.* 2019). DeAngelis *et al.* (2019), describieron que los genes *pspA* (como promotor o represor de la expresión del sistema *psp*) y *pspG* (quien hasta ese momento se desconocía si participaba activamente en la activación del sistema *psp*) se encontraron inducidos cuando había una exposición a agentes estresantes como etanol, shock osmótico con NaCl, calor y durante la fase estacionaria. Por lo tanto, adicional a estos estresores y con base en nuestros resultados se sugiere que estos genes también participan en la respuesta a la exposición a ácido cítrico.

Otra inducción de genes interesante en las células planctónicas que fueron expuestas a ácido es la de los genes *hqf* y *vpsR*, los cuales son reguladores importantes en la formación de biopelículas (Hsieh *et al.*, 2020). El gen *vpsR* forma parte de la familia de reguladores *vps*, a quienes se les ha asociado a la regulación de ToxR y su respuesta ante condiciones ácidas. Por lo tanto, pudiera sugerirse que esta inducción adicional a la inducción de la expresión de la cascada de los mecanismos en contra de estrés ácido puede favorecer que la formación de biopelículas suceda aun cuando hay modificaciones en la membrana.

Por último, hacer mención de la inducción del gen *uspA* en las células planctónicas que fueron expuestas a ácido, el cual codifica para la proteína universal de estrés, y de quien lo único que se ha reportado es que se indujo en *V. cholerae* ante un estado de falta de nutrientes por 6 meses. Se sugirió que este gen puede ser parte de los mecanismos que ayudan a la respuesta al estrés, sin embargo, se atribuyen mayormente a la inducción de otros factores anti estrés como *rpoS*, *rpoD*, *rpoN* y *rpoE* (Gao *et al.*, 2022).

3) Células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs Células en biopelículas formadas en medio acidificado.



En esta comparativa existieron condiciones estresantes en ambas etapas, se observó una inducción en los procesos de respuesta a estímulos y localización y una mayor represión a los procesos de regulación biológica (Figura 29 e y f; Anexo X).

En relación a los procesos de respuesta a estímulos, se observaron inducidos los genes *polA*, *spoT*, *mutL*, *rep*, *recF* y *recG* en las células biopelículas en ambiente ácido, los cuales comprenden un grupo de genes reparadores o promotores de la replicación de ADN. Los genes *recFG* que participa en la reparación del ADN como parte del sistema SOS de *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2013) que se activa cuando la integridad del material genético se ve comprometida o es necesaria su protección ante un estrés severo, y que se encontró inducido en las células en biopelículas en ambiente ácido, puede asociarse a una estrategia que *V. cholerae* adoptó para continuar su replicación pese al estímulo estresante continuo en el que se encontraba.

Adicionalmente, observó una mayor inducción del gen *rpoS* en las células en biopelícula que adicional a los genes *recFG*, se asocia al sistema SOS en *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2013); sin embargo, a pesar de que se ha descrito la participación de *rpoS* en la modulación de la formación de biopelículas, en este estudio sólo se vió inducido en la formación de biopelículas bajo ambiente ácido y no en condiciones óptimas, por lo que se sugiere que su participación es atribuida al sistema SOS.

De los genes diferencialmente expresados que lograron ser significativos y que representan un mecanismo en contra del estrés ácido, se encuentran *cadBC* y *vexABEHR*. Sin embargo, los genes *cadBC* tuvo una inducción mayor en la etapa de células planctónicas expuestas al ácido y los genes *vexABEHR* en las biopelículas formadas en ambiente ácido, es decir cada grupo de genes tuvo mayor participación en las distintas etapas evaluadas; recordando que los genes del grupo *vex*, al codificar para una proteína con acción de bomba de protones, se sugiere que esta sobreexpresión favorezca que la bacteria pueda usar esta proteína como mecanismo de adherencia a las superficies.

Otro gen que también fue inducido en la etapa de formación de biopelículas en medio ácido fue *rpoH*, quien se ha descrito como el gen que codifica para el factor sigma H ( $\sigma^H$ ) que se encarga de la regulación contra el estrés térmico (Spector *et al.*, 2012). Sin embargo, Kang *et al.* (2018) describieron en

*Salmonella* Enteritidis 106 mostró un incremento en la expresión de este gen a medida que el pH disminuía (pH 7.3, 6.4, 5.4 y 4.5) después de 24 h de incubación, generando así una protección cruzada contra estrés térmico. Los autores sugirieron que la producción de proteínas de shock térmico puede brindar esta protección al ambiente ácido estresante. Este hallazgo pudiera sugerir que la sobreexpresión de este gen logró ser superior en las células en biopelículas por una exposición de mayor tiempo al medio ácido en contraste con las células planctónicas expuestas a ácido.

Finalmente, como era de esperarse, en la etapa de formación de biopelículas en medio ácido se indujeron genes como *hfq*, *ompR*, y *vpsO*, los cuales ya fueron descritos en el texto anterior.

#### 4) Células en biopelículas formadas en medio óptimo vs Células en biopelículas formadas en medio acidificado.

En esta comparación se exploraron las diferencias entre la formación de biopelículas en condiciones óptimas y ante un estímulo estresante (Figura 29 g y h; Anexo X). Se observó una inducción en los genes asociados a procesos de localización y represión de la regulación biológica; mientras que en los procesos celulares y metabólicos se observó una expresión similar de inducción y represión.

Con respecto a los procesos de localización, durante la formación de biopelículas en ambiente ácido se observó una sobreexpresión del gen *tatC*, el cual es miembro del operon *tatABC*, y es el twin-arginine translocatin (sistema de traslocación gemelo a arginina, por sus siglas en inglés) y es una vía de exportación de proteínas recientemente definida que sirve para translocar proteínas plegadas y que tiene diferentes dominios de reconocimiento (Zhu *et al.*, 2015). Otro gen inducido fue el *ftsY*, que codifica para una partícula de reconocimiento y acoplamiento (SRP, por sus siglas en inglés) involucrada en el sistema general de la vía de secreción de proteínas (SEC, por sus siglas en inglés) y que puede estar acoplada con otras proteínas para su exportación a través de la membrana, y que se ha reportado pueden estarse expresando en situaciones estresantes (Liu *et al.*, 2016); por lo tanto, dado que se ve favorecida su expresión en nuestros resultados, se puede sugerir que también pueden

expresarse en condiciones ácidas, y que FtsY puede tener relación con el complejo TatABC.

Otra diferencia radica en la represión del grupo de regulación biológica, en donde el gen reprimido más significativo fue *hfq* en la formación de biopelículas en medio ácido, quien está asociado con la promoción de la expresión de los genes *aphA* (regulador de la expresión de proteínas relacionadas con la adhesión superficial y también iniciador de la cascada de regulación de producción de biopolímeros) (Ding *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2012); al estar reprimido existe una disminución en la estabilidad en la unión a *aphA*, y por tanto el resto de la vía de síntesis de biopolímeros incluyendo los genes *toxS* y *vpsU*, los cuales también se observaron reprimidos en esta misma etapa. Los genes del conjunto *vps* junto con sus reguladores transcripcionales *vpsR* y *vpsT*, han sido los principales responsables de la producción de biopolímeros que hasta ahora se han reportado (Yildiz, *et al.*, 2001; Beyhan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010), lo cual pudiera explicar la disminución de polímeros en las biopelículas expuestas a ácido en nuestros resultados anteriores. Por otra lado, también se observó que los genes *vpsHRU* tuvieron mayor expresión cuando la biopelícula se formó en condiciones óptimas, lo cual también pudiera explicar la diferencia en la composición en la matriz polimérica. Sin embargo, puede haber otros reguladores transcripcionales que activen vías alternas y que no se vieron afectados en su regulación y por tanto por ello pudo haberse producido una biopelícula con una composición diferente a la desarrollada en condiciones óptimas. Tal es el caso del gen *ptsP* (que se observó inducido en esta etapa), que pertenece al sistema de fosfotrasferasa de fosfoenolpiruvato (PTS, por sus siglas en inglés), quien participa en el transporte y fosforilación de carbohidratos y se encarga de modular diferentes respuestas celulares de acuerdo a su disponibilidad en el ambiente intra y extracelular. De acuerdo a lo descrito por Houot *et al.* (2010), el sistema PTS puede modular a los genes *vps* y por tanto la formación de biopelículas.

Otra diferencia apreciada entre la formación de las biopelículas en condiciones de estrés ácido y condiciones óptimas es la represión de los genes *mreCD* en las células de biopelículas expuestas a ácido. Se ha descrito que el conjunto de genes *mreBCD* son componentes principales para la estructura celular bacteriana (Stewart, 2005; Xu *et al.*, 2018) ya que participan en la estabilidad de

la pared celular y la producción de peptidoglicano para favorecer la comunicación celular. Por lo tanto, su represión al formarse la biopelícula en condiciones de estrés ácido pudiera explicar la baja rugosidad y altura de picos de estas biopelículas observado en la MFA.

Anteriormente se describió a los genes *vex* que son un grupo de genes que codifican para un grupo de bombas de flujo pertenecientes al grupo *vex*, las cuales debido a que los genes *vexEH* se observaron inducidos en la etapa de formación de biopelículas en presencia de medio ácido, se sugiere que corresponden al mecanismo activo para contrarrestar las condiciones adversas del ambiente y poder mantener su viabilidad, lo cual también puede favorecer la formación de biopelícula. En ese sentido, algunos autores señalan) que algunos miembros de esta familia de genes incluyendo el *vexH*, pueden ser coadyuvantes en la producción del TCP y el co-TCP, que son factores de virulencia implicados en la colonización del intestino (Bina *et al.*, 2006, 2008; Taylor *et al.*; 2012; sin embargo, también se ha observado que participan en el anclaje a superficies inertes y por tanto también tienen participación en la formación de biopelículas (Silva *et al.*, 2016). Es decir, los resultados del presente trabajo sugieren que las bombas de flujo como *vexH*, al ser expresadas como un mecanismo de respuesta al ambiente ácido, pueden cumplir un segundo papel contribuyen a la adhesión de la célula a la superficie y su eventual formación de biopelículas.

Entre las células en biopelículas formadas en medio óptimo y las células en biopelículas formadas en medio acidificado. Se encontró una expresión diferencial significativa en los genes *rpoE* y *rpoS* (siendo mayor la expresión de estos genes en la etapa de biopelículas formadas en medio ácido). Sin embargo, en la comparativa anterior (células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs células en biopelículas formadas en medio acidificado), el gen *rpoH* sí logró tener una expresión diferencial en la formación de biopelículas expuestas al ácido, caso que no ocurre cuando se es comparada las células en biopelículas formadas en medio óptimo y las células en biopelículas formadas en medio ácido, esto es, los resultados sugieren que las proteínas de shock térmico (reguladas por *rpoH*) pueden jugar un papel importante en la formación de biopelículas independientemente de la presencia de estrés.

Xu *et al.* (2018), describieron que en el análisis de RNA seq de células en el estado viable no cultivable de *V. cholerae* inducido por frío, lograron

sobreexpresar los genes *vpsU*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* que se asocian con la producción de biopolímeros y proteínas propias de una biopelícula. Sugirieron que a pesar de que se ha descrito que células en este estado viable no cultivable no son capaces de producir biopelículas, estas si pueden agregarse a otras células libres para ser parte de una nueva biopelícula y así generar una nueva estrategia de sobrevivencia.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las especies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* y *V. alginolyticus* se aislaron de los diferentes alimentos de origen marino y superficies de contacto con alimentos. *V. alginolyticus* fue la especie de mayor prevalencia, la cual ha cobrado importancia en los últimos años por el incremento en los casos de enfermedad en otros países.
2. Con la información generada durante la evaluación de la capacidad de las cepas de *Vibrio* para formar biopelículas, se propuso un nuevo esquema de clasificación de biopelículas que complementa al ya existente y que incluye un nivel de riesgo asociado a la formación de biopelículas.
3. Cepas de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* al exponerse a estrés causado por pH ácido cítrico sufre un daño ligero en la permeabilidad de la membrana, y en la actividad de las bombas de flujo, no alterando su viabilidad ni tasa de desarrollo y recuperación.
4. La simulación de escenarios similares a los ambientes de preparación de alimentos marinos, como fue el uso de residuos de pescado acidificado y la incubación en alta humedad relativa, permitió la evaluación de la formación de biopelículas en superficies inertes, permitiendo el desarrollo de población y formación de biopolímeros, siendo menor cantidad que en condiciones óptimas.
5. Las cepas de *V. cholerae* mostraron una variabilidad intra-especie en la capacidad de formación de biopelículas, la cual no consiste sólo en la cantidad y dinámica sino también en el tipo y composición de polímeros que puede producir.
6. Los biopolímeros que conforman las biopelículas en superficies de plástico fueron producidos en mayor cantidad que en superficies de acero,

y aumentando su cantidad de carbohidratos y eDNA, y su ordenamiento cuando existe una exposición a ácido cítrico, sugiriendo que afecta su estabilidad y que después de 24 h se favorece la dispersión.

7. El análisis del transcriptoma sugiere que no existe una convergencia entre la ruta de respuesta en contra del estrés ácido y la formación de biopelículas; los factores sigma modulan funciones específicas que no tienen relación entre ambos procesos, pero existen genes que pueden participar en ambos, tal es el caso del *toxR*.

## 9. REFERENCIAS

- Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B., Siddique, A.K., Hasan, N.A., Sack, R.B., Sack, D.A., Ahmed, K.U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C.J., Huq, A., & Colwell, R.R. (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17801-17806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705599104>
- Almagro-Moreno, S., Root, M.Z., & Taylor, R.K., (2015). Role of ToxS in the proteolytic cascade of virulence regulator ToxR in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 98 (5), 963–976 <https://doi.org/10.1111/mmi.13170>
- Alvarez, G., Heredia, N., & García, S., (2003). Relationship between the effects of stress induced by human bile juice and acid treatment in *Vibrio cholerae*. *Journal of Food protection*, 66 (12), 2283-2288. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.12.2283>
- Ambriz-Aviña V., Contreras-Garduño J.A., & Pedraza-Reyes M. (2014). Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *BioMed Research International*, 461941, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/461941>.
- Ante, V.M., Bina, X.R., & Bina, J.E., (2015). The LysR-type regulator LeuO regulates the acid tolerance response in *Vibrio cholerae*, *Microbiology*, 161(12), 2434–2443. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000194>
- Baharoglu, Z., Krin, E., & Mazel, D., (2013). RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genetics*, 9 (4), e1003421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003421>



- Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A. & Martínez-Urtaza, J., (2012). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming, *Nature Climate Change Journal*, 3, 73-77. <https://doi.org/10.1038/nclimate1628>
- Baranyi, J. & Roberts, T.A., (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4), 277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bang, W., & Drake, M.A., (2005). Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiology*, 22, 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.09.006>
- Beyhan S, Tischler A.D., Camilli A., & Yildiz F.H., (2006). Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *Journal of Bacteriology*, 188 (10), 3600-3613. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3600-3613.2006>
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., & Kaysner, C.A., (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*, *Journal of Microbiological Methods*, 36 (3), 215–225. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(99)00037-8).
- Bina, J.E., Provenzano, D., Wang, C., Bina, X.R., & Mekalanos, J.J., (2006), Characterization of the *Vibrio cholerae* *vexAB* and *vexCD* efflux systems. *Archives in Microbiology*, 186, 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0133-5>
- Bina, X.R., Provenzano, D., Nguyen, N. & Bina, J.E., (2008), *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infection and Immunity*, 76 (8), 3595–3605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>.

- Bina, X. R., Howard, M.F., Ante, V.M., & Bina, J.E., (2016). *Vibrio cholerae* LeuO links the ToxR regulon to expression of lipid A remodeling genes, *Infection and Immunity*, 84 (11), 3161–3171. <https://doi.org/10.1128/IAI.00445-16>.
- Bridges, A.A., Fei, C., & Bassler, B.L., (2020). Identification of signaling pathways, matrix-digestion enzymes, and motility components controlling *Vibrio cholerae* biofilm dispersal. *PNAS*, 117 (51):32639-32647. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021166117>.
- Byun, K.H., Han, S.H., Yoon, J., Park, S.H., & Ha, S.D., (2021). Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella* Enteritidis planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin, *Food Control*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107838>
- Centro de Control de Enfermedades (CDC), (2013), Trends in foodborne illness in the United States, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/trends-in-foodborne-illness.html>. Fecha de consulta: Abril 2018.
- Centro de Control de Enfermedades (CDC), (2016), Surveillance for foodborne Disease Outbreaks United States, 2014: Annual Report.
- Centro de Control de Enfermedades (CDC), (2021), FoodNet 2020 Preliminary Data. Atlanta, GA: CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2020.html> Fecha de consulta: Septiembre 2022.
- Centro de Control de Enfermedades (CDC), (2022) Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 2014: Annual Report National Outbreak Reporting System (NORS). Disponible en <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> Fecha de consulta Septiembre 2022.

- Chiang, M.L., Chou, C.C., Chen, H.C., Tseng, Y.T., & Chen, M.J., (2012). Adaptive acid tolerance response of *Vibrio parahaemolyticus* as affected by acid adaptation conditions, growth phase, and bacterial strains. *Foodborne pathogens and disease*, 9 (8), t734-740. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1112>
- Crim, S.M, Iwamoto, M., Huang J.Y. *et al.*, 2014, Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, U.S. sites, 2006-2013, *Morbidity and mortality weekly report*, 63 (15), 328-332. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5779392/>
- D'Souza, C., Alva, P.P., Padyana, A.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Kumar, B.K., (2019). Unveiling the acid stress response of clinical genotype *Vibrio vulnificus* isolated from the marine environments of Mangaluru coast, India, *Canadian Journal of Microbiology*, 65 (9), 681-690. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0700>
- DeAngelis, C.M., Nag, D., Withey, J.H., & Matson, J.S., (2019). Characterization of the *Vibrio cholerae* phage shock protein response, *Journal of Bacteriology*, 20, e00761-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00761-18>.
- Ding, Y., Davis, B.M., & Waldor, M.K., (2004). Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates  $\sigma^E$  expression. *Molecular Microbiology*, 53 (1), 345 – 354 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04142.x>
- Dharmaprakash, A., Mutt, E., Jaleel, A., Ramanathan, S., & Thomas, S., (2014). Proteome profile of a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* SC192 strain in the planktonic and biofilm condition, *Biofouling: The journal of bioadhesion and biofilm research*, 30 (6), 729-739. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.916696>

- Du, C., Huo, X., Gu, H., Wu, D., & Hu, Y., (2021). Acid resistance system CadBA is implicated in acid tolerance and biofilm formation and is identified as a new virulence factor of *Edwardsiella tarda*, *Veterinary Research*, 52 (117), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00987-x>
- Fernández-Rendon, C.L., Barrera-Escorcía, G., Wong-Chang, I., Vázquez-Botello, A., Gómez-Gil, B., & Lizárraga-Partida, M.L., (2018), Toxigenic *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in oysters from the Gulf of Mexico and sold in Mexico City, *International Journal of Environmental Health Research*, 29 (4),1-11. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1548696>
- Franco-Monsreal, J., Serralta, L. & Hernández, R., (2015). Importancia sanitaria de peces y mariscos para consumo humano, Editorial académica española, ISBN:978-3-659-09057-8.
- Franco-Monsreal, J., Zarza-García, A.L., Villa-Ruano, N., Ramon-Canul, L.G., Galván-Valencia, O.T., Meza-Jimenez, M.L. & Mota-Magaña, L., (2010). Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México, *Ciencia y mar*, XIV (41), 31-44. ISBN 13: 9783845490366
- Fong J.C., Karplus K., Schoolnik G.K., & Yildiz F.H., (2006). Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology*, 188 (3), 1049-1059. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006>
- Fong J.C., & Yildiz F.H., (2007). The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology*, 189 (6), 2319-2330. <https://doi.org/10.1128/JB.01569-06>
- Gao, X., Zhang, Z., Qian, Q., Chen, Q., Gu, S., Li, J., Zhang, Y., Wu, C., Jiang, Q., & Zhang, X., (2022). Survival characteristics and transcriptomic

analyses reveal the adaptive response of the aquatic pathogen non-O1/O139 *Vibrio cholerae* to starvation stress. *Microbiology Spectrum*, e0193921. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01939-21>

González-Tinoco, Y. & Dreyfus, G., (2015). Motilidad de las bacterias marinas del género *Vibrio*, *Revista de Educación Bioquímica*, 34 (4), 98-108.

Gu, D., Guo, M., Yang, M., Zhang, Y., Zhou, X., & Wang, (2016). A  $\sigma^E$  Mediated temperature gauge controls a switch from LuxR mediated virulence gene expression to thermal stress adaptation in *Vibrio alginolyticus*, *PLoS pathogens*, 12 (6), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005645>

Gu, D., Wang, K., Lu, T., Li, L., & Jiao, X., (2021). *Vibrio parahaemolyticus* CadC regulates acid tolerance response to enhance bacterial motility and cytotoxicity, *Journal of Fish Disease*, 44 (8), 1155-1168. <https://doi.org/10.1111/jfd.13376>.

Gu, D., Zhang, J., Hao, Y., Xu, R., Zhang, Y., Ma, Y., & Wang, Q., (2019). Alternative sigma factor RpoX is a part of the RpoE regulon and plays distinct roles in stress responses, motility, biofilm formation, and hemolytic activities in the marine pathogen *Vibrio alginolyticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (14), e00234-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00234-19>.

Guan, J., Xiao, X., Xu, S., Gao, F., Wang, J., Wang, T., Song, Y., Pan, J., Shen, X., & Wang, Y. (2015). Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression, *Journal of Microbiology*, 53 (9), 633–642. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-0099-6>

Haendiges, J., Rock, M., Myers, R.A., Brown, E.W., Evans, P., & Gonzalez-Escalona, N., (2014). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*, Maryland U.S.A. 2012, *Emerging Infections Diseases*, 20 (4), 718-20. <https://doi.org/10.3201/eid2004.130818>

- Haines-Menges, B., Whitaker, W.B., & Boyd, E.F., (2014). Alternative sigma factor RpoE is important for *Vibrio parahaemolyticus* cell envelope Stress response and intestinal colonization, *Infection and Immunity*, 82 (9), 3667–3677. <https://doi.org/10.1128/IAI.01854-14>
- Hammer BK, & Bassler BL., (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 50 (1), 101-104. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>.
- Han, N., Rahaman-Mizan, F., Kabir-Jahid, I., & Sang-Do, H., (2016). Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise temperature, *Food Control*, 70, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.054>
- Han, Q., Song, X., Zhang, Z., Fu, J., Wang, X., Malakar, P.K., Liu, H., Pan, Y., and Zhao, Y., (2017). Removal of foodborne pathogen biofilms by acidic electrolyzed water, *Frontiers in Microbiology*, 8, 988. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00988>
- Hernández-Iturriaga, M., Tamplin, M.L., & Fernández-Escartin, E., (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature, *Journal of Food Protection*, 70 (1), p. 30-34. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.1.30>
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3), 373–395. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002>
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., & Miller, S.I., (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436 (7054),1171-1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>.

- Hošťacká, A., Čižnár, I., & Štefkovičová, M., (2010). Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 55, 75–78. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0012-y>
- Houot, L., Chang, S., Pickering, B.S., Absalon, C., & Watnick, P.I., (2010), The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *Journal Of Bacteriology*, 192 (12), 3055–3067. <https://doi.org/10.1128/JB.00213-10>
- Huang, W.S., & Wong, H.C., 2012, Characterization of low salinity stress in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, Vol. 75 (2), 231–237. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-321>
- [Hsieh, M.L., Waters, C.M., & Hinton, D.M., \(2020\) VpsR Directly activates transcription of multiple biofilm genes in \*Vibrio cholerae\*. \*Journal of Bacteriology\*, 202, e00234-20. https://doi.org/10.1128/JB.00234-20.](https://doi.org/10.1128/JB.00234-20)
- Ivleva, N.P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., & Haisch. C., (2008). *In situ* surface-enhanced Raman scattering analysis of biofilm, *Analytical Chemistry*, 80 (22), 8538-44. <https://doi.org/10.1021/ac801426m>.
- Ivleva, N.P., Wagner, M., & Horn, H., (2009). Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393 (1), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2470-5>
- Jacobs Slifka, K.M., Newton, A.E., & Mahon, B.E., (2017). *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012, *Epidemiology and Infections*, 145 (7), 1491–1499. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000140>
- Jahid, I.K. & Ha, S.D., (2012). A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Science and biotechnology*, 21 (2), 299-316. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0041-1>

- Jaishankar, J. & Srivastava, P., (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
- Johnson, C.N., Bowers, J.C., Griffitt, K.J., Molina, V., Clostio, R.W., Pei, S., Laws, E., Paranjpye, R.N., Strom, M.S., Nur, A.C., Hasan, A., Huq, A., Noriega, N.F., Grimes, D.J., & Colwell, R.R., (2012). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (20), 7249-7257. <https://doi.org/10.1128/AEM.01296-12>
- Johnson, B.K., Scholz, M.B., Teal, T.K., & Abramovitch, R.B., (2016) SPARTA: Simple Program for Automated reference-based bacterial RNA-seq Transcriptome Analysis. *BMC Bioinformatics*. 4 (17): 66. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0923-y>.
- Jung, Y.C., Lee, M.A., & Lee, K.H., (2019). Role of Flagellin-Homologous Proteins in Biofilm Formation by Pathogenic *Vibrio* Species. *mBio*, 10 (4): e01793-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01793-19>.
- Kang, I.B., Kim, D.H., Jeong, D., Park, J.H., & Seo, K.H., (2018), Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis under prolonged exposure to acid-salt combined stress and subsequent refrigeration. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.011>.
- Karunasagar, I., Rivera, I., Joseph, B., Kennedy, B., Shetty, V.R., Huq, A., Karunasagar, I., & Colwell, R.R., (2003). *ompU* genes in non-toxicogenic *Vibrio cholerae* associated with aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 95 (2), 338-343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01984.x>.



- Kaysner, C.A. & DePaola, A., (2004). Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 9 *Vibrio* Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>.
- Koralage, M.S.G., Alter, T., Pichpol, D., Strauch, E., Zessin, K.H., & Hueh, S., (2012). Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the north-western province of Sri Lanka, *Journal of Food Protection*, 75 (10), 1846–1850. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-115>
- Kundukad, A., Udayakumar, G., Grela, E., Kaur, D., Rice, S.A., & Kjelleberg, S., (2020). Weak acids as an alternative anti-microbial therapy, *Biofilm*, 2, 100019. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100019>
- Leon-Robles, A., Acedo-Félix, E., Gómez-Gil, B., Quiñones-Ramírez, E.I., Nevárez-Martínez, M., & L. Noriega-Orozco, (2013). Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico, *Journal of Water and Health*, 11 (4), 700-712. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.160>
- Lee, K.J., Kim, J.A., Hwang, W., Park, S.J., & Lee K.H., (2013), Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum sensing in *Vibrio vulnificus*, *Molecular microbiology*, 90 (4), 841-857. <https://doi.org/10.1111/mmi.12401>
- Liu, M., Zhu, X., Zhang, C. & Zhao, Z., (2021)., LuxQ-LuxU-LuxO pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbiological Research*, 250,126791. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126791>
- Liu, R., Chen, H., Zhang, R., Zhou, Z., Hou, Z., Gao, D., Zhang, H., & Wang, L., (2016), Linsheng Song 4Comparative transcriptome analysis of *Vibrio splendidus* JZ6 reveals the mechanism of its pathogenicity at low

temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (7), 2050-2061. <https://doi.org/10.1128/AEM.03486-15>

Liu, Z., Stirling, F.R., & Zhu, J., (2007). Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infection and Immunity*, 75 (1),122-126. <https://doi.org/10.1128/IAI.01190-06>

Lopatek, M., Wieczorek, K., & Osek, J., (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland, *Journal of Food Protection*, 78 (5), 1029-103. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-437>.

López, A.L., Manjarrez, G., Herrera, L., Monetes, A., Olascuaga, Y., & Ortega, R., (2011). Asilamiento de *Vibrio* spp, en ostras (*Crassostrea rhizophorea*) capturadas en la Ciénaga de la Virgen, *Ciencia Actual*, 1 (1), 25-29.

Mac Eachein, D., Mc Cullough, J., Duchin, J., Tran, M., MacDonald, K., Marfin, A., Jones, J., Newton, A., Tarr, C., Talkington, D., Mintz, E., Barzilay, E.J., Kay, M. & Cartwright, E., (2010). *Vibrio mimicus* infection from consuming crayfish, Spokane, Washington, June 2010, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59 (42), Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5942a5.htm#:~:text=On%20June%2024%2C%202010%2C%20the,the%20environmental%20and%20epidemiologic%20investigation>.

Marrero-Domínguez, K & Fando-Calzada, R., (2011). Formación de biopelículas por *Vibrio cholerae*, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42 (2), p. 69-80.

Marínez-Urtaza, J., Baker-Austin, C., Jones, J.L., Newton, A.E., Gonzalez-Aviles, G.D. & DePaola, A., (2013). Spread of Pacific Northwest *Vibrio parahaemolyticus* strain. *New England Journal of Medicine*, 369 (16), 1573–1574. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1305535>

- Meibom, K.L., Li, X.B., Nielsen, A.T., Wu, C.Y., Roseman, S., & Schoolnik, G.K., (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101 (8), 2524-2529. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Merino-Guzman, G., Cedillo-Ramirez, L., Silva-Andrade, F., Muñoz-Garcia, A., & Castañeda Roldan, E.I., (2010). Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas a diferentes condiciones de pH y temperatura, analizadas por microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica, *Revista mexicana de micología*, 33, 1-8.
- Merrell, D.S., Bailey, C., Kaper, J.B., & Camilli, A., (2001). The ToxR-Mediated Organic Acid Tolerance Response of *Vibrio cholerae* Requires OmpU. *Journal of Bacteriology*, 183 (9), 2746–2754. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2746-2754.2001>
- Mewborn, L., Benitez, J.A., & Silva, A.J., (2017). Flagellar motility, extracellular proteases and *Vibrio cholerae* detachment from abiotic and biotic surface, *Microbial Pathogenesis*, 113, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.016>.
- Miller, M.B., & Bassler, B.L., (2001), Quorum sensing in bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., & Bassler, B.L., (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*, *Cell*, 110 (3), p. 303-314. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00829-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00829-2).
- Mizan, F.R., Jahid, I.K. & Ha, S.D., (2015). Microbial biofilms in seafood: a food hygiene challenge, *Food microbiology*, 49, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>

- Mizan, F.R., Jahid, I.K., Kima, M., Ki-Hoon, L., Tae Jo, K., & Sang-Do, H., (2016). Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation, *Biofouling*, 32 (4), 497–509. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1149571>.
- Moorthy, S., & Watnick, P.I., (2005), Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development, *Molecular microbiology*, 57 (6), 1623-1635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04797.x>.
- Mourin, M., Wai, A., O'Neil, J., Hausner, G., & Dibrov, P. (2019). Physiological, structural, and functional analysis of the paralogous cation–proton antiporters of NhaP Type from *Vibrio cholerae*, *International Journal of Molecular Science*, 20 (10), 2572; <https://doi.org/10.3390/ijms20102572>
- Müller, J., Miller, M.C., Nielsen, A.T.m Schoolnik, G.K. & Spormann, A.M., (2007). vpsA and LuxO independent biofilms of *Vibrio cholerae*, *FEMS Microbiology Letters*, 275 (2), 199-206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00884.x>.
- Muñoz, D., Graü de Marin, C., Marval, H. & Martinez, C., (2012). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, Estado Sucre, Venezuela, *Revista científica*, XXII (5), 459-467.
- Nguyen, J., Fernandez, V., Pontrelli, S., Sauer, U., Ackermann, M., & Stocker, R., (2021). A distinct growth physiology enhances bacterial growth under rapid nutrient fluctuations, *Nature Communications*, 12, 3662. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23439-8>

- Nové, M., Kincses, A., Molnár, J., Amaral, L., & Spengler, G., (2020). The role of efflux pumps and environmental pH in bacterial multidrug resistance. *in vivo*, 34 (1), 65-71, <https://doi.org/10.21873/invivo.11746>
- Obaidat, M.M., Bani Salaman, A.E., & Roess, A.A., (2017). Virulence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafood from three developing countries and of worldwide environmental, Seafood, and Clinical Isolates from 2000 to 2017, *Journal of Food Protection*, 80 (12), 2060–2067. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-156>
- Oh, E.G., Son K.T., Yu, H., Lee, T.S., Lee, H.J., Shin, S., Kwon, J.Y., Park, K., & Ki, J., (2011). Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007, *Journal of Food Protection*, 74 (3), 380–386. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-307>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases, Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. ISBN: 978 92 4 156516 5, p- 72-85.
- Pan, J., Zhang, Y., Jin, D., Ding, G., Luo, Y., Zhang, J., Mei, L., & Zhu, M., (2013). Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio vulnificus* in retail shrimps in Hangzhou, People's Republic of China, *Journal of Food Protection*, 76 (12), 2063–2068. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-161>.
- Qian, H., Li, W., Guo, L., Tan, L., Liu, H., Wang, J., Pan, Y., & Zhao, Y., (2020). Stress response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* biofilms to different modified atmospheres. *Frontiers of Microbiology*, 11, 23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00023>.
- Quiñones-Ramírez, E.I., Bonifaciob, I.N., Betancourt-Ruleb, M., Ramirez-Vives, F. & Vázquez-Salina, C., (2010). Putative virulence factors identified in *Vibrio vulnificus* strains isolated from oysters and seawater in Mexico,

*International Journal of Environmental Health Research*, 20 (6), p. 395-405. <https://doi.org/10.1080/09603123.2010.491856>

Ringgaard, S., Hubbard, T., Mandlik, A., Davis, B.M., & Waldor, M.K., (2015). RpoS and quorum sensing control expression and polar localization of *Vibrio cholerae* chemotaxis cluster III proteins *in vitro* and *in vivo*, *Molecular microbiology*, 97 (4), p. 660-675. <https://doi.org/10.1111/mmi.13053>

Rodgers, C., Parveen, S., Chigbu, P., Jacobs, J., Rhodes, M., & Harter-Dennis, (2014). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* in blue crabs (*Callinectes sapidus*), seawater and sediments of the Maryland Coastal Bays. *Journal of Applied Microbiology*, 117 (4), 1198–1209. <https://doi.org/10.1111/jam.12608>.

Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez-Gómez, E., Rivas-Montaño, A.M., & Cortés-Ruiz, J.A., (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias*. 2, 282–292. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.02.04.06>

Reguera G, Kolter R., 2005, Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *Journal of Bacteriology*, 187 (10), p. 3551-3555.

Rodrigues, L., Ramos, J., Couto, I., Amaral, L., & Viveiros, M., (2011), Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiology*, 11, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-35>

Romling, U, & Amikam, D., (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (2), p. 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.010>

- Ryall, B., Eydallin, G., & Ferenci, T., (2012). Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (3), 597–625. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>.
- Sabatini, S., Piccioni, M., Felicetti, T., De Marco, S., Manfroni, G., Pagiotti, R., Nocchetti, M., Cecchetti, V., & Pietrella, D., (2017). Investigation on the effect of known potent *S. aureus* NorA efflux pump inhibitors on the staphylococcal biofilm formation. *RSC Advances*, 7, 37007. <https://doi.org/10.1039/C7RA03859C>
- Sadat, A., El-Sherbiny, H., Zakaria, A., Ramadan, H., & Awad, A., (2021). Prevalence, antibiogram and virulence characterization of *Vibrio* isolates from fish and shellfish in Egypt: a possible zoonotic hazard to humans. *Journal of Applied Microbiology*, 131 (1), 485-4980. <https://doi.org/10.1111/jam.14929>
- Saier, M.H., & Paulsen, I.T., (2001). Phylogeny of multidrug transporters, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12 (3), 205-213. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0246>.
- Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), (2010). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Disponible en: [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pesca/Pesquero2010/Anuario2010.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pesca/Pesquero2010/Anuario2010.pdf) Fecha de consulta: Marzo 2019.
- Secretaria de Salud (SSA), (2020). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750> Fecha de consulta: Marzo 2020.

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2010). Atlas agroalimentario 2012- 2018. Disponible en: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018) Fecha de consulta: Marzo 2019.

Shi, L., Shin-Ichi, M., Kewei, B., Masami, N., Mieko, H., Ken-Ichi, T., & Sumio, S., (2000). Presence of hemolysin genes (*vmh*, *tdh* and *hly*) in isolates of *Vibrio mimicus* determined by polymerase chain reaction, *Journal of health science*, 46 (1), 63-65. <https://doi.org/10.1248/jhs.46.63>

Silva, A.J, & Benitez, J.A., (2016). *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>

Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A. & Domingues, F.C., 2011, Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry, *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1479–1486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034157-0>

Silva, Y., Rodríguez, B.L., Campos, J., Martínez, E., Marrero, K., Suzarte, E., Ledón, T., Moreno, A., & Fando, R., (2003). Análisis de la expresión de las pilinas TCP y MSHA de *Vibrio cholerae* en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36 (1).

Sousa-Guedes, J.P., & Souza E.L., (2018). Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. *Food Microbiology*, 76, 564-571. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.020>

Sperling, L., Alter, T., & Huehn, S., (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail and farm shrimps in Ecuador, *Journal of*



*Food Protection*, 78 (11), 2089–2092. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-160>

Spector, M.P., & Kenyon, W.J., (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45 (2), 455-481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>.

Stewart, G.C., (2005), Taking shape: control of bacterial cell wall biosynthesis, *Molecular Microbiology*, 57 (5), 1177-1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04760.x>

Stratford, M., Nebe-von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Ueckert, J., & Archer, D.B., (2013). Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology*, 161 (3), 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.013>

Swenson, G. J., Stochastic, J., Bolander, F. F., & Long, R. A., (2012). Acid stress response in environmental and clinical strains of enteric bacteria. *Frontiers in Biology*. 7 (6), 495-505. <https://doi.org/10.1007/s11515-012-1191-5>

Taylor, D.L., Bina, X.R., & Bina, J.E., (2012), *Vibrio cholerae vexH* encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS ONE*, 7 (5), e38208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038208>

Tan, L., Zhao, F., Han, Q., Zhao, A., Malakar, P.K., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y., (2018). High correlation between structure development and chemical variation during biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01881>

Townsley, L. & Yildiz, F.H., (2015). Temperature affects c-di-GMP signaling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*, *Environmental Microbiology* 17 (11), 4290– 4305. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12799>.

- Townsley, L., Sison Mangus, M.P., Mehic, S., & Yildiz, F.H., (2016). Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton, *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (14), 4441-4452. <https://doi.org/10.1128/AEM.00807-16>.
- Trček, J., Mira, N.P., & Jarboe, L.R., (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (15), 6215–6229. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6762-3>
- Urakawa, H., & Rivera, I.N.G., (2006). Aquatic environment. In the biology of vibrios, Ed. Thompson, F.L., Austin, B. and Swings, J. Washington, DC: ASM Press, p. 175–189.
- Velázquez, R. J., León. S. N., Flores, V. H., Villafaña, R. S. & Canizalez, R. A., (2012). Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, present in the coastal environment of northwest México with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010, *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (6), 1794-1803. <https://doi.org/10.1128/AEM.06953-11>
- Vincent, H.A., Henderson, C.A., Stone, C.M., Cary, P.D., Gowers, D.M., Sobott, F., Taylor, J.E., & Callaghan, A.J., (2012). The low-resolution solution structure of *Vibrio cholerae* Hfq in complex with Qrr1 sRNA. *Nucleic Acids Research*, 40 (17), 8698–8710 <https://doi.org/10.1093/nar/gks582>
- Vinothkumar, K., Bhardwaj, A.K., Ramamurthy, T., & Niyogi, S.K., (2013). Triplex PCR, for the rapid identification of 3 major *Vibrio* species, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio fluvialis*, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 76 (4), 526-528. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.005>
- Wang, L., Spira, B., Zhou, Z., Feng, L., Maharjan, R.P., Li, X., Li, F., McKenzie, C., Reeves, P.R., & Ferenci, T., (2010). Divergence involving global

- regulatory gene mutations in an *Escherichia coli* population evolving under phosphate limitation. *Genome Biology Evolution*, 2, 478–487. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq03>
- Wang, H., Ayala, J.C., Benitez, J.A., & Silva, A.J., (2014). The LuxR-Type regulator VpsT negatively controls the transcription of *rpoS*, encoding the general stress response regulator, in *Vibrio cholerae* biofilms, *Journal of Bacteriology*, 196 (5), 1020–1030. <https://doi.org/10.1128/JB.00993-13>
- Wang, D., Flint, S.H., Palmer, J.S., Gagic, D., Fletcher, G.C., & On, S.L.W. (2022). Global expansion of *Vibrio parahaemolyticus* threatens the seafood industry: Perspective on controlling its biofilm formation, *LWT-Food Science and Technology*, 158, 113182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113182>
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., & Bassler, B.L., (2008). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*, *Journal of Bacteriology*, 190 (7), 2527-2536. <https://doi.org/10.1128/JB.01756-07>
- Watnick, P.I., & Kolter, R., (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm, *Molecular Microbiology*, 34 (3), 586-595. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
- Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, M.A., & Wu, X., (2014). Multiplex PCR assays for detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae*, with an internal amplification control, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79 (2), 115-118. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.012>
- Whitin, R.C., & Golden, H., (2002). Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *International Journal of Food Microbiology*, 75 (1), 127-133. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00003-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00003-x)

- Xu, T., Cao, H., Zhu, W., Wang, M., Du, Y., Yin, Z., Chen, M., Liu, Y., Yang, B., & Liu, B., (2018). RNA-seq-based monitoring of gene expression changes of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae* induced by cold seawater. *Environmental Microbiology Reports*, 10 (5), 594-604. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12685>
- Yang, M., Frey, E.M., Liu, Z., Bishar, R., & Zhu, J., (2010). The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. *Infection and Immunology*, 78 (2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00429-09>
- Yildiz, F.H., & Schoolnik, G.K., (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (7), 4028-4033. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>.
- Yildiz, F.H., & Schoolnik, G.K., (1999). Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*, *Journal of bacteriology*, 180 (4), 773-784 <https://doi.org/10.1128/JB.180.4.773-784.1998>
- Yildiz, F.H., Dolganov, N.A., & Schoolnik, G.K., (2001). VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Journal of Bacteriology*, 183 (5), 1716-1726. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001>.
- Yildiz, H., & Visick, K.L., (2008). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different, *Trends in microbiology*, 17 (3), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>.
- Yildiz, F., Fong, J., Sadovskaya, I., Grard, T., & Vinogradov, E., (2014). Structural characterization of the extracellular polysaccharide from *Vibrio cholerae*

O1 El-Tor, *PLoS One*, 9 (1), e86751.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086751>

Young, E.C., Baumgartner, J.T., Karatan, E., & Kuhn, M.L., (2021) A mutagenic screen reveals NspS residues important for regulation of *Vibrio cholerae* biofilm formation, *Microbiology (Reading)*, 167 (3), 001023.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001023>.

Yousef, A.E., & Juneja, V.K., (2003). Microbial stress adaptation, and food safety, CRC Press LLC. USA.

Zavala-Norzagaray, A.A., Aguirre, A.A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quiñonez, C.P., Hernández-Díaz, L.J., & Canizalez-Roman, A., (2015). Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico, *Frontiers in Microbiology*, 6, 635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00635>

Zhu, J., & Mekalanos, J.J., (2003). Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*, *Development Cell*, 5 (4), 647-656.  
[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00295-8](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00295-8).

Zhu, Z., Chen, H., Zhou, H., Jing, H., Yan, M., Zai, S., Cai, J., Hu, Y., & Kan, B. (2015). Analysis of twin-arginine translocation system gene homology and transcription in *Vibrio* species. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 49(2), 116-21. Chinese. PMID: 26081394.

## 10. ANEXO I

Tabla 19. Listado de cepas de *Vibrio* aisladas de alimentos y superficies.

Código asignado a la cepa	Origen de aislamiento de la cepa
<i>Vibrio alginolyticus</i>	
VA1	Filete de pescado
VA2	Almeja
VA3	Camarón
VA4	Pulpo
VA5	Pulpo
VA6	Camarón
VA7	Ostión
VA8	Coctel ostión
VA9	Camarón
VA10	Pulpo
VA11	Camarón
VA12	Filete de pescado
VA13	Ostión
VA14	Filete de pescado
VA15	Filete de pescado
VA16	Ostión
VA17	Superficie
VA18	Ostión
VA19	Ostión
VA20	Almeja
VA21	Superficie
VA22	Superficie
VA23	Coctel ostión
VA24	Coctel ostión
VA25	Coctel ostión
<i>Vibrio cholerae</i>	

VC1	Filete de pescado
VC2	Camarón
VC3	Ostión
VC4	Camarón
VC5	Ostión
VC6	Camarón
VC7	Coctel ostión
<i>Vibrio mimicus</i>	
VM1	Camarón
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
VP1	Ostión
VP2	Almeja
VP3	Filete de pescado
VP4	Ostión
VP5	Ostión
VP6	Ostión
<i>Vibrio vulnificus</i>	
VV1	Almeja
VV2	Filete de pescado
VV3	Coctel de ostión
VV4	Almeja
VV5	Ostión
VV6	Ostión
VV7	Almeja
VV8	Ostión
VV9	Ostión
VV10	Camarón
VV11	Ostión
VV12	Ostión

## 11. ANEXO II

Tabla 20. Poblaciones cuantificadas en placa, DO 600 nm e IFB de cepas de *Vibrio* spp. aisladas de alimentos de origen marino y superficies de contacto con alimentos.

Código de cepa <sup>1</sup>	Población (UFC/mL) <sup>2</sup>		DO 600 nm <sup>3</sup>			IFB		
	Inicial	Final	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
VA01	3.44 ± 0.05	8.89 ± 0.09	1.49 ± 0.15	1.16 ± 0.31	1.04 ± 0.09	0.34 ± 0.38	0.51 ± 0.30	0.17 ± 0.40
VA02	3.55 ± 0.20	9.07 ± 0.11	1.62 ± 0.35	1.77 ± 0.30	1.82 ± 0.24	0.06 ± 0.45	0.16 ± 0.43	0.17 ± 0.37
VA03	2.89 ± 0.30	9.22 ± 0.70	1.22 ± 0.05	1.26 ± 0.25	1.11 ± 0.21	0.30 ± 0.33	0.26 ± 0.26	0.35 ± 0.35
VA04	2.84 ± 0.50	9.00 ± 0.52	1.51 ± 0.22	1.20 ± 0.22	0.96 ± 0.17	0.14 ± 0.43	0.27 ± 0.35	0.22 ± 0.41
VA05	2.32 ± 0.40	9.40 ± 0.89	1.06 ± 0.08	1.31 ± 0.23	1.02 ± 0.22	0.24 ± 0.43	0.16 ± 0.42	0.16 ± 0.39
VA06	3.18 ± 0.15	9.18 ± 0.29	1.10 ± 0.11	1.14 ± 0.27	1.43 ± 0.15	0.38 ± 0.40	0.29 ± 0.30	0.25 ± 0.29
VA07	3.45 ± 0.05	8.94 ± 0.10	1.37 ± 0.07	1.14 ± 0.14	0.65 ± 0.54	0.38 ± 0.35	0.32 ± 0.38	0.05 ± 0.50
VA08	3.08 ± 0.10	9.16 ± 0.43	1.44 ± 0.12	1.50 ± 0.22	1.40 ± 0.16	0.13 ± 0.43	0.15 ± 0.41	0.21 ± 0.40
VA09	3.17 ± 0.25	8.30 ± 0.57	1.23 ± 0.12	1.27 ± 0.18	1.02 ± 0.29	0.07 ± 0.45	0.34 ± 0.40	0.12 ± 0.44
VA10	3.47 ± 0.10	8.57 ± 0.06	1.24 ± 0.06	1.40 ± 0.07	1.33 ± 0.18	0.05 ± 0.47	0.34 ± 0.45	0.21 ± 0.40
VA11	3.39 ± 0.15	9.52 ± 0.35	1.16 ± 0.47	1.34 ± 0.23	1.30 ± 0.28	1.16 ± 0.96	0.20 ± 0.37	0.12 ± 0.45
VA12	3.49 ± 0.05	8.99 ± 0.15	1.55 ± 0.11	1.40 ± 0.37	1.09 ± 0.21	0.45 ± 0.34	0.46 ± 0.21	0.56 ± 0.18
VA13	3.39 ± 0.20	8.52 ± 0.17	1.06 ± 0.36	1.25 ± 0.28	1.25 ± 0.22	0.32 ± 0.32	0.53 ± 0.48	1.09 ± 0.15
VA14	3.36 ± 0.30	9.11 ± 0.37	0.98 ± 0.81	0.77 ± 0.63	0.72 ± 0.58	0.78 ± 0.44	0.14 ± 0.22	0.27 ± 0.78
VA15	3.53 ± 0.10	9.24 ± 0.21	1.49 ± 0.17	1.23 ± 0.36	0.98 ± 0.08	0.26 ± 0.39	0.27 ± 0.32	0.15 ± 0.42
VA16	2.99 ± 0.20	8.89 ± 0.42	1.54 ± 0.32	1.49 ± 0.25	0.83 ± 0.70	0.06 ± 0.45	0.27 ± 0.36	0.06 ± 0.48
VA17	2.96 ± 0.30	9.28 ± 0.80	0.87 ± 0.09	0.86 ± 0.43	1.09 ± 0.49	0.20 ± 0.35	0.40 ± 0.35	0.43 ± 0.28
VA18	3.09 ± 0.20	9.29 ± 0.62	0.47 ± 0.63	0.43 ± 0.65	0.44 ± 0.69	0.00 ± 0.49	0.00 ± 0.49	2.28 ± 0.48
VA19	3.14 ± 0.42	9.01 ± 0.42	1.28 ± 0.07	1.40 ± 0.10	1.45 ± 0.07	0.32 ± 0.37	0.23 ± 0.37	0.33 ± 0.34
VA20	3.27 ± 0.20	8.91 ± 0.60	1.36 ± 0.11	1.59 ± 0.23	1.54 ± 0.19	0.58 ± 0.53	0.39 ± 0.29	0.35 ± 0.34
VA21	3.38 ± 0.05	9.03 ± 0.19	0.87 ± 0.72	0.74 ± 0.60	0.65 ± 0.52	2.56 ± 0.47	1.08 ± 0.51	0.43 ± 0.50
VA22	2.89 ± 0.10	9.08 ± 0.80	1.09 ± 0.02	1.23 ± 0.25	1.08 ± 0.30	0.06 ± 0.45	0.84 ± 0.25	0.70 ± 0.41



VA23	3.11 ± 0.10	8.39 ± 0.38	1.09 ± 0.32	1.35 ± 0.21	1.35 ± 0.41	0.43 ± 0.26	0.06 ± 0.49	0.24 ± 0.39
VA24	3.38 ± 0.1	8.92 ± 0.09	1.21 ± 0.18	1.21 ± 0.16	1.23 ± 0.26	0.29 ± 0.43	0.13 ± 0.44	0.58 ± 0.51
VA25	3.69 ± 0.20	8.41 ± 0.07	1.31 ± 0.19	1.49 ± 0.12	1.44 ± 0.24	0.07 ± 0.48	0.06 ± 0.48	0.12 ± 0.45
VC01	3.12 ± 0.10	8.65 ± 0.21	1.11 ± 0.25	1.44 ± 0.32	1.53 ± 0.30	0.50 ± 0.42	0.61 ± 0.40	0.99 ± 0.25
VC02	3.12 ± 0.15	8.82 ± 0.24	1.16 ± 0.14	1.50 ± 0.30	1.56 ± 0.17	0.30 ± 0.39	0.16 ± 0.42	0.10 ± 0.46
VC03	3.13 ± 0.20	8.00 ± 0.40	0.82 ± 0.32	1.09 ± 0.19	1.20 ± 0.15	0.17 ± 0.40	0.63 ± 0.19	1.17 ± 0.18
VC04	3.19 ± 0.15	8.65 ± 0.45	1.20 ± 0.56	1.34 ± 0.25	1.24 ± 0.33	0.63 ± 0.38	0.38 ± 0.28	0.45 ± 0.25
VC05	3.04 ± 0.09	9.06 ± 0.49	1.26 ± 0.13	1.42 ± 0.17	1.51 ± 0.15	0.12 ± 0.43	0.23 ± 0.36	0.37 ± 0.33
VC06	3.16 ± 0.15	8.70 ± 0.49	1.23 ± 0.09	1.65 ± 0.05	1.61 ± 0.01	0.92 ± 0.26	0.58 ± 0.06	0.99 ± 0.39
VC07	3.20 ± 0.10	8.39 ± 0.22	1.36 ± 0.32	1.31 ± 0.26	1.35 ± 0.37	0.20 ± 0.43	0.17 ± 0.41	0.41 ± 0.47
VM01	3.18 ± 0.35	9.20 ± 0.58	0.98 ± 0.20	1.37 ± 0.24	1.18 ± 0.23	0.56 ± 0.31	0.51 ± 0.23	1.00 ± 0.44
VP01	4.71 ± 0.40	9.09 ± 0.74	1.87 ± 0.26	1.81 ± 0.17	1.81 ± 0.11	0.54 ± 0.48	0.20 ± 0.45	0.15 ± 0.46
VP02	3.61 ± 0.02	8.93 ± 0.04	1.35 ± 0.13	1.29 ± 0.19	1.27 ± 0.16	0.29 ± 0.49	0.24 ± 0.36	0.17 ± 0.40
VP03	3.49 ± 0.10	8.95 ± 0.12	1.62 ± 0.30	1.74 ± 0.19	1.15 ± 0.95	0.29 ± 0.48	0.18 ± 0.47	1.00 ± 0.20
VP04	3.00 ± 0.09	8.77 ± 0.36	1.30 ± 0.64	0.93 ± 0.88	0.90 ± 0.74	0.23 ± 0.41	0.15 ± 0.47	0.43 ± 0.50
VP05	3.39 ± 0.10	9.47 ± 0.08	1.39 ± 0.57	1.32 ± 0.59	1.29 ± 0.51	0.28 ± 0.34	0.21 ± 0.42	0.06 ± 0.45
VP06	3.22 ± 0.15	9.44 ± 0.11	1.02 ± 0.84	0.90 ± 0.75	0.52 ± 0.81	0.43 ± 0.60	1.85 ± 0.26	1.31 ± 0.46
VV01	3.49 ± 0.05	8.56 ± 0.08	1.25 ± 0.18	1.53 ± 0.28	1.51 ± 0.35	0.65 ± 0.16	1.24 ± 0.77	0.96 ± 0.27
VV02	3.49 ± 0.09	8.51 ± 0.03	1.27 ± 0.11	1.53 ± 0.47	1.55 ± 0.26	0.25 ± 0.37	0.25 ± 0.34	0.18 ± 0.41
VV03	3.62 ± 0.10	8.90 ± 0.27	1.21 ± 0.32	1.46 ± 0.22	1.40 ± 0.12	0.00 ± 0.50	0.08 ± 0.47	0.20 ± 0.41
VV04	3.67 ± 0.05	8.97 ± 0.03	1.50 ± 0.22	1.56 ± 0.22	1.59 ± 0.08	1.12 ± 0.48	0.06 ± 0.47	0.15 ± 0.43
VV05	3.66 ± 0.05	8.95 ± 0.02	0.90 ± 0.56	0.68 ± 0.10	0.49 ± 0.40	0.70 ± 0.54	0.16 ± 0.28	0.51 ± 0.70
VV06	2.56 ± 0.10	8.56 ± 0.22	1.34 ± 0.50	1.47 ± 0.14	1.12 ± 0.48	0.07 ± 0.47	0.01 ± 0.50	0.10 ± 0.46
VV07	3.18 ± 0.12	9.10 ± 0.22	1.11 ± 0.94	1.15 ± 0.97	1.13 ± 0.94	1.55 ± 0.66	0.11 ± 0.34	0.00 ± 0.53
VV08	3.54 ± 0.02	8.98 ± 0.01	1.26 ± 0.52	1.04 ± 0.63	0.98 ± 0.64	0.19 ± 0.34	0.04 ± 0.36	0.45 ± 0.44
VV09	3.73 ± 0.15	8.60 ± 0.13	0.86 ± 0.70	0.94 ± 0.77	0.92 ± 0.77	0.12 ± 0.06	1.43 ± 0.44	1.03 ± 0.10
VV10	3.01 ± 0.10	8.84 ± 0.01	1.84 ± 0.27	1.77 ± 0.20	1.26 ± 0.16	0.15 ± 0.44	0.07 ± 0.47	0.12 ± 0.48
VV11	3.48 ± 0.16	9.03 ± 0.12	0.68 ± 0.16	0.66 ± 0.06	0.78 ± 0.24	0.58 ± 0.32	0.70 ± 0.03	0.45 ± 0.16
VV12	3.66 ± 0.13	9.49 ± 0.20	1.10 ± 0.29	1.27 ± 0.56	1.27 ± 0.52	0.47 ± 0.55	0.41 ± 0.49	0.22 ± 0.39

VA: *Vibrio alginolyticus*; VC: *Vibrio cholerae*; VM: *Vibrio mimicus*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*; VV: *Vibrio vulnificus*; <sup>2</sup>Los valores representan la media de

tres valores de replicas independientes; <sup>3</sup>Los valores representan la media de nueve valores de replicas independientes;

## 12. ANEXO III

Tabla 21. Poblaciones de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* posterior a la exposición a ácido cítrico cuantificadas en placa en diferentes medios selectivos y no selectivos.

Cepa	pH	Tiempo de exposición	Población (UFC/mL)			
			Medio no selectivo		Medio selectivo	
			ASTN <sup>6</sup>	ASTNP <sup>7</sup>	ASTNG <sup>8</sup>	TCBS <sup>9</sup>
VA3 <sup>2</sup>	5.5	60	6.32 ± 0.10 <sup>1</sup>	6.45 ± 0.24	6.33 ± 0.11	6.20 ± 0.05
		120	6.56 ± 0.06	6.35 ± 0.08	6.43 ± 0.23	6.08 ± 0.08
		180	5.38 ± 0.13	5.72 ± 0.11	5.62 ± 0.18	5.21 ± 0.21
	5.0	60	6.35 ± 0.11	6.23 ± 0.07	6.34 ± 0.08	6.13 ± 0.04
		120	6.16 ± 0.14	6.30 ± 0.09	6.13 ± 0.08	6.02 ± 0.05
		180	5.31 ± 0.15	5.65 ± 0.17	5.27 ± 0.16	5.44 ± 0.29
	4.5	60	5.16 ± 0.27	5.06 ± 0.07	5.53 ± 0.07	5.88 ± 0.08
		120	5.34 ± 0.21	5.36 ± 0.22	5.27 ± 0.03	5.49 ± 0.12
		180	5.09 ± 0.06	5.22 ± 0.07	5.16 ± 0.02	5.21 ± 0.15
VA11 <sup>3</sup>	5.5	60	6.33 ± 0.06	6.40 ± 0.09	6.30 ± 0.01	6.15 ± 0.09
		120	6.47 ± 0.06	6.29 ± 0.11	6.43 ± 0.11	6.01 ± 0.01
		180	6.43 ± 0.29	5.85 ± 0.15	5.94 ± 0.08	5.97 ± 0.03
	5.0	60	6.22 ± 0.10	6.35 ± 0.05	6.31 ± 0.01	6.13 ± 0.04
		120	6.14 ± 0.14	6.39 ± 0.09	6.21 ± 0.07	6.02 ± 0.05
		180	5.93 ± 0.04	5.96 ± 0.03	5.87 ± 0.05	5.44 ± 0.29
	4.5	60	5.17 ± 0.12	5.27 ± 0.03	5.56 ± 0.08	5.70 ± 0.08
		120	5.56 ± 0.09	5.46 ± 0.15	5.27 ± 0.03	5.53 ± 0.06
		180	5.24 ± 0.05	5.25 ± 0.05	5.17 ± 0.03	5.30 ± 0.02
VCO <sup>4</sup>	5.5	60	5.78 ± 0.03	5.42 ± 0.07	5.64 ± 0.05	5.55 ± 0.08
		120	5.57 ± 0.05	5.80 ± 0.05	5.62 ± 0.04	5.71 ± 0.02
		180	5.90 ± 0.03	5.87 ± 0.04	5.84 ± 0.05	5.84 ± 0.02
	5.0	60	5.85 ± 0.01	5.80 ± 0.02	5.65 ± 0.07	5.66 ± 0.01
		120	5.45 ± 0.08	5.88 ± 0.03	5.62 ± 0.03	5.74 ± 0.07
		180	5.71 ± 0.06	5.82 ± 0.06	5.77 ± 0.02	5.63 ± 0.07
	4.5	60	5.53 ± 0.11	5.80 ± 0.05	5.57 ± 0.11	5.66 ± 0.05
		120	5.61 ± 0.15	5.47 ± 0.05	5.34 ± 0.08	5.28 ± 0.02
		180	4.26 ± 0.45	4.43 ± 0.23	4.47 ± 0.40	4.10 ± 0.17
VC6 <sup>5</sup>	5.5	60	5.58 ± 0.25	5.41 ± 0.13	5.59 ± 0.06	5.71 ± 0.03
		120	5.87 ± 0.03	5.91 ± 0.05	5.71 ± 0.07	5.56 ± 0.06
		180	5.65 ± 0.07	5.86 ± 0.04	5.79 ± 0.04	5.66 ± 0.05
	5.0	60	5.73 ± 0.06	5.83 ± 0.01	5.68 ± 0.02	5.67 ± 0.03
		120	5.40 ± 0.08	5.76 ± 0.06	5.82 ± 0.02	5.62 ± 0.13
		180	5.59 ± 0.21	5.75 ± 0.07	5.64 ± 0.09	5.53 ± 0.07

4.5	60	5.52 ± 0.02	5.67 ± 0.03	5.43 ± 0.02	5.50 ± 0.02
	120	5.05 ± 0.05	5.59 ± 0.03	5.38 ± 0.13	5.15 ± 0.14
	180	5.23 ± 0.08	5.30 ± 0.19	5.18 ± 0.03	5.11 ± 0.10

<sup>1</sup>Los valores representan la media de nueve valores de replicas independientes;  
<sup>2,3</sup>*V. alginolyticus*; <sup>4,5</sup>*V. cholerae*; <sup>6</sup>Agar soya tripticaseína adicionado con 2.5% NaCl: ASTN; <sup>7</sup>ASTN suplementado con 0.1 % de piruvato de sodio; <sup>8</sup>ASTN suplementado con 1 % de glucosa; <sup>9</sup>Agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa.

### 13. ANEXO IV

Tabla 22. Porcentaje de células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* teñidas con yoduro de propidio después de la exposición a ácido cítrico.

pH	Tiempo de exposición	Células teñidas (%)							
		<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>			
		VA3		VA11		VCO		VC6	
		Fase de cultivo							
		L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>	L	E	L	E	L	E
5.5	60	5.79 ± 0.34	74.06 ± 0.44	4.81 ± 0.49	70.22 ± 0.21	15.23 ± 0.13	86.10 ± 0.33	5.38 ± 0.18	90.66 ± 0.03
	120	4.88 ± 0.45	81.43 ± 0.29	6.18 ± 0.16	80.12 ± 0.27	10.76 ± 0.23	81.59 ± 0.25	5.73 ± 0.01	92.40 ± 0.21
	180	4.14 ± 0.13	76.56 ± 0.35	6.33 ± 0.08	71.72 ± 0.61	6.64 ± 0.23	86.75 ± 0.30	7.37 ± 0.07	94.73 ± 0.33
5.0	60	4.26 ± 0.29	81.14 ± 0.53	5.02 ± 0.42	69.66 ± 2.43	18.10 ± 0.04	85.72 ± 0.32	8.16 ± 0.14	93.15 ± 0.06
	120	6.44 ± 0.27	80.51 ± 0.44	8.81 ± 0.63	78.91 ± 0.45	14.81 ± 2.13	78.71 ± 0.40	5.92 ± 0.12	92.94 ± 0.21
	180	15.09 ± 0.68	81.36 ± 0.54	31.40 ± 3.94	75.98 ± 0.66	9.86 ± 0.38	83.89 ± 0.59	7.80 ± 0.08	95.54 ± 0.62
4.5	60	7.67 ± 0.45	74.18 ± 0.56	4.16 ± 0.18	76.49 ± 0.50	9.84 ± 0.37	83.40 ± 1.63	11.54 ± 0.11	88.58 ± 0.62
	120	6.80 ± 0.30	81.68 ± 3.24	13.53 ± 0.62	79.44 ± 0.60	12.81 ± 0.16	79.65 ± 0.46	6.19 ± 0.04	97.00 ± 0.18
	180	12.37 ± 0.36	74.26 ± 0.81	7.85 ± 0.19	82.64 ± 0.68	13.97 ± 0.53	90.24 ± 0.40	8.40 ± 0.10	99.03 ± 0.27

<sup>1</sup>Los valores representan la media de dos valores de replicas independientes; <sup>2</sup>Fase Logarítmica; <sup>3</sup>Fase Estacionaria.

## 14. ANEXO V

Tabla 23. Porcentaje de células de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* teñidas con bromuro de etidio después de la exposición a ácido cítrico.

pH	Tiempo de exposición	Células teñidas (%)							
		<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>			
		VA3		VA11		VCO		VC6	
		Fase de cultivo							
		L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>	L	E	L	E	L	E
5.5	60	35.79 ± 4.32	83.32 ± 0.46	13.15 ± 0.49	86.45 ± 0.45	21.49 ± 1.45	92.99 ± 0.25	11.22 ± 0.54	91.24 ± 0.20
	120	18.97 ± 1.34	82.95 ± 0.48	33.11 ± 1.73	78.25 ± 0.57	15.57 ± 0.81	83.09 ± 1.19	6.19 ± 0.22	97.03 ± 0.18
	180	17.68 ± 1.29	94.79 ± 0.23	33.61 ± 4.71	84.75 ± 0.27	31.30 ± 0.35	84.62 ± 0.25	10.80 ± 0.10	83.60 ± 0.23
5.0	60	36.70 ± 4.24	77.59 ± 0.61	33.90 ± 1.53	80.01 ± 0.64	21.01 ± 3.23	88.23 ± 0.35	11.50 ± 0.32	99.11 ± 0.05
	120	20.14 ± 0.86	71.98 ± 0.62	32.96 ± 1.90	85.18 ± 0.63	24.68 ± 0.76	82.73 ± 0.77	6.40 ± 0.28	92.87 ± 0.18
	180	26.68 ± 2.04	68.20 ± 0.78	13.99 ± 0.32	83.82 ± 0.52	37.51 ± 0.38	81.95 ± 0.47	8.50 ± 0.05	80.06 ± 0.58
4.5	60	32.09 ± 2.58	80.12 ± 0.62	32.85 ± 2.35	84.09 ± 0.64	25.20 ± 3.40	88.89 ± 0.45	11.01 ± 0.54	94.62 ± 0.47
	120	23.35 ± 1.29	78.73 ± 0.69	20.39 ± 1.29	83.16 ± 0.41	21.98 ± 0.28	96.61 ± 0.36	7.67 ± 0.17	93.22 ± 0.25
	180	13.40 ± 0.78	76.94 ± 0.63	8.40 ± 0.25	71.10 ± 0.23	29.86 ± 0.23	84.23 ± 2.83	11.14 ± 0.13	96.67 ± 0.34

<sup>1</sup>Los valores representan la media de dos valores de replicas independientes; <sup>2</sup>Fase Logarítmica; <sup>3</sup>Fase Estacionaria.

## 15. ANEXO VI

Tabla 24. Tiempo de detección de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* posterior a la exposición a ácido cítrico.

pH	Tiempo de exposición	Tiempo de detección (h)							
		<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>			
		VA3		VA11		VCO		VC6	
		Fase de cultivo							
		L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>	L	E	L	E	L	E
5.5	60	6.70 ± 0.23	8.11 ± 0.52	7.00 ± 0.31	8.55 ± 0.26	7.82 ± 0.21	8.64 ± 0.18	7.14 ± 0.83	7.66 ± 0.16
	120	5.80 ± 0.17	7.04 ± 0.54	6.62 ± 0.23	7.66 ± 0.41	6.82 ± 0.43	7.15 ± 0.64	6.40 ± 1.01	6.97 ± 0.55
	180	5.35 ± 0.22	5.92 ± 0.36	6.14 ± 0.22	6.67 ± 0.24	5.72 ± 0.33	6.16 ± 0.45	5.67 ± 0.60	5.94 ± 0.64
5.0	60	6.88 ± 0.37	8.18 ± 0.39	7.05 ± 0.29	8.65 ± 0.41	7.83 ± 0.25	8.53 ± 0.25	7.76 ± 0.63	7.88 ± 0.22
	120	6.24 ± 0.14	6.99 ± 0.67	6.86 ± 0.21	7.82 ± 0.65	7.35 ± 0.51	8.01 ± 0.36	6.81 ± 1.21	7.12 ± 0.58
	180	5.40 ± 0.43	6.54 ± 0.31	6.38 ± 0.24	7.25 ± 0.52	6.30 ± 0.42	6.98 ± 0.47	5.41 ± 0.72	6.23 ± 0.32
4.5	60	7.22 ± 0.33	8.73 ± 0.78	7.30 ± 0.46	8.35 ± 0.44	8.94 ± 0.47	8.58 ± 0.80	8.71 ± 0.63	7.91 ± 0.18
	120	7.20 ± 0.16	8.25 ± 0.48	7.13 ± 0.45	7.97 ± 0.22	9.43 ± 0.24	9.00 ± 0.63	6.95 ± 0.54	7.72 ± 0.45
	180	6.27 ± 0.38	8.42 ± 1.18	6.56 ± 0.22	7.16 ± 0.21	8.85 ± 0.83	11.80 ± 1.20	6.09 ± 0.35	6.46 ± 0.35

<sup>1</sup>Los valores representan la media de nueve valores de replicas independientes; <sup>2</sup>Fase Logarítmica; <sup>3</sup>Fase Estacionaria.

## 16. ANEXO VII

Tabla 24. Velocidad máxima de desarrollo de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* posterior a la exposición a ácido cítrico.

pH	Tiempo de exposición	Velocidad máxima de desarrollo (DO <sub>600</sub> /h)							
		<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>			
		VA3		VA11		VCO		VC6	
		Fase de cultivo							
		L <sup>2</sup>	E <sup>3</sup>	L	E	L	E	L	E
5.5	60	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01
	120	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
	180	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
5.0	60	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01
	120	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02
	180	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01
4.5	60	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.06	0.14 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01
	120	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
	180	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.06	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01

<sup>1</sup>Los valores representan la media de nueve valores de replicas independientes; <sup>2</sup>Fase Logarítmica; <sup>3</sup>Fase Estacionaria.



## 17. ANEXO VIII

Tabla 26. Poblaciones de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* al inicio y al finalizar la formación de biopelículas posterior a la exposición a ácido cítrico.

Cepa	Fase de cultivo	Tiempo de exposición	Población (UFC/mL) <sup>1</sup>							
			Inicial				Final			
			pH							
			7.0	5.5	5.0	4.5	7.0	5.5	5.0	4.5
VA3 <sup>2</sup>	Logarítmica	60	4.99 ± 0.36	4.80 ± 0.17	4.78 ± 0.09	4.85 ± 0.30	8.11 ± 0.60	8.22 ± 0.30	8.00 ± 0.80	8.14 ± 0.20
		120	4.79 ± 0.24	4.69 ± 0.15	4.57 ± 0.11	4.56 ± 0.02	8.34 ± 0.20	8.21 ± 0.02	8.17 ± 0.18	8.36 ± 0.07
		180	4.89 ± 0.15	4.00 ± 0.30	4.58 ± 0.20	4.71 ± 0.30	7.99 ± 0.40	7.87 ± 0.30	7.97 ± 0.20	7.80 ± 0.12
	Estacionaria	60	4.48 ± 0.30	4.87 ± 0.20	4.99 ± 0.30	4.79 ± 0.25	8.11 ± 0.20	8.22 ± 0.25	8.00 ± 0.20	8.14 ± 0.20
		120	4.36 ± 0.17	4.36 ± 0.21	4.57 ± 0.21	4.44 ± 0.14	8.34 ± 0.20	8.21 ± 0.14	8.17 ± 0.30	8.36 ± 0.60
		180	4.28 ± 0.25	4.12 ± 0.33	4.35 ± 0.33	4.30 ± 0.20	7.99 ± 0.30	7.87 ± 0.20	7.97 ± 0.40	7.80 ± 0.30
VA11 <sup>3</sup>	Logarítmica	60	5.00 ±	4.99 ±	4.87 ±	4.56 ±	8.14 ±	8.13 ±	8.25 ±	8.15 ±

			0.20	0.15	0.15	0.10	0.17	0.10	0.30	0.40
		120	4.79 ± 0.30	4.36 ± 0.05	4.57 ± 0.25	4.36 ± 0.20	8.50 ± 0.10	8.01 ± 0.20	8.14 ± 0.40	8.10 ± 0.19
		180	4.28 ± 0.25	4.00 ± 0.20	4.58 ± 0.20	4.30 ± 0.09	8.25 ± 0.20	8.22 ± 0.09	8.36 ± 0.20	8.41 ± 0.15
	Estacionaria	60	4.99 ± 0.02	4.79 ± 0.10	4.48 ± 0.30	4.87 ± 0.15	8.14 ± 0.14	8.13 ± 0.15	8.25 ± 0.20	8.15 ± 0.20
		120	4.57 ± 0.20	4.44 ± 0.20	4.36 ± 0.70	4.36 ± 0.05	8.50 ± 0.20	8.01 ± 0.05	8.14 ± 0.60	8.10 ± 0.20
		180	4.35 ± 0.35	4.30 ± 0.09	4.28 ± 0.50	4.12 ± 0.20	8.25 ± 0.40	8.22 ± 0.20	8.36 ± 0.40	8.41 ± 0.30
VCO <sup>4</sup>	Logarítmica	60	4.53 ± 0.02	4.78 ± 0.12	4.85 ± 0.20	4.53 ± 0.36	8.14 ± 0.02	8.13 ± 0.36	8.25 ± 0.02	8.15 ± 0.30
		120	4.34 ± 0.20	4.57 ± 0.15	4.45 ± 0.30	4.6 ± 0.24	8.50 ± 0.10	8.01 ± 0.24	8.14 ± 0.20	8.10 ± 0.10
		180	4.45 ± 0.35	4.90 ± 0.18	4.71 ± 0.25	3.26 ± 0.15	8.25 ± 0.20	8.22 ± 0.15	8.36 ± 0.20	8.41 ± 0.50
	Estacionaria	60	4.54 ± 0.17	4.30 ± 0.02	4.02 ± 0.02	4.70 ± 0.30	8.14 ± 0.20	8.13 ± 0.30	8.25 ± 0.14	8.15 ± 0.30
		120	4.40 ± 0.20	4.65 ± 0.20	4.25 ± 0.20	4.50 ± 0.17	8.50 ± 0.30	8.01 ± 0.17	8.14 ± 0.30	8.10 ± 0.50
		180	4.45 ± 0.25	4.80 ± 0.35	4.60 ± 0.35	4.00 ± 0.25	8.25 ± 0.20	8.22 ± 0.25	8.36 ± 0.40	8.41 ± 0.20
VC6 <sup>5</sup>	Logarítmica	60	4.36 ± 0.40	4.53 ± 0.02	4.78 ± 0.12	4.85 ± 0.20	8.11 ± 0.40	8.22 ± 0.20	8.00 ± 0.36	8.14 ± 0.20
		120	4.34 ± 0.30	4.61 ± 0.20	4.57 ± 0.15	3.99 ± 0.30	8.34 ± 0.10	8.21 ± 0.30	8.17 ± 0.24	8.36 ± 0.60
		180	4.50 ± 0.18	3.89 ± 0.35	4.90 ± 0.18	4.71 ± 0.25	7.99 ± 0.02	7.87 ± 0.25	7.97 ± 0.15	7.80 ± 0.02

Estacionaria	60	4.45 ± 0.25	4.80 ± 0.17	4.60 ± 0.02	4.00 ± 0.02	8.11 ± 0.30	8.22 ± 0.02	8.00 ± 0.30	8.14 ± 0.03
	120	4.54 ± 0.34	4.30 ± 0.20	4.02 ± 0.20	4.70 ± 0.20	8.34 ± 0.20	8.21 ± 0.20	8.17 ± 0.17	8.36 ± 0.20
	180	4.40 ± 0.17	4.65 ± 0.25	4.25 ± 0.35	4.50 ± 0.35	7.99 ± 0.50	7.87 ± 0.35	7.97 ± 0.25	7.80 ± 0.30

<sup>1</sup>Los valores representan la media de tres valores de replicas independientes; <sup>2,3</sup>*V. alginolyticus*; <sup>4,5</sup>*V. cholerae*.

## 18. ANEXO IX

Tabla 27. Poblaciones de *V. alginolyticus* y *V. cholerae* al inicio y al finalizar la formación de biopelículas y tasa de formación de biopelículas que fueron formadas a pH 5.5.

Fase de cultivo	Cepa	Población (UFC/mL) <sup>1</sup>		Tasa de formación de biopelículas <sup>1</sup>
		Inicial	Final	
Logarítmica	VA3 <sup>2</sup>	4.48 ± 0.30	7.62 ± 0.08	0.05 ± 0.04
	VA11 <sup>3</sup>	4.99 ± 0.02	7.92 ± 0.04	0.09 ± 0.05
	VCO <sup>4</sup>	4.54 ± 0.17	7.57 ± 0.28	0.03 ± 0.01
	VC6 <sup>5</sup>	4.45 ± 0.25	7.37 ± 0.31	0.01 ± 0.01
Estacionaria	VA3 <sup>2</sup>	4.99 ± 0.36	7.62 ± 0.08	0.02 ± 0.02
	VA11 <sup>3</sup>	5.00 ± 0.20	7.92 ± 0.04	0.02 ± 0.02
	VCO <sup>4</sup>	4.53 ± 0.02	7.63 ± 0.40	0.06 ± 0.03
	VC6 <sup>5</sup>	4.36 ± 0.40	6.88 ± 0.13	0.02 ± 0.03

<sup>1</sup>Los valores representan la media de tres valores de replicas independientes; <sup>2,3</sup>*V. alginolyticus*; <sup>4,5</sup>*V. cholerae*.

## 19. ANEXO X

Tabla 28. Genes inducidos y reprimidos en las diferentes etapas de formación de biopelículas por *V. cholerae* (VC6) en condiciones óptimas y de estrés ácido

Comparación	Genes inducidos				Genes reprimidos			
	Gen	Log FC	Valor p	FDR	Gen	Log FC	Valor p	FDR
Células planctónicas en condiciones óptimas vs Biopelículas formadas en medio óptimo	<i>mdh</i>	0.95258108	0.02133301	0.03284975	<i>rpsI</i>	-0.9761938	0.01835658	0.02847279
	<i>csrD</i>	0.99567595	0.01620702	0.02523071	<i>lexA</i>	-1.06560484	0.01017354	0.01619384
	<i>rsmA</i>	0.99815439	0.01594068	0.02499923	<i>rplL</i>	-1.0889061	0.00866932	0.01390363
	<i>rpoB</i>	1.01711097	0.01407738	0.02215883	<i>rsmD</i>	-1.1425781	0.0059398	0.00959853
	<i>ssrA</i>	1.03420493	0.01257029	0.01986012	<i>ftsY</i>	-1.25324461	0.00261195	0.00430263
	<i>sltY</i>	1.05024383	0.01130036	0.01792035	<i>gap</i>	-1.27490047	0.00220958	0.00365398
	<i>infB</i>	1.06846799	0.00998552	0.01595431	<i>rplD</i>	-1.32517768	0.0014862	0.00247699
	<i>lysS</i>	1.11862358	0.00704926	0.01134824	<i>secY</i>	-1.32720829	0.00146224	0.00244665
	<i>vpsR</i>	1.18431807	0.00438955	0.00712046	<i>acpP</i>	-1.34013683	0.00131792	0.0022139
	<i>nusA</i>	1.23376723	0.00303428	0.00495988	<i>rplR</i>	-1.35210701	0.00119623	0.00201746
	<i>uvrA</i>	1.29261801	0.00192494	0.0031957	<i>plsB</i>	-1.36394677	0.00108629	0.00183933
	<i>fadB</i>	1.63023598	0.00010578	0.00018425	<i>lysA</i>	-1.40496175	0.00077406	0.0013159
	<i>atpC</i>	1.64412828	9.2914E-05	0.0001625	<i>ubiB</i>	-1.40660972	0.00076347	0.00130312
	<i>ilvG</i>	1.64830714	8.9345E-05	0.00015691	<i>polA</i>	-1.40687024	0.00076181	0.00130312
	<i>atpA</i>	1.64915287	8.8639E-05	0.00015631	<i>glpG</i>	-1.41444379	0.00071498	0.00123023
	<i>atpB</i>	1.64919119	8.8607E-05	0.00015631	<i>rmuC</i>	-1.42915421	0.00063164	0.00109124
	<i>ilvD</i>	1.64937985	8.845E-05	0.00015631	<i>rpsG</i>	-1.56391625	0.00019433	0.0003371
	<i>atpG</i>	1.65104766	8.7076E-05	0.00015549	<i>rpsA</i>	-1.69893024	5.5304E-05	0.00010264
	<i>recF</i>	1.65117961	8.6968E-05	0.00015549	<i>rplC</i>	-1.71376848	4.7929E-05	8.9341E-05
	<i>yidC</i>	1.65189667	8.6384E-05	0.00015549	<i>rplO</i>	-1.74156031	3.6602E-05	6.8529E-05
	<i>glyQ</i>	1.65191148	8.6372E-05	0.00015549	<i>rpoA</i>	-1.77161995	2.725E-05	5.1245E-05
	<i>ilvM</i>	1.65235596	8.6012E-05	0.00015549	<i>rpsN</i>	-1.8307902	1.509E-05	2.8503E-05
	<i>glmU</i>	1.65268577	8.5746E-05	0.00015549	<i>rpsD</i>	-1.86517685	1.0637E-05	2.0181E-05
<i>ccoG</i>	1.65332577	8.5231E-05	0.00015549	<i>rpsE</i>	-1.86899703	1.0229E-05	1.9494E-05	

<i>mnmG</i>	1.65369931	8.4933E-05	0.00015549	<i>rplQ</i>	-1.8731268	9.8045E-06	1.877E-05
<i>glyS</i>	1.65390033	8.4772E-05	0.00015549	<i>rplJ</i>	-1.94692259	4.5502E-06	8.7901E-06
<i>rplI</i>	2.20660276	2.6144E-07	5.3164E-07	<i>rpmJ</i>	-1.94841956	4.4789E-06	8.6919E-06
<i>coaA</i>	3.32820594	1.192E-13	2.6249E-13	<i>rpsM</i>	-1.95594141	4.1369E-06	8.0651E-06
<i>hflK</i>	3.94636536	1.235E-17	2.7772E-17	<i>plsX</i>	-2.00134309	2.5503E-06	4.9949E-06
<i>priB</i>	5.24991777	1.1244E-26	2.8616E-26	<i>rplU</i>	-2.05393802	1.4427E-06	2.8386E-06
<i>tusC</i>	5.50437864	1.6691E-28	4.2993E-28	<i>rplM</i>	-2.07549814	1.139E-06	2.2515E-06
<i>hemE</i>	5.6110757	2.8288E-29	7.3307E-29	<i>rpsH</i>	-2.10301799	8.4038E-07	1.669E-06
<i>gpmM</i>	5.64240717	1.678E-29	4.3752E-29	<i>nusB</i>	-2.15392726	4.7557E-07	9.4891E-07
<i>zur</i>	5.9532854	9.2205E-32	2.419E-31	<i>rplF</i>	-2.17924303	3.5714E-07	7.1596E-07
<i>hfq</i>	6.1062541	7.0294E-33	1.8556E-32	<i>rplB</i>	-2.18153942	3.4794E-07	7.0083E-07
<i>tusB</i>	6.4879897	1.1057E-35	2.9554E-35	<i>rplE</i>	-2.20326552	2.7161E-07	5.4969E-07
<i>mutL</i>	6.52270334	6.1354E-36	1.6503E-35	<i>rplN</i>	-2.2361111	1.8623E-07	3.8052E-07
<i>nusG</i>	6.86152048	1.9277E-38	5.2184E-38	<i>rpsK</i>	-2.24429815	1.6942E-07	3.4784E-07
<i>bfr</i>	6.87775474	1.4617E-38	3.9823E-38	<i>rplP</i>	-2.2865254	1.0364E-07	2.1486E-07
<i>hscA</i>	16.6067079	8.7501E-64	2.4628E-63	<i>ribE</i>	-2.61049987	1.9906E-09	4.1675E-09
<i>nfsA</i>	17.422301	6.5552E-70	1.9082E-69	<i>rplT</i>	-2.72920919	4.3414E-10	9.2719E-10
<i>toxS</i>	18.0178837	2.1883E-74	6.4141E-74	<i>rpsU</i>	-2.73652045	3.9472E-10	8.4725E-10
<i>tssJ</i>	18.370289	4.9038E-77	1.4473E-76	<i>rpsS</i>	-2.84919394	8.9715E-11	1.9453E-10
<i>vpsU</i>	18.3989788	2.9831E-77	8.8659E-77	<i>rpmD</i>	-2.93618198	2.7982E-11	6.0985E-11
<i>phoR</i>	18.4718091	8.4518E-78	2.5296E-77	<i>eno</i>	-3.19494377	7.901E-13	1.7309E-12
<i>mutS</i>	19.9790439	3.8842E-89	1.2998E-88	<i>rpsC</i>	-3.46727039	1.5978E-14	3.5368E-14
<i>ribF</i>	19.9893842	3.2468E-89	1.0951E-88	<i>rplW</i>	-3.47893275	1.3479E-14	2.9993E-14
<i>pnp</i>	20.023433	1.8002E-89	6.1207E-89	<i>sucA</i>	-3.91698109	1.935E-17	4.3283E-17
<i>dacB</i>	20.0640561	8.9053E-90	3.0522E-89	<i>hslO</i>	-3.96867582	8.7745E-18	1.9836E-17
<i>ileS</i>	20.143804	2.237E-90	7.7928E-90	<i>rplM</i>	-4.09277128	1.2962E-18	2.9459E-18
<i>oadA</i>	20.1680515	1.4696E-90	5.1617E-90	<i>rplX</i>	-4.12893198	7.3977E-19	1.6903E-18
<i>folA</i>	20.2679555	2.6031E-91	9.2969E-91	<i>aceF</i>	-4.22945541	1.5437E-19	3.5463E-19

<i>ispH</i>	20.2915595	1.7295E-91	6.2291E-91	<i>rplV</i>	-4.23781756	1.3543E-19	3.1281E-19
<i>recX</i>	20.2939304	1.6599E-91	6.0295E-91	<i>gspK</i>	-4.2684235	8.3834E-20	1.947E-19
<i>lptD</i>	20.3354883	8.0793E-92	2.9601E-91	<i>glnG</i>	-4.29531513	5.4958E-20	1.2834E-19
<i>lgt</i>	20.3517662	6.0938E-92	2.2521E-91	<i>thiB</i>	-4.30796386	4.5046E-20	1.0577E-19
<i>rraB</i>	20.3529626	5.9695E-92	2.2255E-91	<i>gspF</i>	-4.3646685	1.8431E-20	4.3519E-20
<i>rsmE</i>	20.4751331	7.1886E-93	2.7353E-92	<i>thiQ</i>	-4.47113456	3.4126E-21	8.1026E-21
<i>truB</i>	20.6088794	7.084E-94	2.737E-93	<i>pckA</i>	-4.47505445	3.2065E-21	7.6559E-21
<i>mreD</i>	21.0458589	3.6492E-97	1.4228E-96	<i>gspD</i>	-4.48110205	2.9125E-21	6.9933E-21
<i>mutH</i>	22.6313241	4.279E-109	1.748E-108	<i>crcB</i>	-4.49249624	2.4307E-21	5.8696E-21
<i>gcvT</i>	22.8777224	5.985E-111	2.469E-110	<i>sucD</i>	-4.50106223	2.12E-21	5.1485E-21
<i>lspA</i>	24.011783	1.748E-119	7.43E-119	<i>greB</i>	-4.50730814	1.9193E-21	4.6879E-21
<i>recB</i>	24.3801904	2.952E-122	1.267E-121	<i>recG</i>	-4.50794833	1.8998E-21	4.6671E-21
<i>rne</i>	24.3806713	2.927E-122	1.267E-121	<i>gspE</i>	-4.50918003	1.8629E-21	4.6031E-21
<i>ubiH</i>	24.3843337	2.747E-122	1.204E-121	<i>spoT</i>	-4.51166963	1.7905E-21	4.4499E-21
<i>bamA</i>	24.3876149	2.595E-122	1.149E-121	<i>pulA</i>	-4.51182615	1.786E-21	4.4499E-21
<i>aspA</i>	24.3879641	2.58E-122	1.149E-121	<i>envZ</i>	-4.5153311	1.689E-21	4.2475E-21
<i>dapB</i>	24.3903526	2.475E-122	1.119E-121	<i>secA</i>	-4.51619452	1.6659E-21	4.2144E-21
<i>bioH</i>	24.3906105	2.464E-122	1.119E-121	<i>add</i>	-5.37839483	1.3476E-27	3.4502E-27
<i>typA</i>	24.39622	2.236E-122	1.033E-121	<i>thiC</i>	-6.18210169	1.9576E-33	5.1999E-33
<i>gspC</i>	24.3969879	2.206E-122	1.03E-121	<i>rtxA</i>	-13.5779426	7.83E-40	2.1469E-39
<i>nfuA</i>	24.4053331	1.909E-122	9.016E-122	<i>vpsO</i>	-15.7143593	1.087E-55	2.9998E-55
<i>argE</i>	24.4082704	1.815E-122	8.665E-122	<i>ligA</i>	-15.9913043	9.1888E-58	2.5524E-57
<i>recJ</i>	24.4109893	1.731E-122	8.36E-122	<i>tgt</i>	-16.6719739	7.2676E-63	2.032E-62
<i>yacG</i>	24.4158541	1.591E-122	7.773E-122	<i>citG</i>	-17.084639	5.8138E-66	1.6472E-65
<i>glnA</i>	24.421769	1.436E-122	7.097E-122	<i>trmJ</i>	-17.3110042	1.1602E-67	3.3092E-67
<i>cobA</i>	24.4447762	9.639E-123	4.82E-122	<i>citE</i>	-17.4304311	1.4694E-68	4.2194E-68
<i>hscB</i>	24.4542346	8.182E-123	4.14E-122	<i>cmoA</i>	-17.5186272	3.1983E-69	9.2467E-69
<i>ftsE</i>	24.491705	4.274E-123	2.189E-122	<i>mshL</i>	-19.032869	1.3219E-80	3.9846E-80



<i>hemC</i>	24.4947239	4.056E-123	2.102E-122	<i>murJ</i>	-19.0394776	1.1788E-80	3.5785E-80
<i>ftsX</i>	24.498908	3.773E-123	1.98E-122	<i>recA</i>	-19.1596982	1.4698E-81	4.494E-81
<i>asnC</i>	24.5057551	3.351E-123	1.78E-122	<i>prfC</i>	-19.2479385	3.1888E-82	9.8206E-82
<i>tatB</i>	24.5115729	3.029E-123	1.63E-122	<i>alaS</i>	-19.4015564	2.229E-83	6.9147E-83
<i>hemN</i>	24.5127508	2.968E-123	1.617E-122	<i>birA</i>	-19.4298564	1.365E-83	4.2658E-83
<i>thiS</i>	24.513219	2.944E-123	1.617E-122	<i>mltC</i>	-19.4750557	6.2396E-84	1.9643E-83
<i>rhtB</i>	24.5135895	2.925E-123	1.617E-122	<i>miaA</i>	-19.4809504	5.6343E-84	1.787E-83
<i>tatC</i>	24.5433035	1.748E-123	9.906E-123	<i>mreC</i>	-19.5402718	2.0166E-84	6.4441E-84
<i>rpoH</i>	24.8549377	7.894E-126	4.596E-125	<i>guaB</i>	-19.7706128	3.7307E-86	1.2012E-85
<i>nudC</i>	26.496462	3.497E-138	2.519E-137	<i>rplA</i>	-19.8018758	2.1708E-86	7.0428E-86
<i>hflX</i>	26.4978794	3.412E-138	2.5E-137	<i>orn</i>	-19.8908309	4.6488E-87	1.5198E-86
<i>fkpA</i>	26.5027549	3.135E-138	2.338E-137	<i>argR</i>	-19.9791689	1.0064E-87	3.3156E-87
<i>rpsF</i>	26.5032407	3.109E-138	2.338E-137	<i>queG</i>	-20.0893455	1.4922E-88	4.9546E-88
<i>hflC</i>	26.5166524	2.464E-138	1.904E-137	<i>pssA</i>	-20.2792127	5.5639E-90	1.9225E-89
<i>rrf</i>	27.7827011	7.307E-148	8.173E-147	<i>djlA</i>	-20.3620614	1.3244E-90	4.6906E-90
<i>waaA</i>	28.3112799	7.688E-152	9.901E-151	<i>pgi</i>	-20.5787004	3.1046E-92	1.1677E-91
<i>rfbA</i>	28.3154873	7.147E-152	9.493E-151	<i>secD</i>	-20.6629828	7.2082E-93	2.7353E-92
<i>rfbD</i>	28.3162636	7.052E-152	9.493E-151	<i>dusA</i>	-21.3257516	7.4269E-98	2.9226E-97
<i>murP</i>	28.3183205	6.805E-152	9.493E-151	<i>citF</i>	-21.7424766	5.432E-101	2.158E-100
<i>pyrE</i>	28.3185167	6.782E-152	9.493E-151	<i>lysC</i>	-22.0086559	5.394E-103	2.163E-102
<i>cadC</i>	28.3186504	6.766E-152	9.493E-151	<i>rluB</i>	-22.2754295	5.302E-105	2.146E-104
<i>fhuA</i>	28.3187171	6.758E-152	9.493E-151	<i>thiF</i>	-25.6488248	2.176E-130	1.33E-129
<i>murQ</i>	28.3187479	6.755E-152	9.493E-151	<i>uspB</i>	-25.910909	2.319E-132	1.449E-131
<i>coaD</i>	28.3207156	6.528E-152	9.493E-151	<i>hemB</i>	-25.9144971	2.179E-132	1.382E-131
<i>rffA</i>	28.3220972	6.374E-152	9.493E-151	<i>dinF</i>	-25.9251834	1.811E-132	1.166E-131
<i>recQ</i>	28.3221452	6.369E-152	9.493E-151	<i>fabR</i>	-25.9579096	1.027E-132	6.716E-132
<i>rho</i>	28.3301275	5.546E-152	9.493E-151	<i>sthA</i>	-25.972104	8.031E-133	5.333E-132
<i>gyrB</i>	28.6020622	4.983E-154	1.008E-152	<i>trmA</i>	-25.9986088	5.074E-133	3.423E-132

<i>ilvE</i>	28.6040828	4.811E-154	1.008E-152	<i>yihA</i>	-26.0016608	4.812E-133	3.299E-132
<i>cytR</i>	30.7675336	2.516E-170	1.069E-167	<i>rpsR</i>	-26.6695837	4.526E-138	3.206E-137
				<i>trkA</i>	-26.9493595	3.55E-140	2.794E-139
				<i>atpE</i>	-26.9528852	3.34E-140	2.678E-139
				<i>yidD</i>	-26.9533977	3.31E-140	2.678E-139
				<i>ubiD</i>	-27.5280174	1.568E-144	1.36E-143
				<i>prlC</i>	-27.8399223	7.049E-147	6.374E-146
				<i>fhuB</i>	-27.8401569	7.02E-147	6.374E-146
				<i>wecB</i>	-27.8402262	7.012E-147	6.374E-146
				<i>slmA</i>	-27.8413798	6.873E-147	6.374E-146
				<i>rhIB</i>	-27.8415777	6.849E-147	6.374E-146
				<i>acs</i>	-27.8419405	6.806E-147	6.374E-146
				<i>ilvY</i>	-27.8512302	5.794E-147	6.006E-146
				<i>gppA</i>	-28.0974676	8.126E-149	9.593E-148
				<i>gspL</i>	-28.8675342	1.302E-154	3.074E-153
				<i>rpmA</i>	-28.87669	1.111E-154	2.777E-153
				<i>gspJ</i>	-28.8814107	1.024E-154	2.719E-153
				<i>leuA</i>	-28.898482	7.615E-155	2.158E-153
				<i>rseP</i>	-28.8988754	7.563E-155	2.158E-153
				<i>dbpA</i>	-28.9016614	7.207E-155	2.158E-153
				<i>pilM</i>	-28.9024599	7.108E-155	2.158E-153
				<i>oxyR</i>	-28.9029047	7.053E-155	2.158E-153
				<i>pepA</i>	-28.9032304	7.013E-155	2.158E-153
				<i>thiP</i>	-28.9034953	6.981E-155	2.158E-153
				<i>gspG</i>	-28.9035782	6.971E-155	2.158E-153
				<i>cysQ</i>	-28.9035993	6.969E-155	2.158E-153
				<i>glnL</i>	-28.9120645	6.018E-155	2.158E-153
				<i>rpsJ</i>	-28.9333403	4.162E-155	2.158E-153

				<i>fliS</i>	-28.9361113	3.967E-155	2.158E-153	
Células planctónicas en condiciones óptimas vs Células planctónicas en condiciones de estrés ácido	<i>djlA</i>	1.06959655	0.00990397	0.01625168	<i>rplO</i>	-0.9407732	0.02295078	0.03680786
	<i>ppk1</i>	1.19150253	0.00417756	0.00707356	<i>fusA</i>	-1.02395302	0.01345584	0.02174423
	<i>metH</i>	1.23094062	0.00309743	0.00528678	<i>rpsS</i>	-1.03735837	0.0123086	0.02004274
	<i>hfq</i>	1.29678837	0.0018626	0.0033401	<i>mutL</i>	-1.07103167	0.00981472	0.01616766
	<i>tusB</i>	1.43008424	0.00062708	0.00118449	<i>rplC</i>	-1.08345968	0.00900168	0.01488605
	<i>ssrA</i>	1.59849044	0.00014185	0.00027527	<i>rplQ</i>	-1.09696382	0.00819789	0.01360978
	<i>uvrA</i>	1.63420216	0.00010202	0.0001998	<i>dapF</i>	-1.11136707	0.00741265	0.01237706
	<i>btsR</i>	1.76472022	2.9193E-05	5.7976E-05	<i>plsX</i>	-1.12950869	0.0065207	0.01095375
	<i>rnpB</i>	1.79506971	2.1595E-05	4.3291E-05	<i>rpmG</i>	-1.14256383	0.00594035	0.01001844
	<i>rsmA</i>	1.82418971	1.6139E-05	3.2819E-05	<i>rpsH</i>	-1.22580504	0.00321879	0.00547194
	<i>rpmI</i>	1.95705936	4.0883E-06	8.5593E-06	<i>secY</i>	-1.23997852	0.00289074	0.00495388
	<i>vpsR</i>	2.0875089	9.9915E-07	2.1555E-06	<i>ggT</i>	-1.25019259	0.00267376	0.0046006
	<i>mdh</i>	2.13749378	5.7292E-07	1.2551E-06	<i>vexA</i>	-1.25713883	0.00253489	0.00437938
	<i>infB</i>	2.22160287	2.2047E-07	4.855E-07	<i>ilvC</i>	-1.26632933	0.00236138	0.00409627
	<i>lysS</i>	2.23191953	1.9575E-07	4.3331E-07	<i>dusB</i>	-1.27705202	0.00217285	0.00378468
	<i>murJ</i>	2.31692803	7.2631E-08	1.6161E-07	<i>purD</i>	-1.2849361	0.00204323	0.00358831
	<i>sltY</i>	2.3545203	4.6504E-08	1.0457E-07	<i>rph</i>	-1.28642941	0.0020195	0.00356135
	<i>prfC</i>	2.36007004	4.3512E-08	9.8364E-08	<i>slmA</i>	-1.28846657	0.00198753	0.00351959
	<i>mshL</i>	2.5373782	4.9994E-09	1.1423E-08	<i>vexB</i>	-1.28920814	0.00197602	0.00351384
	<i>nusA</i>	2.91502352	3.7287E-11	8.7072E-11	<i>ilvY</i>	-1.28958542	0.00197018	0.00351384
<i>rluB</i>	4.18036794	3.3232E-19	8.2113E-19	<i>rep</i>	-1.29707373	0.0018576	0.0033401	
<i>gltB</i>	15.8206852	6.6757E-58	1.9433E-57	<i>prlC</i>	-1.29733767	0.00185375	0.0033401	
<i>aceB</i>	16.8780638	7.8432E-66	2.4155E-65	<i>acs</i>	-1.29982468	0.00181777	0.0033015	
<i>rapA</i>	17.1078869	1.473E-67	4.6371E-67	<i>rhIB</i>	-1.30172695	0.00179069	0.00326627	
<i>lpdA</i>	17.1915196	3.4676E-68	1.1081E-67	<i>fhuB</i>	-1.30197449	0.00178719	0.00326627	

<i>murA</i>	17.6715705	8.5731E-72	2.869E-71	<i>gorA</i>	-1.30216218	0.00178454	0.00326627
<i>cysN</i>	17.8803239	2.3103E-73	7.7928E-73	<i>wecB</i>	-1.30402437	0.00175848	0.00324936
<i>lptG</i>	17.9935595	3.2564E-74	1.1072E-73	<i>rplW</i>	-1.33238291	0.00140279	0.00260344
<i>gspH</i>	18.1004957	5.1137E-75	1.7669E-74	<i>rplN</i>	-1.3428887	0.00128896	0.00240267
<i>ubiH</i>	18.190689	1.073E-75	3.738E-75	<i>acpP</i>	-1.42044383	0.00067979	0.00127838
<i>ampD</i>	18.3375565	8.4397E-77	2.9643E-76	<i>rpsD</i>	-1.49036554	0.00037334	0.00071152
<i>fldA</i>	18.6268624	5.6317E-79	1.9946E-78	<i>rpsG</i>	-1.50123114	0.0003395	0.00065288
<i>vibH</i>	18.6521849	3.6329E-79	1.2975E-78	<i>rpsE</i>	-1.57830197	0.00017057	0.00032952
<i>hemN</i>	18.7725887	4.5147E-80	1.6261E-79	<i>miaA</i>	-1.60189356	0.00013799	0.00026901
<i>ndk</i>	18.8109665	2.3221E-80	8.435E-80	<i>rsmD</i>	-1.66269705	7.8031E-05	0.00015353
<i>ftsX</i>	18.8731598	7.9098E-81	2.9232E-80	<i>fis</i>	-1.68892935	6.0829E-05	0.00012024
<i>cobA</i>	18.9113615	4.082E-81	1.5218E-80	<i>coaA</i>	-1.77651175	2.5973E-05	5.1823E-05
<i>rpsL</i>	19.0050494	8.0564E-82	3.0847E-81	<i>tusC</i>	-1.81511024	1.7701E-05	3.5653E-05
<i>typA</i>	19.0400985	4.3904E-82	1.6963E-81	<i>rplR</i>	-1.84874048	1.2579E-05	2.5702E-05
<i>hflC</i>	19.0771176	2.3125E-82	9.0167E-82	<i>rplP</i>	-1.93417999	5.2026E-06	1.0682E-05
<i>murB</i>	19.1115352	1.2738E-82	5.0128E-82	<i>ubiE</i>	-1.93674	5.0647E-06	1.0449E-05
<i>serA</i>	19.132645	8.8374E-83	3.5102E-82	<i>rplF</i>	-1.95070171	4.3724E-06	9.0647E-06
<i>rpsF</i>	19.1437591	7.2902E-83	2.9229E-82	<i>priB</i>	-1.96399188	3.8051E-06	8.0058E-06
<i>glnA</i>	19.2372936	1.4429E-83	5.9539E-83	<i>rpsC</i>	-1.97955023	3.2198E-06	6.8081E-06
<i>gspC</i>	19.2984274	5.0039E-84	2.1267E-83	<i>rpoA</i>	-2.04239097	1.6363E-06	3.4771E-06
<i>tatA</i>	19.3327753	2.7597E-84	1.1847E-83	<i>rpmD</i>	-2.08518782	1.0237E-06	2.1973E-06
<i>phoU</i>	19.4040132	8.0353E-85	3.5206E-84	<i>lexA</i>	-2.08791823	9.9334E-07	2.1539E-06
<i>nudE</i>	19.5981058	2.7851E-86	1.2728E-85	<i>rplE</i>	-2.09915507	8.7716E-07	1.9118E-06
<i>cyaY</i>	19.6351114	1.4671E-86	6.8518E-86	<i>rpmJ</i>	-2.34833515	4.9963E-08	1.1176E-07
<i>nfuA</i>	19.7253633	3.0721E-87	1.467E-86	<i>ftsY</i>	-2.54055313	4.7966E-09	1.1019E-08
<i>tatB</i>	19.779209	1.2088E-87	5.838E-87	<i>rpsM</i>	-2.86141001	7.6257E-11	1.7614E-10
<i>ubiA</i>	19.7856566	1.0812E-87	5.2817E-87	<i>rpsK</i>	-2.86450744	7.3175E-11	1.6994E-10
<i>tatC</i>	20.0639565	8.7111E-90	4.4074E-89	<i>rplT</i>	-3.22954696	4.8524E-13	1.1457E-12

<i>uspA</i>	20.1903266	9.7556E-91	4.9954E-90	<i>rplV</i>	-3.28348654	2.2572E-13	5.3593E-13
<i>pspG</i>	20.5580538	1.6688E-93	8.756E-93	<i>nusB</i>	-3.46068465	1.7587E-14	4.1992E-14
<i>dtd</i>	20.6653908	2.5987E-94	1.3805E-93	<i>ribE</i>	-3.47023963	1.5301E-14	3.6741E-14
<i>ptsP</i>	21.3530248	1.74E-99	9.602E-99	<i>ubiB</i>	-4.05742966	2.2395E-18	5.4388E-18
<i>ribF</i>	21.3650038	1.414E-99	7.905E-99	<i>trmA</i>	-4.11560197	9.1006E-19	2.2228E-18
<i>ileS</i>	21.3930858	8.689E-100	4.924E-99	<i>sthA</i>	-4.3711549	1.6642E-20	4.1361E-20
<i>ispH</i>	21.4180017	5.643E-100	3.241E-99	<i>yihA</i>	-4.54368638	1.0749E-21	2.6872E-21
<i>folP</i>	21.4245281	5.04E-100	2.934E-99	<i>plsB</i>	-4.80150599	1.7056E-23	4.3147E-23
<i>lptD</i>	21.4456952	3.492E-100	2.061E-99	<i>hslO</i>	-5.71991448	4.6011E-30	1.178E-29
<i>dksA</i>	21.5183057	9.925E-101	5.941E-100	<i>uspB</i>	-6.0423951	2.0616E-32	5.3424E-32
<i>prfB</i>	21.5283608	8.338E-101	5.062E-100	<i>polA</i>	-6.25822225	5.4118E-34	1.4111E-33
<i>rng</i>	21.5334007	7.64E-101	4.706E-100	<i>lysA</i>	-6.26710098	4.6578E-34	1.2219E-33
<i>tldD</i>	21.5577795	5.008E-101	3.13E-100	<i>glpG</i>	-6.40692001	4.372E-35	1.1541E-34
<i>srmB</i>	21.664017	7.947E-102	5.118E-101	<i>aceF</i>	-6.50075225	8.9029E-36	2.3648E-35
<i>rpmC</i>	21.7079362	3.713E-102	2.428E-101	<i>glnL</i>	-6.64697231	7.432E-37	1.9865E-36
<i>thil</i>	21.9588612	4.802E-104	3.189E-103	<i>add</i>	-6.77182067	8.8847E-38	2.3899E-37
<i>yihI</i>	22.3377758	6.761E-107	4.561E-106	<i>fabR</i>	-6.86446808	1.8345E-38	4.9661E-38
<i>recQ</i>	26.5501046	1.348E-138	1.123E-137	<i>rtxA</i>	-13.5883449	6.4633E-40	1.7608E-39
<i>cadB</i>	26.5509294	1.329E-138	1.123E-137	<i>glnG</i>	-7.31289178	8.629E-42	2.366E-41
<i>fhuA</i>	26.5580702	1.174E-138	1.018E-137	<i>gspK</i>	-7.75645357	4.2895E-45	1.1838E-44
<i>vexR</i>	26.6301984	3.364E-139	3.177E-138	<i>rmuC</i>	-8.53414496	6.616E-51	1.8378E-50
<i>rnpA</i>	27.0954208	1.061E-142	1.288E-141	<i>gspF</i>	-8.64428561	9.8868E-52	2.7644E-51
<i>gyrB</i>	27.1369596	5.165E-143	6.457E-142	<i>rseP</i>	-8.7618088	1.3022E-52	3.6652E-52
<i>ilvA</i>	27.1376307	5.106E-143	6.457E-142	<i>rplJ</i>	-9.08870932	4.6164E-55	1.308E-54
<i>mioC</i>	27.1382356	5.052E-143	6.457E-142	<i>vpsO</i>	-15.7247623	8.8967E-56	2.5376E-55
<i>tusA</i>	27.140622	4.848E-143	6.457E-142	<i>thiP</i>	-9.22305421	4.5356E-56	1.3025E-55
				<i>ligA</i>	-16.0017073	7.506E-58	2.1701E-57
				<i>pckA</i>	-9.5267528	2.3863E-58	6.9944E-58

<i>rplX</i>	-9.93513408	2.0482E-61	6.045E-61
<i>tgt</i>	-16.682377	5.932E-63	1.763E-62
<i>gspG</i>	-10.2683789	6.4254E-64	1.9231E-63
<i>envZ</i>	-10.3056479	3.3718E-64	1.0163E-63
<i>spoT</i>	-10.4058639	5.9537E-65	1.8074E-64
<i>thiC</i>	-10.4896826	1.406E-65	4.2989E-65
<i>citG</i>	-17.0950421	4.7385E-66	1.47E-65
<i>gspD</i>	-10.6778693	5.3758E-67	1.6799E-66
<i>trmJ</i>	-17.3214073	9.4683E-68	3.003E-67
<i>citE</i>	-17.4408342	1.1994E-68	3.8619E-68
<i>gspL</i>	-10.9804106	2.8582E-69	9.2727E-69
<i>cmoA</i>	-17.5290302	2.6087E-69	8.5285E-69
<i>secA</i>	-11.020647	1.4242E-69	4.6921E-69
<i>sucD</i>	-11.2479275	2.7838E-71	9.2432E-71
<i>yegQ</i>	-18.2328969	1.3376E-74	4.5845E-74
<i>xseA</i>	-19.0330604	1.2867E-80	4.7142E-80
<i>csrD</i>	-19.1339037	2.2438E-81	8.439E-81
<i>recA</i>	-19.1701013	1.1989E-81	4.5493E-81
<i>alaS</i>	-19.4119596	1.8174E-83	7.356E-83
<i>tyrA</i>	-19.4216369	1.5369E-83	6.2808E-83
<i>birA</i>	-19.4402595	1.1133E-83	4.6386E-83
<i>mltC</i>	-19.4854588	5.0885E-84	2.1412E-83
<i>mreC</i>	-19.5506749	1.6443E-84	7.1307E-84
<i>bfr</i>	-19.6334784	3.9177E-85	1.7344E-84
<i>nusG</i>	-19.6523564	2.8254E-85	1.264E-84
<i>guaB</i>	-19.7810159	3.042E-86	1.3754E-85
<i>rplA</i>	-19.8122789	1.7701E-86	8.177E-86
<i>orn</i>	-19.901234	3.7907E-87	1.79E-86

<i>argR</i>	-19.989572	8.2068E-88	4.0557E-87
<i>queG</i>	-20.0997486	1.217E-88	6.0848E-88
<i>secD</i>	-20.6733859	5.8782E-93	3.0466E-92
<i>gpmM</i>	-20.8837824	1.535E-94	8.2582E-94
<i>dusA</i>	-21.3361548	6.0557E-98	3.2996E-97
<i>citF</i>	-21.7528798	4.429E-101	2.81E-100
<i>rpsA</i>	-22.7020173	3.19E-108	2.187E-107
<i>crcB</i>	-25.5599504	9.913E-130	7.022E-129
<i>thiF</i>	-25.6592279	1.774E-130	1.323E-129
<i>hemB</i>	-25.9249003	1.777E-132	1.373E-131
<i>dinF</i>	-25.9355865	1.477E-132	1.162E-131
<i>phoB</i>	-26.7578469	9.576E-139	8.478E-138
<i>mnmG</i>	-26.9590458	2.931E-140	2.966E-139
<i>ccoG</i>	-26.9595981	2.903E-140	2.966E-139
<i>trkA</i>	-26.9597626	2.895E-140	2.966E-139
<i>recF</i>	-26.9616774	2.8E-140	2.966E-139
<i>ilvM</i>	-26.9628031	2.746E-140	2.966E-139
<i>atpG</i>	-26.9632964	2.723E-140	2.966E-139
<i>atpB</i>	-26.9633679	2.719E-140	2.966E-139
<i>ubiD</i>	-27.5384205	1.279E-144	1.941E-143
<i>uvrD</i>	-27.8510527	5.675E-147	8.933E-146
<i>purH</i>	-27.8514014	5.641E-147	8.933E-146
<i>lpxN</i>	-27.8561979	5.191E-147	8.825E-146
<i>gppA</i>	-28.1078707	6.626E-149	1.28E-147
<i>gspJ</i>	-28.8918139	8.346E-155	1.867E-153
<i>leuA</i>	-28.9088851	6.209E-155	1.466E-153
<i>gspE</i>	-28.9098564	6.105E-155	1.466E-153
<i>dbpA</i>	-28.9120646	5.876E-155	1.466E-153

<i>pilM</i>	-28.912863	5.795E-155	1.466E-153
<i>pulA</i>	-28.9130379	5.778E-155	1.466E-153
<i>greB</i>	-28.9130606	5.776E-155	1.466E-153
<i>oxyR</i>	-28.9133078	5.751E-155	1.466E-153
<i>recG</i>	-28.9133117	5.75E-155	1.466E-153
<i>pepA</i>	-28.9136335	5.718E-155	1.466E-153
<i>cysQ</i>	-28.9140025	5.682E-155	1.466E-153
<i>thiQ</i>	-28.9140505	5.677E-155	1.466E-153
<i>thiB</i>	-28.9179265	5.309E-155	1.466E-153
<i>rpsJ</i>	-28.9437435	3.394E-155	1.466E-153
<i>eno</i>	-28.9464676	3.237E-155	1.466E-153
<i>fliS</i>	-28.9465144	3.235E-155	1.466E-153
<i>sucA</i>	-29.180115	5.647E-157	2.4E-154

Células planctónicas en condiciones de estrés ácido vs biopelículas formadas en medio acidificado

<i>rsmD</i>	1.28588164	0.0020282	0.00331533	<i>rplW</i>	-0.91734903	0.02651721	0.04098115
<i>atpC</i>	1.29134188	0.00194322	0.00318868	<i>rpoC</i>	-0.92754042	0.02491017	0.03863803
<i>fadB</i>	1.29608885	0.00187206	0.00308382	<i>tuf</i>	-0.95812236	0.02058767	0.0320504
<i>atpE</i>	1.29706482	0.00185773	0.00307212	<i>rplU</i>	-0.98121159	0.01777625	0.0277754
<i>atpD</i>	1.29723741	0.00185521	0.00307212	<i>secY</i>	-1.01123442	0.01463139	0.0230309
<i>glyQ</i>	1.29755964	0.00185051	0.00307212	<i>rplP</i>	-1.01426785	0.01434301	0.02266089
<i>glmU</i>	1.29925505	0.00182595	0.00305523	<i>rplQ</i>	-1.06962949	0.0098979	0.01569629
<i>ilvG</i>	1.30064506	0.00180604	0.00303386	<i>rplD</i>	-1.14260632	0.00593852	0.00945269
<i>glyS</i>	1.30403216	0.00175837	0.0029655	<i>rplO</i>	-1.15187047	0.00555579	0.00887673
<i>ilvD</i>	1.30412308	0.0017571	0.0029655	<i>vpsH</i>	-1.21529904	0.00352495	0.00567463
<i>yidC</i>	1.30491323	0.00174616	0.0029655	<i>rpsS</i>	-1.27752936	0.00216478	0.00351157
<i>ilvA</i>	1.30504412	0.00174435	0.0029655	<i>rpsU</i>	-1.28490204	0.00204376	0.00332797
<i>mioC</i>	1.30523143	0.00174177	0.0029655	<i>aceB</i>	-1.34079157	0.00133015	0.00232639



<i>atpA</i>	1.30876502	0.00169371	0.00291428	<i>cysI</i>	-1.37718695	0.00097448	0.00171138
<i>yidD</i>	1.43350506	0.00060878	0.00108255	<i>rnpB</i>	-1.422587	0.00066763	0.00118226
<i>rpmG</i>	1.62879444	0.00010721	0.00019725	<i>rpmD</i>	-1.44595777	0.00054761	0.00097787
<i>ggt</i>	1.85186954	1.2185E-05	2.3016E-05	<i>rpsI</i>	-1.47672765	0.00042033	0.00075375
<i>lexA</i>	1.8557738	1.171E-05	2.2218E-05	<i>rplM</i>	-1.53339894	0.0002555	0.00046012
<i>fis</i>	1.85982145	1.1236E-05	2.1413E-05	<i>rplN</i>	-1.58231424	0.00016446	0.00029869
<i>vexA</i>	1.87240491	9.8775E-06	1.891E-05	<i>rpsC</i>	-1.58449915	0.00016122	0.00029406
<i>dusB</i>	1.87888855	9.2409E-06	1.7771E-05	<i>rluB</i>	-1.58630358	0.00015859	0.00029051
<i>vexR</i>	1.88626214	8.5651E-06	1.6546E-05	<i>ppk1</i>	-1.63030463	0.00010659	0.00019696
<i>ilvC</i>	1.88753998	8.4529E-06	1.6404E-05	<i>plsX</i>	-1.69795499	5.5801E-05	0.00010356
<i>purD</i>	1.91075626	6.6454E-06	1.3015E-05	<i>rpsG</i>	-1.74803425	3.4359E-05	6.4329E-05
<i>rph</i>	1.91116627	6.6172E-06	1.3015E-05	<i>rplC</i>	-1.76169938	3.0049E-05	5.6509E-05
<i>vexB</i>	1.91357493	6.4533E-06	1.2756E-05	<i>rplL</i>	-1.90622713	6.9658E-06	1.358E-05
<i>fhuA</i>	1.92119079	5.9605E-06	1.1837E-05	<i>acpP</i>	-2.07471214	1.1489E-06	2.3819E-06
<i>rep</i>	1.92361717	5.8113E-06	1.1595E-05	<i>rplB</i>	-2.07635629	1.1283E-06	2.3506E-06
<i>gorA</i>	1.92503295	5.7259E-06	1.1479E-05	<i>rpsH</i>	-2.16318168	4.2841E-07	8.9691E-07
<i>prlC</i>	1.92566929	5.6879E-06	1.1457E-05	<i>rpmA</i>	-2.18092782	3.5037E-07	7.3716E-07
<i>acs</i>	1.92617115	5.6581E-06	1.1451E-05	<i>rpsN</i>	-2.43079606	1.8531E-08	3.9776E-08
<i>fhuB</i>	1.92810468	5.5447E-06	1.1275E-05	<i>gap</i>	-2.74513789	3.5289E-10	7.6912E-10
<i>rhlB</i>	1.92811085	5.5444E-06	1.1275E-05	<i>rpmI</i>	-3.58281062	2.9326E-15	6.8107E-15
<i>wecB</i>	1.93197634	5.3243E-06	1.0932E-05	<i>gltB</i>	-15.793852	1.0148E-57	3.0589E-57
<i>hslO</i>	2.18366525	3.3967E-07	7.1821E-07	<i>murA</i>	-17.6447369	1.3041E-71	4.1361E-71
<i>ftsY</i>	2.25221171	1.546E-07	3.3017E-07	<i>cysN</i>	-17.8534904	3.5197E-73	1.1247E-72
<i>aceF</i>	2.81168371	1.4747E-10	3.2306E-10	<i>secA</i>	-17.8607502	3.1032E-73	9.9914E-73
<i>glnL</i>	2.86809754	6.9772E-11	1.5444E-10	<i>lptG</i>	-17.9667259	4.9577E-74	1.6084E-73
<i>yihI</i>	3.25991817	3.1561E-13	7.0228E-13	<i>gspH</i>	-18.0736621	7.7822E-75	2.5442E-74
<i>rpmC</i>	3.35318615	8.3321E-14	1.9038E-13	<i>ubiH</i>	-18.1638554	1.6335E-75	5.3817E-75
<i>hflK</i>	3.40444036	3.9794E-14	9.1419E-14	<i>ampD</i>	-18.3107229	1.2845E-76	4.2649E-76

<i>glnG</i>	3.48475523	1.2385E-14	2.8607E-14	<i>fldA</i>	-18.6000288	8.5748E-79	2.8923E-78
<i>hfq</i>	3.65578774	9.941E-16	2.3214E-15	<i>vibH</i>	-18.6253513	5.5319E-79	1.8808E-78
<i>ubiB</i>	3.7405683	2.7984E-16	6.5709E-16	<i>hemN</i>	-18.7457551	6.8768E-80	2.357E-79
<i>trmA</i>	3.82317912	8.0544E-17	1.9017E-16	<i>rplX</i>	-18.9530767	1.8964E-81	6.5527E-81
<i>gspK</i>	3.94575181	1.2471E-17	2.9611E-17	<i>rpsL</i>	-18.9782158	1.227E-81	4.2744E-81
<i>tusB</i>	3.96268392	9.622E-18	2.2974E-17	<i>hflC</i>	-19.050284	3.5222E-82	1.2371E-81
<i>sthA</i>	4.06018923	2.1462E-18	5.1533E-18	<i>fabR</i>	-19.077011	2.2171E-82	7.8521E-82
<i>plsB</i>	4.49207174	2.4471E-21	5.9092E-21	<i>murB</i>	-19.0847016	1.9404E-82	6.93E-82
<i>gspF</i>	4.83555055	9.832E-24	2.3878E-23	<i>serA</i>	-19.1058114	1.346E-82	4.848E-82
<i>rseP</i>	4.86758736	5.8488E-24	1.4286E-23	<i>gspC</i>	-19.2715938	7.6213E-84	2.7684E-83
<i>pspG</i>	4.87423398	5.2497E-24	1.2897E-23	<i>tatA</i>	-19.3059417	4.2042E-84	1.5403E-83
<i>hemE</i>	4.92245526	2.398E-24	5.9254E-24	<i>phoU</i>	-19.3771796	1.224E-84	4.5235E-84
<i>zur</i>	5.00942497	5.8124E-25	1.4446E-24	<i>glpG</i>	-19.4880482	1.7935E-85	6.6863E-85
<i>nudE</i>	5.44408751	4.5433E-28	1.1358E-27	<i>cyaY</i>	-19.6082777	2.2349E-86	8.4055E-86
<i>tatC</i>	5.55476196	7.227E-29	1.8174E-28	<i>thiP</i>	-19.6640106	8.5102E-87	3.2293E-86
<i>pckA</i>	5.67717743	9.4025E-30	2.3786E-29	<i>nfuA</i>	-19.6985296	4.6799E-87	1.7918E-86
<i>uspB</i>	5.72660175	4.1174E-30	1.0478E-29	<i>tatB</i>	-19.7523753	1.8413E-87	7.114E-87
<i>ubiA</i>	5.81334743	9.647E-31	2.4699E-30	<i>uspA</i>	-20.163493	1.486E-90	5.794E-90
<i>glnA</i>	5.82043873	8.5697E-31	2.2073E-30	<i>pgi</i>	-20.556916	1.6286E-93	6.4089E-93
<i>rplJ</i>	5.92008013	1.6115E-31	4.1761E-31	<i>dtd</i>	-20.6385571	3.9586E-94	1.5723E-93
<i>polA</i>	5.94018535	1.1496E-31	2.9975E-31	<i>pssA</i>	-21.1171538	9.9145E-98	4.5801E-97
<i>lysA</i>	5.94742447	1.018E-31	2.6708E-31	<i>sltY</i>	-21.3373753	2.183E-99	1.031E-98
<i>typA</i>	6.00263345	4.0267E-32	1.0629E-31	<i>murJ</i>	-21.3399751	2.087E-99	9.967E-99
<i>cobA</i>	6.13867037	4.0743E-33	1.0822E-32	<i>folP</i>	-21.3976944	7.678E-100	3.708E-99
<i>priB</i>	6.16989605	2.4053E-33	6.4293E-33	<i>djlA</i>	-21.4152274	5.666E-100	2.768E-99
<i>tusC</i>	6.24342446	6.9511E-34	1.8698E-33	<i>yihA</i>	-21.4415439	3.591E-100	1.775E-99
<i>rpsF</i>	6.27432819	4.1234E-34	1.1162E-33	<i>dkSA</i>	-21.491472	1.512E-100	7.56E-100
<i>gspG</i>	6.40367663	4.6218E-35	1.2591E-34	<i>mg</i>	-21.5065671	1.164E-100	5.889E-100

<i>envZ</i>	6.43092389	2.9129E-35	7.987E-35	<i>tldD</i>	-21.5309458	7.629E-101	3.907E-100
<i>mutL</i>	6.49885996	9.203E-36	2.5398E-35	<i>srmB</i>	-21.6371833	1.211E-101	6.275E-101
<i>spoT</i>	6.53966159	4.6067E-36	1.2796E-35	<i>thil</i>	-21.9320276	7.316E-104	3.839E-103
<i>ftsX</i>	6.75667627	1.1509E-37	3.2179E-37	<i>rplT</i>	-22.0462543	1.011E-104	5.37E-104
<i>gspD</i>	6.80469178	5.0839E-38	1.4309E-37	<i>recQ</i>	-26.5232709	2.053E-138	2.493E-137
<i>gspL</i>	7.12144572	2.2857E-40	6.476E-40	<i>cadB</i>	-26.5240957	2.024E-138	2.493E-137
<i>sucD</i>	7.35164262	4.4531E-42	1.2702E-41	<i>slmA</i>	-26.5364827	1.633E-138	2.103E-137
<i>miaA</i>	7.52531639	2.2692E-43	6.5163E-43	<i>ilvY</i>	-26.5452142	1.404E-138	1.92E-137
<i>lpdA</i>	7.81584021	1.5503E-45	4.4822E-45	<i>rnpA</i>	-27.0685871	1.616E-142	2.454E-141
<i>rapA</i>	7.93466731	2.0113E-46	5.8549E-46	<i>gyrB</i>	-27.110126	7.87E-143	1.286E-141
<i>rmuC</i>	8.20706938	1.8527E-48	5.4304E-48	<i>tusA</i>	-27.1137883	7.386E-143	1.256E-141
<i>vpsO</i>	14.9381816	6.3634E-50	1.8781E-49				
<i>vexH</i>	15.2955517	1.3747E-52	4.0855E-52				
<i>citF</i>	15.8496277	9.9041E-57	2.9642E-56				
<i>purF</i>	16.0704363	2.2005E-58	6.68E-58				
<i>cls</i>	16.2219475	1.6122E-59	4.9292E-59				
<i>thiC</i>	10.7100662	3.0987E-67	9.543E-67				
<i>yegQ</i>	17.363855	4.3452E-68	1.348E-67				
<i>ppk2</i>	17.448829	9.9958E-69	3.1237E-68				
<i>hisG</i>	17.7776725	3.3827E-71	1.0649E-70				
<i>coaA</i>	12.0823442	1.4733E-77	4.9304E-77				
<i>alaS</i>	20.9339742	6.1573E-95	2.4687E-94				
<i>brnQ</i>	20.9468157	4.9289E-95	1.995E-94				
<i>vexE</i>	20.9541065	4.344E-95	1.7752E-94				
<i>cgtA</i>	20.9597557	3.9389E-95	1.6253E-94				
<i>rpoS</i>	20.963113	3.7164E-95	1.5485E-94				
<i>metK</i>	20.9730002	3.1313E-95	1.3176E-94				
<i>tyrA</i>	20.9833637	2.6167E-95	1.1121E-94				

<i>yjx</i>	21.0029082	1.8649E-95	8.0059E-95
<i>mreC</i>	21.0079705	1.7083E-95	7.4085E-95
<i>surA</i>	21.0146264	1.5223E-95	6.6698E-95
<i>fkpB</i>	21.0208559	1.3666E-95	6.0501E-95
<i>csrD</i>	21.1232064	2.3199E-96	1.0378E-95
<i>lgt</i>	21.2221918	4.1749E-97	1.8876E-96
<i>hemW</i>	21.2295808	3.6732E-97	1.6786E-96
<i>pheA</i>	21.4949001	3.703E-99	1.7294E-98
<i>phoB</i>	24.7647873	9.147E-124	5.325E-123
<i>aceE</i>	24.9790547	2.232E-125	1.318E-124
<i>recJ</i>	24.9796835	2.208E-125	1.318E-124
<i>carA</i>	24.9806917	2.17E-125	1.317E-124
<i>lepB</i>	24.9812876	2.148E-125	1.317E-124
<i>leuD</i>	24.9831205	2.08E-125	1.3E-124
<i>rpoE</i>	24.9835793	2.064E-125	1.3E-124
<i>pmbA</i>	25.0122924	1.255E-125	8.466E-125
<i>aroB</i>	25.0126956	1.246E-125	8.466E-125
<i>gspE</i>	25.0127326	1.245E-125	8.466E-125
<i>ompR</i>	25.0135241	1.228E-125	8.466E-125
<i>pulA</i>	25.0141013	1.216E-125	8.466E-125
<i>bioH</i>	25.0143806	1.21E-125	8.466E-125
<i>gmk</i>	25.0152252	1.193E-125	8.466E-125
<i>greB</i>	25.0161345	1.174E-125	8.466E-125
<i>recG</i>	25.0178288	1.14E-125	8.466E-125
<i>sucA</i>	25.1116017	2.245E-126	1.767E-125
<i>thiB</i>	25.1121009	2.226E-126	1.767E-125
<i>birA</i>	25.1946068	5.328E-127	4.355E-126
<i>tsaE</i>	25.3781721	2.214E-128	1.845E-127

<i>rsgA</i>	25.389134	1.831E-128	1.556E-127
<i>fkpA</i>	25.3920742	1.74E-128	1.509E-127
<i>nusG</i>	25.3998861	1.52E-128	1.345E-127
<i>dusA</i>	25.4170226	1.129E-128	1.021E-127
<i>gpmM</i>	25.4530242	6.051E-129	5.59E-128
<i>xerC</i>	25.5470292	1.187E-129	1.121E-128
<i>ftnA</i>	25.5712412	7.801E-130	7.535E-129
<i>yigB</i>	25.5781446	6.921E-130	6.841E-129
<i>hemC</i>	25.5828669	6.377E-130	6.453E-129
<i>glpE</i>	25.5843993	6.21E-130	6.438E-129
<i>hemB</i>	25.605529	4.306E-130	4.575E-129
<i>thiF</i>	25.6225894	3.204E-130	3.492E-129
<i>rpoH</i>	25.6407406	2.339E-130	2.616E-129
<i>fre</i>	28.3136152	1.794E-150	3.177E-149
<i>ubiD</i>	28.325057	1.471E-150	2.718E-149
<i>dprA</i>	28.4164799	3.017E-151	6.107E-150
<i>atpG</i>	28.4167444	3.004E-151	6.107E-150
<i>dnaN</i>	28.4168974	2.996E-151	6.107E-150
<i>mnmG</i>	28.416974	2.992E-151	6.107E-150
<i>ilvM</i>	28.4170103	2.99E-151	6.107E-150
<i>recF</i>	28.4172649	2.977E-151	6.107E-150
<i>atpB</i>	28.4179753	2.94E-151	6.107E-150
<i>murP</i>	28.4509468	1.661E-151	5.041E-150
<i>pyrE</i>	28.4512448	1.652E-151	5.041E-150
<i>cadC</i>	28.4512687	1.651E-151	5.041E-150
<i>murQ</i>	28.4514838	1.645E-151	5.041E-150
<i>uvrD</i>	28.4516472	1.641E-151	5.041E-150
<i>rfbC</i>	28.4517012	1.639E-151	5.041E-150

<i>purH</i>	28.4519719	1.631E-151	5.041E-150
<i>coaD</i>	28.4533353	1.593E-151	5.041E-150
<i>rho</i>	28.4645276	1.312E-151	5.041E-150
<i>rfaD</i>	28.5512524	2.92E-152	3.102E-150

Biopelículas formadas en medio  
óptimo vs biopelículas formadas en  
medio acidificado

<i>ftsY</i>	0.96490319	0.01972428	0.040302	<i>nusB</i>	-0.96777761	0.01936765	0.03976449
<i>csrD</i>	1.02046042	0.01377642	0.02870088	<i>rpsK</i>	-0.96809681	0.01932834	0.03976449
<i>infB</i>	1.0307091	0.01287183	0.02721655	<i>rpmJ</i>	-1.00417281	0.01532286	0.0317669
<i>plsB</i>	1.05451254	0.01096886	0.02366378	<i>rplL</i>	-1.02262208	0.01357474	0.02842001
<i>ribF</i>	1.0559959	0.01086501	0.02355933	<i>add</i>	-1.02381242	0.01346974	0.0283398
<i>tatC</i>	1.06501187	0.01021476	0.02226294	<i>priB</i>	-1.04401356	0.01177238	0.02514202
<i>lysA</i>	1.08528528	0.00888923	0.0197064	<i>gpmM</i>	-1.04633163	0.01159054	0.02487869
<i>polA</i>	1.08883337	0.00867389	0.01950478	<i>tusC</i>	-1.07606439	0.00947147	0.02074936
<i>ubiB</i>	1.08974837	0.00861912	0.0194847	<i>fusA</i>	-1.07950808	0.00925003	0.02036923
<i>rmuC</i>	1.1020788	0.00791098	0.01837249	<i>hemE</i>	-1.08506483	0.00890266	0.0197064
<i>hemC</i>	1.10457353	0.00777427	0.01815419	<i>nusG</i>	-1.08715715	0.00877492	0.01962811
<i>ftsX</i>	1.12052502	0.00694953	0.01633205	<i>fkpA</i>	-1.09425014	0.0083541	0.0189866
<i>rplW</i>	1.22920082	0.00313724	0.00766281	<i>mutL</i>	-1.09487501	0.00831792	0.0189866
<i>rpsU</i>	1.98462584	3.0502E-06	8.1021E-06	<i>tusB</i>	-1.09522154	0.00829791	0.0189866
<i>rpml</i>	2.46702002	1.1909E-08	3.2445E-08	<i>rpsF</i>	-1.09555648	0.00827862	0.0189866
<i>thiC</i>	6.40248605	4.7135E-35	1.3008E-34	<i>hflK</i>	-1.12040091	0.00695553	0.01633205
<i>coaA</i>	6.97762655	2.6602E-39	7.3895E-39	<i>zur</i>	-1.12296497	0.00683054	0.01621776
<i>vpsO</i>	14.9275828	7.7504E-50	2.1671E-49	<i>rplC</i>	-1.13139058	0.00643393	0.0153619
<i>vexH</i>	15.2849528	1.6774E-52	4.7212E-52	<i>yegQ</i>	-1.15180865	0.00557737	0.01339199
<i>aceB</i>	15.4998399	4.1685E-54	1.1811E-53	<i>hfq</i>	-1.15367799	0.00548384	0.01324223
<i>citF</i>	15.8390287	1.2103E-56	3.4521E-56	<i>rplJ</i>	-1.22170656	0.00331989	0.00806258
<i>purF</i>	16.0598373	2.6913E-58	7.7283E-58	<i>rpsH</i>	-1.28596873	0.00202679	0.00497911

<i>cls</i>	16.2113485	1.9738E-59	5.7066E-59	<i>rplI</i>	-1.40882464	0.00074944	0.00185183
<i>ppk2</i>	17.4382299	1.2255E-68	3.5919E-68	<i>cysI</i>	-1.56130443	0.00019896	0.00049741
<i>hisG</i>	17.7670734	4.1461E-71	1.2322E-70	<i>ubiE</i>	-1.65530145	8.3663E-05	0.00021291
<i>ndk</i>	19.143153	1.8674E-81	5.793E-81	<i>rpsG</i>	-1.68534914	6.2942E-05	0.00016212
<i>alaS</i>	20.923375	7.5507E-95	2.5469E-94	<i>gap</i>	-1.80435747	1.9685E-05	5.1327E-05
<i>brnQ</i>	20.9362166	6.0448E-95	2.0552E-94	<i>acpP</i>	-2.15501914	4.6976E-07	1.2636E-06
<i>vexE</i>	20.9435073	5.3274E-95	1.8259E-94	<i>phoB</i>	-2.46326862	1.2469E-08	3.3754E-08
<i>cgtA</i>	20.9491566	4.8305E-95	1.6691E-94	<i>hscA</i>	-16.5796784	1.3294E-63	3.8698E-63
<i>rpoS</i>	20.9525139	4.5577E-95	1.5877E-94	<i>nfsA</i>	-17.3952714	9.9806E-70	2.9457E-69
<i>metK</i>	20.9624011	3.8401E-95	1.3488E-94	<i>toxS</i>	-17.9908542	3.3325E-74	9.9741E-74
<i>prfB</i>	20.9790746	2.8765E-95	1.0188E-94	<i>tssJ</i>	-18.3432594	7.4678E-77	2.2509E-76
<i>ptsP</i>	20.9832509	2.6757E-95	9.5561E-95	<i>vpsU</i>	-18.3719492	4.5426E-77	1.379E-76
<i>yjx</i>	20.9923091	2.2871E-95	8.2375E-95	<i>phoR</i>	-18.4447794	1.287E-77	3.935E-77
<i>mreC</i>	20.9973714	2.0952E-95	7.6107E-95	<i>xseA</i>	-18.7995203	2.7654E-80	8.5165E-80
<i>surA</i>	21.0040273	1.8669E-95	6.8398E-95	<i>mutS</i>	-19.9520143	5.9164E-89	1.8489E-88
<i>fkpB</i>	21.0102567	1.6759E-95	6.1936E-95	<i>pnp</i>	-19.9964033	2.7421E-89	8.6326E-89
<i>mshL</i>	21.0283455	1.225E-95	4.5669E-95	<i>sltY</i>	-20.0224997	1.7446E-89	5.5333E-89
<i>prfC</i>	21.092492	4.0315E-96	1.5163E-95	<i>dacB</i>	-20.0370265	1.3565E-89	4.3345E-89
<i>hemW</i>	21.2189816	4.5046E-97	1.7564E-96	<i>oadA</i>	-20.1410218	2.2386E-90	7.2075E-90
<i>pheA</i>	21.484301	4.541E-99	1.787E-98	<i>folA</i>	-20.2409258	3.9653E-91	1.2865E-90
<i>lysC</i>	21.5272631	2.157E-99	8.568E-99	<i>recX</i>	-20.2669008	2.5287E-91	8.2668E-91
<i>rluB</i>	24.8424642	2.43E-124	1.307E-123	<i>rraB</i>	-20.3259329	9.0922E-92	2.9955E-91
<i>aceE</i>	24.9684556	2.738E-125	1.511E-124	<i>rsmE</i>	-20.4481034	1.0951E-92	3.6359E-92
<i>lpdA</i>	24.9699272	2.669E-125	1.492E-124	<i>truB</i>	-20.5818498	1.0792E-93	3.6115E-93
<i>carA</i>	24.9700926	2.661E-125	1.492E-124	<i>rpsA</i>	-20.9656542	1.3967E-96	5.3001E-96
<i>lepB</i>	24.9706885	2.634E-125	1.492E-124	<i>mreD</i>	-21.0188292	5.5592E-97	2.1285E-96
<i>leuD</i>	24.9725214	2.551E-125	1.485E-124	<i>crcB</i>	-21.0300214	4.5793E-97	1.7693E-96
<i>rpoE</i>	24.9729801	2.531E-125	1.485E-124	<i>rplT</i>	-22.535993	2.129E-108	8.617E-108

<i>rseP</i>	24.9776243	2.336E-125	1.4E-124	<i>mutH</i>	-22.6042944	6.518E-109	2.664E-108
<i>gspL</i>	24.9815397	2.182E-125	1.372E-124	<i>gcvT</i>	-22.8506927	9.118E-111	3.762E-110
<i>pmbA</i>	25.0016933	1.539E-125	9.911E-125	<i>lspA</i>	-23.9847533	2.663E-119	1.121E-118
<i>aroB</i>	25.0020965	1.528E-125	9.911E-125	<i>recB</i>	-24.3531607	4.497E-122	1.931E-121
<i>ompR</i>	25.0029249	1.507E-125	9.911E-125	<i>rne</i>	-24.3536416	4.46E-122	1.931E-121
<i>gmk</i>	25.0046261	1.463E-125	9.868E-125	<i>secA</i>	-24.3546034	4.386E-122	1.922E-121
<i>nudE</i>	25.0047605	1.459E-125	9.868E-125	<i>ubiH</i>	-24.357304	4.186E-122	1.853E-121
<i>rapA</i>	25.0051216	1.45E-125	9.868E-125	<i>bamA</i>	-24.3605852	3.954E-122	1.769E-121
<i>gspG</i>	25.0118463	1.291E-125	9.143E-125	<i>aspA</i>	-24.3609344	3.93E-122	1.769E-121
<i>rpmC</i>	25.0236895	1.051E-125	7.573E-125	<i>dapB</i>	-24.3633229	3.771E-122	1.723E-121
<i>glnL</i>	25.10616	2.518E-126	1.845E-125	<i>gspC</i>	-24.3699582	3.361E-122	1.553E-121
<i>birA</i>	25.1840077	6.534E-127	4.872E-126	<i>nfuA</i>	-24.3783034	2.909E-122	1.359E-121
<i>tsaE</i>	25.3675729	2.715E-128	2.06E-127	<i>argE</i>	-24.3812407	2.764E-122	1.305E-121
<i>miaA</i>	25.3773437	2.292E-128	1.771E-127	<i>yacG</i>	-24.3888244	2.424E-122	1.158E-121
<i>rsgA</i>	25.3785349	2.245E-128	1.767E-127	<i>thiQ</i>	-24.4054831	1.816E-122	8.772E-122
<i>pspG</i>	25.394855	1.692E-128	1.357E-127	<i>hscB</i>	-24.4272049	1.247E-122	6.089E-122
<i>dusA</i>	25.4064235	1.385E-128	1.132E-127	<i>ftsE</i>	-24.4646753	6.512E-123	3.218E-122
<i>xerC</i>	25.5364301	1.455E-129	1.213E-128	<i>glpG</i>	-24.4699253	5.946E-123	2.973E-122
<i>yihI</i>	25.5602611	9.63E-130	8.186E-129	<i>asnC</i>	-24.4787254	5.105E-123	2.583E-122
<i>ftnA</i>	25.560642	9.567E-130	8.186E-129	<i>tatB</i>	-24.4845432	4.615E-123	2.363E-122
<i>ubiA</i>	25.5615712	9.414E-130	8.186E-129	<i>hemN</i>	-24.4857211	4.522E-123	2.344E-122
<i>yigB</i>	25.5675454	8.488E-130	7.676E-129	<i>thiS</i>	-24.4861893	4.485E-123	2.344E-122
<i>uspB</i>	25.568086	8.409E-130	7.676E-129	<i>rhtB</i>	-24.4865598	4.457E-123	2.344E-122
<i>glpE</i>	25.5738002	7.616E-130	7.193E-129	<i>rplX</i>	-24.7486796	4.747E-125	2.586E-124
<i>hemB</i>	25.5949299	5.281E-130	5.101E-129	<i>eno</i>	-25.714091	2.576E-132	2.737E-131
<i>thiF</i>	25.6119903	3.93E-130	3.884E-129	<i>nudC</i>	-26.4694323	5.327E-138	6.119E-137
<i>sthA</i>	25.6341086	2.678E-130	2.71E-129	<i>hflX</i>	-26.4708497	5.198E-138	6.119E-137
<i>trmA</i>	25.6791563	1.227E-130	1.272E-129	<i>bfr</i>	-26.4738003	4.939E-138	5.997E-137



<i>rpsR</i>	26.1926933	1.675E-134	1.826E-133	<i>hflC</i>	-26.4896227	3.755E-138	4.693E-137
<i>rpmA</i>	26.6784473	3.702E-138	4.693E-137	<i>rrf</i>	-27.7556714	1.113E-147	1.526E-146
<i>fre</i>	28.303016	2.2E-150	3.117E-149	<i>waaA</i>	-28.2842502	1.171E-151	3.111E-150
<i>ubiD</i>	28.3144579	1.804E-150	2.644E-149	<i>rfbA</i>	-28.2884576	1.089E-151	3.085E-150
<i>ilvA</i>	28.405242	3.742E-151	5.68E-150	<i>rfbD</i>	-28.2892339	1.074E-151	3.085E-150
<i>dprA</i>	28.4058807	3.701E-151	5.68E-150	<i>lpxN</i>	-28.2934576	9.986E-152	3.085E-150
<i>mioC</i>	28.4060342	3.691E-151	5.68E-150	<i>rffA</i>	-28.2950675	9.711E-152	3.085E-150
<i>yidD</i>	28.4060769	3.688E-151	5.68E-150	<i>recQ</i>	-28.2951155	9.703E-152	3.085E-150
<i>dnaN</i>	28.4062983	3.674E-151	5.68E-150	<i>gyrB</i>	-28.5750325	7.591E-154	4.033E-152
<i>atpE</i>	28.407161	3.619E-151	5.68E-150	<i>ccoG</i>	-28.5754911	7.531E-154	4.033E-152
<i>fhuB</i>	28.4392574	2.075E-151	4.009E-150	<i>ilvE</i>	-28.5770531	7.33E-154	4.033E-152
<i>rhlB</i>	28.4409319	2.016E-151	4.009E-150	<i>cytR</i>	-30.7405039	3.833E-170	1.629E-167
<i>rfbC</i>	28.4411021	2.01E-151	4.009E-150				
<i>wecB</i>	28.4411485	2.008E-151	4.009E-150				
<i>prlC</i>	28.4412242	2.006E-151	4.009E-150				
<i>acs</i>	28.4412572	2.005E-151	4.009E-150				
<i>vexR</i>	28.4790277	1.042E-151	3.085E-150				
<i>rfaD</i>	28.5406532	3.581E-152	1.691E-150				

---

