



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL

**USO DE PCR CUANTITATIVA PARA EVALUAR LA
DESINFECCIÓN CON OZONO DE AGUA
CONTAMINADA CON *Helicobacter pylori*.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA**

P R E S E N T A:
BEATRIZ CASASOLA RODRÍGUEZ

T U T O R P R I N C I P A L:
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA
INSTITUTO DE INGENIERÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ
INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
DR. IGNACIO MONJE RAMÍREZ
INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
FACULTAD DE QUÍMICA
M.C. VERÓNICA LUQUEÑO MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2012



JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ
Secretario: DR. IGNACIO MONJE RAMÍREZ
Vocal: DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA
1^{er}. Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
2^{do}. Suplente: M.C. VERÓNICA LUQUEÑO MARTÍNEZ

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, AMBIENTAL, EDIFICIO 5, CU, UNAM.
LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, INCMNSZ.

TUTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

Agradecimientos

Agradezco por todo el apoyo brindado al Dr. Guillermo Ruiz Palacios, Jefe del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México. A la Dra. Luz Elena Cervantes Jefa del Laboratorio de Infectología; también a Pilar Ramos Cervantes y Violeta Ibarra del mismo instituto.

A la M.C. Isaura Yáñez Noguez, por todo el apoyo y ayuda brindado.

A la Dra. Teresa Orta Ledesma y al Dr. Ignacio Monje Ramírez del Instituto de Ingeniería de la UNAM por su apoyo.

A mis sinodales el Dr. Victor Luna Pabello y La Dra. Gabriela Moeller, por su apoyo.

Al Dr. Daniel de los Cobos por su cooperación y asesoría, del IINGEN.

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a muchas personas que han sido importantes en mi vida y que gracias a ellos hoy, soy lo que soy.

A mi mamá que siempre en la vida confió en mí y me enseñó que en esta vida venimos para ser felices.

A mi papá por su inteligencia y por todo lo que me ha enseñado; por las infinitas horas de cultura, ciencia, lingüística, cine, risas y muchos más.

A Fernando, quien siempre me ha apoyado en todo haciéndome creer que no hay límites, gracias por siempre estar y confiar.

A mis hermanos de la vida, esperando que siempre estemos juntos y que sin todos ustedes esta vida no sería lo interesante y divertida que es.

Nadyeli, Bernardina, Paulina, Marina, Eugenia, Mariana, María del Mar, Sabina, Julieta, Lucero, Diego E, Elías, Caste, Alfonso, Roberto, Canek.

A mis compañeros de Maestría a quienes tanto aprecio.

Miriam, Flor, Candi, Rubí, Marisol, Ulises, Julio, Alfredo.

I. Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa con forma espiral que coloniza la mucosa gástrica y se asocia con enfermedades gástricas. Puede presentar adaptaciones morfológicas cuando se coloca fuera de su hábitat natural; un ejemplo es el agua. La adaptación morfológica es una forma cocoide, la cual es un estado viable pero no cultivable (VNC), donde el DNA se mantiene activo y por lo tanto infeccioso.

Debido a la incapacidad de cultivo con los métodos tradicionales en el estado VNC, en esta tesis se desarrolló una metodología que incluye la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), capaz de detectar y cuantificar la bacteria en ambos estados morfológicos (bacilar y cocoide). La metodología fue desarrollada para evaluar la resistencia de las bacterias en estado VNC a la acción del ozono en un proceso de desinfección.

Una suspensión bacteriana (9×10^8 CFU/mL), en un volumen de reacción 40 ml fue expuesta a la acción del ozono a diferentes valores de CT (0.11 a 15 mg-min/L). Los resultados indicaron una reducción de 3-log cuando se aplica un CT de 2 mg-min/L. Adicionalmente se realizó un ensayo de viabilidad con el colorante PMA y se encontró que para CTs por debajo de 0.5 min-mg/L y arriba de 1.0 min-mg/L, los valores obtenidos por qPCR son comparables, sin embargo entre 0.5-1.0 min-mg/L si se podría presentar una desviación en los datos debido a que el ozono logra dañar la membrana pero no es lo suficientemente fuerte para degradar el DNA. Nuestros resultados demuestran la viabilidad del uso de qPCR para la cuantificación y detección de *Helicobacter pylori* en forma cocoide en sistemas acuáticos tratados con un proceso de desinfección con ozono.

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral-shaped bacterium that colonizes the gastric mucosa and it is associated with gastric diseases. It may present morphological adaptations when it is placed out of its natural environment, such as in water. The morphological adaptation is a coccoid form, which is a viable but non-cultivable state (VNC), where the DNA keeps active and therefore infective. Due to the incapacity of culture with traditional methods in the VNC state, we developed a methodology that includes a molecular technique, like quantitative PCR (qPCR), which is capable of measuring the bacteria in both forms (bacillary and coccoidal) and therefore is able to measure a disinfection process, and to estimate the resistance of the bacteria to ozone. The methodology developed measures the efficiency of the ozone disinfection when bacteria are in a VNC state. Bacterial culture at 9×10^8 CFU/ml diluted in 40 mL reaction volumes were exposed to a range of CT values (0.11-15 mg-min/L). The results show a 3-log reduction when treated with 2 mg-min/L. We performed a viability process with PMA dye, and found that for CT below 0.5 mg min / L and above 1.0 mg min / L, the obtained values by qPCR no represent problems of false positives, however between 0.5-min 1.0 mg / L, it could present a deviation in the data because ozone breaks the membrane but not strong enough to degrade the DNA. Our results demonstrate the feasibility of using qPCR for the quantification and detection of *Helicobacter pylori*, in coccoid form, in watery systems treated with an ozone disinfection process.

III. Contenido

I. RESUMEN	5
III. CONTENIDO	6
III A. ÍNDICE DE TABLAS	9
III B. ÍNDICE DE FIGURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 ANTECEDENTES	17
CUANTIFICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i> POR MEDIO DE <i>QPCR</i>	17
RESISTENCIA DE <i>H. PYLORI</i> AL OZONO	18
1.2 OBJETIVO	19
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	19
2. <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	20
2.1 MICROBIOLOGÍA	20
2.1.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	21
2.1.2 MORFOLOGÍA	22
2.1.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO	23
2.1.4 METABOLISMO	24
2.1.5 ENVOLTURA CELULAR	25
2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN	25
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	26
2.4 FORMAS DE TRANSMISIÓN Y FUENTES DE INFECCIÓN	29
2.5 IMPLICACIONES DE LA MORFOLOGÍA DE LA BACTERIA EN LA SALUD PÚBLICA	31
3. DESINFECCIÓN CON OZONO	33
3.1 TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN	33
3.2 SOLUBILIDAD DEL OZONO EN AGUA	34
3.3 ESTABILIDAD DEL OZONO EN AGUA	35
3.4 TÉCNICAS PARA LA MEDICIÓN DE OZONO	37

3.5 CINÉTICA DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ACCIÓN DEL OZONO	38
3.6 ESTRUCTURA DE LOS CONSTITUYENTES CELULARES	40
3.7 REACTIVIDAD DEL OZONO CON LOS CONSTITUYENTES DE LA CÉLULA	44
4. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA	49
4.1 PATÓGENOS EN LOS SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA	50
4.2 ORGANISMOS INDICADORES	52
4.2.1 INDICADORES COMÚNMENTE MEDIDOS EN AGUA	53
4.3 METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN Y CONTEO DE PATÓGENOS	54
4.3.1 NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)	55
4.3.2 FILTRACIÓN POR MEMBRANAS	56
4.3.3 ENSAYOS ENZIMÁTICOS	56
4.3.4 CUENTAS DIRECTAS	57
4.3.5 DENSITOMETRÍA DE FLUJO	57
4.3.6 MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES	57
4.4 TÉCNICAS DE DETECCIÓN BASADAS EN DNA COMO OBJETIVO	60
4.4.1 MÉTODO DE DETECCIÓN BASADO EN FRAGMENTOS DE DNA POR MEDIO DE PCR	60
4.4.2 MÉTODO DE DETECCIÓN BASADO EN FRAGMENTOS DE DNA POR MEDIO DE QPCR	61
4.4.3 METODOLOGÍA PARA IMPLEMENTAR UNA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS (DNA OBJETIVO)	65
4.5 ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS AL MEDIO	68
4.5.1 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD EN ENSAYOS QPCR POR MEDIO DE COLORANTES INDICADORES	70
5. METODOLOGÍA	74
5.1 MICROBIOLOGÍA	76
5.1.1 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS BACTERIANAS	76
5.2 OBTENCIÓN DE SOLUCIÓN STOCK DE OZONO PARA DESINFECCIÓN	78
5.2.1 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE AGUA SATURADA CON OZONO (SOLUCIÓN STOCK)	78
5.2.2 METODOLOGÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OZONO EN FASE LÍQUIDA	79
5.3 PRUEBAS DE DESINFECCIÓN	80
5.4 RECUPERACIÓN DEL PAQUETE CELULAR	81
5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS POR MEDIO DE QPCR	82

5.5.1 EXTRACCIÓN DE DNA DE <i>H. PYLORY</i> .	82
5.5.2 ENSAYO DE QPCR	82
5.6 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN AGUA DE POZO MEDIANTE QPCR	83
5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CON PMA	85
6. RESULTADOS	85
6.1 MICROBIOLOGÍA	85
6.2 SOLUCIÓN DE OZONO STOCK PARA DESINFECCIÓN	86
6.2.1 DECAIMIENTO DEL OZONO RESIDUAL EN PRESENCIA DE LA SUSPENSIÓN CELULAR.	87
6.3 EXTRACCIÓN DE DNA	88
6.4 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR MEDIO DE QPCR	90
6.4.1 CURVAS ESTÁNDAR PARA QPCR	90
6.5 PRUEBAS DE RECUPERACIÓN DEL PAQUETE CELULAR	95
6.6 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN AGUA DE POZO MEDIANTE QPCR	96
6.7 EXPERIMENTOS DE DESINFECCIÓN	97
6.7.1 FASE EXPERIMENTAL 1	97
6.7.2 FASE EXPERIMENTAL 2	99
6.8 PRUEBAS DE DESINFECCIÓN CON PMA	102
6.8.1 FASE EXPLORATORIA	102
6.8.2 FASE EXPERIMENTAL	103
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	111
8. CONCLUSIONES	113
9. BIBLIOGRAFÍA	115

III A. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2.1.1 Principales especies del género Helicobacter y sus huéspedes (Kusters et al., 2006, van Vliet et al., 2006)</i>	21
<i>Tabla 2.4.1 Fuentes donde se ha detectado H. pylori y las técnicas de su identificación (Fernández et al., 2008)</i>	30
<i>Tabla 4.1.1 Organismos patógenos asociados a la transmisión acuosa (Bitton, 2011).</i>	51
<i>Tabla 4.4.3 Recursos electrónicos con información relevante a pruebas moleculares.</i>	67
<i>Tabla 4.5.1 microorganismos capaces de entrar en un estado de resistencia en el ambiente (Oliver, 2005).</i>	69
<i>Tabla 5.1.1 Número de UFC presentes en las diluciones de la prueba de agua de pozo</i>	78
<i>Tabla 5.6.1 Parámetros de calidad del agua de pozo de la facultad de química, promedio quincenal de muestras Junio 2011 (Pumagua).</i>	84
<i>Tabla 5.6.2 Número de UFC presentes en las diluciones de la prueba de agua de pozo</i>	84
<i>Tabla 6.3.1 Tabla de resultados de pureza del DNA, mediante relación de desindad óptica 260/280.</i>	89
<i>Tabla 6.4.1 Tabla de cálculo de la concentración final de DNA, para obtener una curva estándar de 5 puntos.</i>	91
<i>Tabla 6.4.2 Tabla de cálculo de μL de DNA para preparar la curva estándar.</i>	92
<i>Tabla 6.7.1.1 Tabla de valores de CT utilizados parte I</i>	97
<i>Tabla 6.7.1.2 Tabla de resultados de experimentos parte I</i>	98
<i>Tabla 6.7.2.1 valores CT utilizados en experimento parte II</i>	99
<i>Tabla 6.8.2.2 Tabla de resultados de experimento #1</i>	100
<i>Tabla 6.7.2.3 Tabla de resultados de experimento #2</i>	100
<i>Tabla 6.8.2 Tabla de valores de CT utilizados en experimento #1</i>	104
<i>Tabla 6.8.3.1 Tabla comparativa de resultados experimento #2</i>	106
<i>Tabla 6.9.3.2 Tabla comparativa de resultados de desinfección experimento #2.</i>	110

III B. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1</i> Microfotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido, (a) forma bacilar, (b) forma de transición, (c) Forma cocoide (Linke et al., 2010).	14
<i>Figura 2.1.2</i> A: Micrografía electrónica de <i>H. pylori</i> en su forma cocoide y espiral (R J Owen 1998) B: Imagen 3D de <i>H. pylori</i> (Concrete Bob Software)	22
<i>Figura 2.2.1</i> Epidemiología y asociaciones de las enfermedades producidas por <i>H. pylori</i> (Marshall, 2002).	26
<i>Figura 2.3.1</i> Zonas del estómago donde se aloja <i>H. pylori</i> . “Comunicado de prensa 2005 premio Nobel en medicina y fisiología”. 24 Nov 2010”	27
<i>Figura 2.3.2</i> Representación esquemática de los factores que contribuyen a la patología gástrica y las enfermedades que provoca la infección con <i>H. pylori</i> (Kusters et al., 2006).	28
<i>Figura 3.3.1</i> Reacciones de descomposición del ozono.	37
<i>Figura 3.6.1</i> Principales compuestos del material nucleico(Langlais et al.,2000).	42
<i>figura 3.6.2</i> Principales compuestos orgánicos dentro de la célula (McKee 2011)	43
<i>Figura 3.6.3</i> Esquema del DNA y RNA	44
<i>Figura 4.3.6</i> Métodos de detección para identificación de microorganismos (Sen, 2011).	59
<i>Figura 4.4.2.1</i> Gráfica de resultados qPCR con significado de líneas	63
<i>Figura 4.4.2.2</i> Esquema de funcionamiento de la técnica de qPCR (APPLIED, 2010)	64
<i>Figura 4.5.1</i> Esquema del alcance de la técnica v-PCR (Fittipaldi et al., 2010).	73
<i>Figura 5.1</i> Diagrama general de experimentación.	75
<i>Figura 5.2.1</i> Diagrama de la unidad de oxidación con ozono	79
<i>Figura 5.2.2</i> Diagrama de flujo para medición de ozono residual en fase líquida.	80
<i>Figura 6.1.1</i> Imágenes de siembra en placa de <i>H. pylori</i> .	86
<i>Figura 6.2.1</i> Decaimiento de la concentración residual de ozono en solución salina con/sin suspensión bacteriana, desde 0.45 mg/L durante 10 minutos.	87
<i>Figura 6.3.1</i> Gel de agarosa con los DNA de <i>Helicobacter pylori</i> , producto de la extracción con kit QIAGEN QIAamp.	88
<i>Figura 6.3.2</i> Curva de eficiencia de la técnica de extracción de DNA. (Delta Rn vs Número de ciclo) ____	89
<i>Figura 6.4.1</i> Curva de calibración en forma log, detectando desde 300 genomas hasta 3×10^6 (Delta Rn vs Número de ciclo).	93
<i>Figura 6.4.2</i> Curva de calibración en forma lineal, detectando desde 300 genomas hasta 3×10^6 (Delta Rn vs Número de ciclo).	93
<i>Figura 6.4.3.</i> Recta de ajuste estándar con $R^2=0.998$, y eficiencia del 92%, $cT=44.38-3.63*\log cel.$	94

Figura 6.5.1 Curva de eficiencia de recuperación del cultivo celular por medio de filtración (Delta Rn vs Número de ciclo).	95
Figura 6.6.1 Gráfica de resultados positivos de la prueba de detección de H. pylori en agua de pozo.(Delta Rn vs Número de ciclo)	96
Figura 6.7.2.1 Gráfica de resultados de desinfección de experimentos parte II	101
Figura 6.7.2.2 Gráfica de resultados de desinfección de experimentos parte II	101
Figura 6.8.1 Gráfica de resultados de la prueba de interferencia de PMA y qPCR.	103
Figura 6.8.2 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad, en experimento #1.	104
Figura 6.8.3 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#1.	105
Figura 6.8.4 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#2.	107
Figura 6.8.5 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#2, ajuste de curva estándar.	107
Figura 6.8.6 Comparativo entre ensayo qPCR y vPCR con valores logarítmicos.	108
Figura 6.8.7 Esquema para el análisis de las muestras con PMA	109

1. INTRODUCCIÓN

Si partimos del hecho que el agua es un elemento esencial para la vida y que sin ella, simplemente se cancela la posibilidad del desarrollo de la misma, podríamos decir entonces que es el recurso natural más importante del mundo, y su disponibilidad, el acceso y la calidad de la misma representan condiciones necesarias ya que ésta juega un papel vital en el desarrollo humano.

La declaración universal de derechos humanos dispone en su artículo 25 que toda persona tiene derecho a un nivel de vida adecuado, que le asegure entre otros aspectos el acceso a distintos servicios sociales, dentro de los cuales se incluye el agua, la cual debe ser abastecida con la calidad necesaria para el uso personal o doméstico y debe ser salubre, por lo tanto, no ha de contener microorganismos o sustancias químicas o radioactivas que puedan constituir una amenaza para la salud de las personas.

De acuerdo con el estudio realizado en 2002 por la escuela de salud pública de Harvard, en donde se evaluaron los principales diez factores de riesgos a la salud mundial, se estimó que el riesgo a la salud por agua contaminada ocupa el tercer lugar de importancia en zonas en desarrollo con altas tasas de mortandad, de acuerdo a muertes por enfermedades infecciosas que son transmisibles por dicho líquido (“Selected major risk factors and global and regional burden of disease” 2002).

Es entonces el agua un medio con gran potencial para transmitir una amplia variedad de enfermedades. En países desarrollados las enfermedades asociadas a fuentes hídricas contaminadas son escasas debido a la presencia de sistemas eficientes de distribución y tratamiento, sin embargo en países en vías de desarrollo no existe abastecimiento seguro ni saneamiento adecuado de este recurso.

Las fuentes de contaminación del agua pueden ser diversas, ya sea de tipo antropogénico o natural. Los principales contaminantes que el agua puede contener son: agentes biológicos, contaminantes disueltos y no disueltos, colorantes, fenoles, sustancias radioactivas, bifenilos policlorados, plaguicidas, sustancias orgánicas, metales pesados y sustancias emergentes (Farmacéuticos), etc. (Gupta *et al.*, 2009).

Los agentes biológicos son una fuente de contaminación del agua, y debido al aumento de la población y su consecuente urbanización, la contaminación por microorganismos enteropatógenos causantes de los síntomas más comunes de enteritis y síndromes diarreicos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Helicobacter* entre otros, han venido cobrando gran importancia desde los primeros brotes epidémicos de cólera en 1854 en Londres, hasta nuestros tiempos en donde las infecciones de este tipo siguen cobrando vidas.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un microorganismo en forma de “S” o espiral, Gram negativo y microaerófilico, que ha sido asociado a enfermedades gastrointestinales como: gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico, ya que coloniza la mucosa gástrica. Se estima que cerca del 80% de la población en países en vías de desarrollo está infectada con dicha bacteria y menos del 40% en países de primer mundo (Kusters *et al.*, 2006, Marshall, 2005).

En los últimos años se ha despertado un gran interés científico en torno al tema de *H. pylori* debido a su carácter crónico, la elevada prevalencia de la infección y las muertes que provoca. En 1994 la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo clasificaron como carcinógeno de clase I dentro de los agentes causales, y en 2005 Marshall y Warren obtuvieron el premio nobel en medicina por el descubrimiento de la implicación de la bacteria en úlceras pépticas y gástricas.

Además de la edad, existen otras variables epidemiológicas que han sido estudiadas para evaluar la relación que guardan con la infección por *H. pylori* como: género, etnia, actividad laboral, nivel socioeconómico y educativo, entre otros. El nivel socioeconómico y educativo junto con la edad, constituyen los factores de riesgo más importantes para la adquisición de la infección por *H. pylori* (Ford *et al.*, 2008). También se ha encontrado relación de la infección con otros factores como lo son los hábitos en el consumo de alcohol, tabaco, sustancias Inhibidoras de la Bomba de fosfato (IBP) y Anti Inflamatorios No Esteroides (AINE) (Kusters *et al.*, 2006).

H. pylori existe en tres formas: la forma espiral viable, la forma cocoide viable no cultivable (VNC) y la forma cocoide degenerada no viable. Algunas investigaciones han demostrado que

H. pylori puede sobrevivir en agua de mar y solución salina en forma bacilar por más de 14 días y las formas cocoides VNC pueden sobrevivir en agua hasta un año (Agustí *et al.*, 2010)

A pesar de que se ha estudiado este microorganismo arduamente por más de 15 años, aún no se sabe el modo preciso ni la posible vía de transmisión, pero se han propuesto tres rutas incluyendo: fecal-oral, oral-oral y gástrica-oral (Kusters *et al.*, 2006).

Se cree que la forma cocoide de *H. pylori* en agua contribuye en gran medida con la transmisión de esta bacteria ya que se han encontrado ciertas asociaciones entre el consumo de agua de pozo y la infección generalizada de las personas que la consumieron (Rowan, 2010). Aunque aún no se han podido confirmar por completo dichos mecanismos, este trabajo se basará en la hipótesis de la transmisión fecal-oral, siendo el agua un vehículo de transmisión e infección (Adams *et al.*, 2003). Para respaldar esta hipótesis se tienen datos de la presencia de DNA de *H. pylori* en agua de río, agua de pozo, agua residual, agua de mar así como agua superficial y subterránea (Fernández *et al.*, 2008, Vale and Vitor, 2010).

Sin embargo el agua representa un ambiente hostil para el microorganismo, por lo que la bacteria necesita activar mecanismos de supervivencia como cambios morfológicos y metabólicos (Almeida *et al.*, 2006). Es bien conocido que al encontrarse en ambientes adversos, *H. pylori* se transforma pasando de su forma original en forma de “S” a una forma intermediaria en forma de “U” antes de convertirse a la forma cocoide VNC. En la figura (1.1) se muestra la transición morfológica de la bacteria por medio de microfotografías electrónicas.

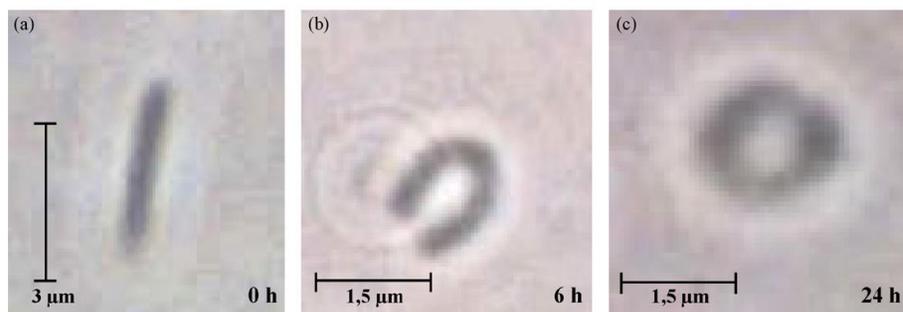


Figura 1.1 Microfotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido, (a) forma bacilar, (b) forma de transición, (c) Forma cocoide (Linke *et al.*, 2010).

Existe un fuerte debate acerca de las formas cocoides, ya que se ha descrito como una manifestación morfológica de degeneración celular o muerte (Kusters *et al.*, 1997), debido a que es prácticamente imposible realizar un cultivo cuando la bacteria se encuentra en la forma VNC, pero sí es posible detectarlo por medio de otro tipo de técnicas como: hibridación fluorescente in situ (FISH) por sus siglas en inglés (Moreno *et al.*, 2007), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final (Lu *et al.*, 2002) y PCR tiempo real o cuantitativo (qPCR) (Yáñez *et al.*, 2009).

Por otro lado Linke *et al.*, indican la persistencia de formas cocoides en ambientes acuáticos, logrando su detección y cuantificación en biopelículas por medio de qPCR, demostrando que este tipo de microorganismo puede formar biopelículas y mantener su DNA activo hasta por 30 meses.

En un estudio realizado por Fei-fei *et al.* 2003, en el que se indujo la forma cocoide a partir de la forma bacilar utilizando agua para el cultivo y dando un periodo de incubación de 3 días; midieron la infectividad de dicha forma en un modelo animal, en este caso ratones y se encontró que la forma cocoide es menos infecciosa que la bacilar, pero cuando se encuentra en la forma cocoide la bacteria sigue presentando flagelos los cuales utiliza para adherirse a las células y su metabolismo le sigue permitiendo colonizar la mucosa gástrica, con lo cual logró crear daños en la mucosa gástrica.

Se sabe que dentro de las cepas de *H. pylori* existe diversidad genética, lo que explica la diferencia en la patogenicidad y la diversidad de cepas alrededor de la población mundial.

Esta diversidad se debe en parte a las variaciones en un grupo de genes asociados a citotoxinas (cag) los cuales están situados en islas de patogenicidad (PAI). La importancia de estas secuencias genómicas, además de ser las responsables de dar lugar a distintas cepas con capacidades infecciosas distintas, es que se utilizan en las técnicas de detección y cuantificación molecular, ya sea de punto final (PCR) o de tiempo real (qPCR), Las secuencias que se utilizan como blanco son los genes como: cagA, cagE y cagT u otros asociados a la producción de urea como ureA y ureB. Éstas resultan ideales para este tipo de técnicas de detección y cuantificación molecular ya que estos genes se mantienen activos mientras la

bacteria está en una forma cocoide VNC (Yáñez *et al.*, 2009) y porque son secuencias genómicas muy conservadas en todas las cepas de *H. pylori*.

Para el desarrollo de esta investigación, se propone trabajar con las formas cocoides de esta bacteria ya que es la morfología en la que *H. pylori* se encuentra en el ambiente y específicamente en ambientes acuáticos, además de que existe evidencia de una mayor resistencia al cloro y ozono que *E. Coli* (organismo indicador), a concentraciones comunmente encontradas en los sistemas de distribución de agua y en su forma bacilar menos resistente (Baker *et al.*, 2002).

Debido a que la forma cocoide es una forma imposible de recuperar por plaqueo, es necesario utilizar técnicas moleculares como el qPCR para evaluar la eficiencia de desinfección.

Es evidente que diversos microorganismos como: *E.coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio sp.*, pueden crear adaptaciones al ambiente, y entrar en estados VNC por lo que es necesario incluir en los controles de calidad del agua, técnicas que detecten dichos microorganismos cuando se encuentran en estados VNC (Bitton, 2011).

La aplicación de la técnica de qPCR ha sido cuestionada en lo que respecta a la información que brinda acerca de la viabilidad perteneciente a los microorganismos que se evalúan; esto se debe a que la técnica de qPCR tiene el potencial de detectar y cuantificar todo el material genético perteneciente a la secuencia de interés, pero esta secuencia podría estar presente independientemente de si la célula está viva o muerta. Al realizar la cuantificación por medio de qPCR se cuantificaría todo el DNA bacteriano incluyendo las formas viables y no viables, esto debido a que la técnica no logra diferenciar el DNA de células que estaban vivas o muertas después de la exposición al ozono, por lo que se podrían generar falsos positivos es decir, que se contabilizarían genomas pertenecientes a bacterias muertas y por lo tanto sería un serio problema si esta metodología se quisiera implementar en diagnósticos de calidad sanitaria de rutina.

Sin embargo existe una técnica de tinción utilizando un colorante llamado monoazida de propidio (PMA Biotum), el cual es un colorante foto reactivo de alta afinidad al DNA de doble cadena, con el cual se puede comprobar el verdadero número de células realmente rotas por la

acción del ozono. Por lo tanto en este trabajo evaluaremos la viabilidad del ensayo por medio de la técnica de tinción con PMA comúnmente llamado vPCR.

1.1 Antecedentes

Cuantificación de *H. pylori* por medio de qPCR

Existen varios trabajos donde se describen metodologías para cuantificar *H. pylori* como organismo celular a partir de biopsias, y en algunos se estudia al microorganismo a partir de muestras ambientales. Sin embargo las diferencias en estas técnicas radican en la secuencia genética objetivo que se seleccione, lo cual es de suma importancia ya que esta secuencia definirá el objetivo del ensayo. En el trabajo de Yañez *et al.*, 2008 se utiliza una secuencia incluida en el gen CagE el cual es una secuencia de genes asociadas a citotoxinas, al igual que CagA, por lo tanto en ese ensayo se intentó detectar aquellas cepas de *H. pylori* que presentaban mayor virulencia y por lo tanto que eran más propensas a generar cancer gástrico; con lo cual el trabajo de Yañez 2008, tiene como objetivo la detección de bacterias virulentas.

En el trabajo realizado por McDaniels *et al.*, 2005 se utiliza como objetivo una secuencia del gen ureA, el cual es una secuencia relacionada con la producción de urea y el objetivo de este trabajo fue probar la especificidad de la secuencia genética escogida, mediante la comparación de 5 cepas distintas de *H. pylori*. En este trabajo se utilizaron filtros de policarbonato para recuperar el paquete celular, pero se realiza la extracción de DNA directa del filtro, esto lo imposibilitaría de aplicar un tratamiento extra como vPCR. Este trabajo sirvió como referencia para seleccionar la secuencia genética perteneciente al gen ureA.

Linke *et al.*, 2010 también trabajaron con la secuencia del gen ureA, pero su objetivo fue cuantificar *H. pylori* de biopelículas artificiales. Lo interesante del trabajo desarrollado fue que se probó la nula existencia de alguna homología cruzada con *H. salomonis* la cual tiene una similitud reportada, también se probó con *E. coli* k12 como control negativo de bacteria fecal y un cúmulo de DNA perteneciente a diversas bacterias que pueden ser encontradas en biopelículas acuáticas. En este trabajo se concentró el paquete celular por medio de filtros de

policarbonato y posteriormente con concentradores de proteínas, lo cual vuelve muy costosa la técnica.

Con estos trabajos de por medio se decidió trabajar con la secuencia genética perteneciente al gen de ureA y se modificó la técnica para que fuera capaz de cumplir con nuestro objetivo de seguir un proceso de desinfección.

Resistencia de *H. pylori* al ozono

Los trabajos relacionados con la resistencia de *H. pylori* al ozono son casi escasos, la única referencia que se tiene es la de Baker *et al.*, 2002 en el cual trabajan con la resistencia de la bacteria al cloro y al ozono, comparándola con *E. coli* un organismo indicador de contaminación fecal. Ellos concluyen que *H. pylori* es más resistente que *E. coli* para procesos de desinfección con ozono y cloro a las dosis generalmente encontradas en los sistemas de distribución de agua. Este descubrimiento fue de gran importancia ya que mostró el riesgo que puede generarse el que *H. pylori* pueda ser más resistente *E. coli* a las dosis de desinfectante generalmente encontradas en los sistemas de distribución de agua . Sin embargo en esta investigación se trabajó con la forma bacilar de la bacteria, esto debido a que el descubrimiento de que la forma cocoide era una forma de adaptación al medio ambiente fue posterior. Entonces surge la importancia de aplicar una técnica capaz de detectar y cuantificar *H. pylori* cuando se encuentra en un estado de resistencia y por lo tanto no medible por técnicas tradicionales como el plaqueo y por otro lado su resistencia a la desinfección, en este caso al ozono, por medio de una técnica molecular como qPCR.

1.2 Objetivo

- Implementar una técnica de PCR en tiempo real con la cual se evalúe la eficiencia de la desinfección con ozono de agua contaminada con *Helicobacter pylori* en estado viable no cultivable.

1.3 Objetivos particulares

- Desarrollar una metodología para la cuantificación de *Helicobacter pylori* en agua por medio de PCR tiempo real
- Probar la técnica de detección por medio PCR en tiempo real para agua de pozo
- Cuantificar *Helicobacter pylori*, presente en agua antes y después de la exposición al ozono por medio del PCR en tiempo real para conocer la eficiencia de desinfección del ozono
- Determinar los parámetros de desinfección (dosis y tiempos de contacto) de ozono, necesarios para inactivar *Helicobacter pylori* en agua
- Conocer la viabilidad de las formas cocoides mediante el colorante PMA durante el proceso de desinfección con ozono y comparar con los datos obtenidos del PCR tiempo real

2. HELICOBACTER PYLORI

2.1 Microbiología

La presencia de la bacteria *H. pylori* en la mucosa gástrica de humanos fue identificada por primera vez hace más de 100 años en 1899 (Pel, 1899), y fue aislada por primera vez en 1982, de biopsias endoscópicas de pacientes con gastritis y úlceras pépticas. Por sus características fenotípicas de forma en espiral y su motilidad, el crecimiento bajo condiciones microaerófilas y su aislamiento del tracto gastrointestinal fue clasificado como género *Campylobacter* y llamada *Campylobacter pyloridis*, pero más tarde fue llamada *C. pylori* (Marshall, 1987).

Fue claro que *C. pylori* era significativamente diferente a otros miembros del género en las siguientes características: presencia de motilidad por flagelos, glicocalix externo producido in vitro en medio líquido, menaquinona 6 (MK-6) presente como la mayor quinona isoprenoide y un contenido G+C de ADN cromosomal de 35-44% mol (Owen, 1998).

En 1989 se propuso el nuevo género *Helicobacter* y así *C. pylori* fue llamada, *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). El género ahora incluye una variedad de especies de *Helicobacter* gástricas y no gástricas. Esta clasificación se basó principalmente en una homología superior al 90% de la secuencia de nucleótidos en la fracción 16s del ARN ribosomal (Lee *et al.*, 1993).

2.1.1 Análisis filogenético

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión de las proteo bacterias, con el orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Esta familia también incluye al género *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. En la tabla (2.1.1) se muestran las principales especies del género.

Las especies de *Helicobacter* se pueden subdividir en dos linajes, uno pertenece a las especies gástricas de *Helicobacter* y el otro a las entero hepáticas (no gástricas). Ambos grupos de la especie *Helicobacter* han demostrado tener un alto nivel de restricción de características que responden a un órgano en particular; en este caso los *Helicobacters* gástricos en general no colonizan el intestino o el hígado y viceversa.

TABLA 2.1.1 PRINCIPALES ESPECIES DEL GÉNERO HELICOBACTER Y SUS HUÉSPEDES (KUSTERS ET AL., 2006, VAN VLIET ET AL., 2006)

Especie	Huésped
Gástricas	
<i>H. acinonyx</i>	Leopardo, Tigre,
<i>H. bizozeronii</i>	Perro
<i>H. bilis</i>	Ratón
<i>H. canis</i>	Perro (humanos)
<i>H. cholecystus</i>	Hámster
<i>H. cinaedi</i>	Humano y Hámster
<i>H. Felis</i>	Perro y Gato, Ratón
<i>H. fennelliae</i>	Humano
<i>H. heilmannil</i>	Humano ,Gato, Perro,
<i>H. muridarum</i>	Rata, Ratón
<i>H. mustelae</i>	Hurones
<i>H. nemestrinae</i>	Macacos
<i>H. pametensis</i>	Pájaros silvestres,
<i>H. pullorum</i>	Aves de corral
<i>H. pylori</i>	Humano, Primate
<i>H. salomonis</i>	Perros
<i>H. suis</i>	Puerco
<i>H. trogontum</i>	Rata
<i>H. westmeadii</i>	Humano
No Gástrica	
<i>H. hepaticus</i>	Ratón y roedores

2.1.2 Morfología

H. pylori es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo, con dos a seis flagelos unipolares característicos. La bacteria presenta terminaciones perfectamente redondas con longitudes de 2.5 – 4.0 μm , y de 0.5 -1.0 μm de ancho. La pared celular es lisa y puede estar recubierta por gran cantidad de glicocalix con un espesor superior a los 40 nm; está recubierta por subunidades de tipo anillo con un diámetro de 12-15 nm de longitud y 30 nm de ancho, con una terminal en forma de bulbo característica (Goodwin *et al.*, 1993). Cada flagelo contiene un filamento central envuelto por una funda flagelar, este filamento está hecho principalmente de polímero de 53-kDa (80 pares de bases) de proteína, con su parte terminal cercana al cuerpo basal, el cual está asociado a la membrana citoplasmática. Su cubierta está formada por una bicapa lipídica que se extiende como una continuación de la membrana externa. La bacteria presenta una remarcable motilidad en soluciones viscosas debido a sus flagelos, puede cambiar su apariencia morfológica en un intervalo de formas cocoides, especialmente cuando se cultiva in vitro después de re cultivarse varias veces o en presencia de antibióticos y cuando se encuentra en la forma cocoide es prácticamente imposible realizar cultivos.

En la figura (2.1.2) se presenta una micrografía electrónica con ambas formas en las que se puede encontrar *H. pylori*.

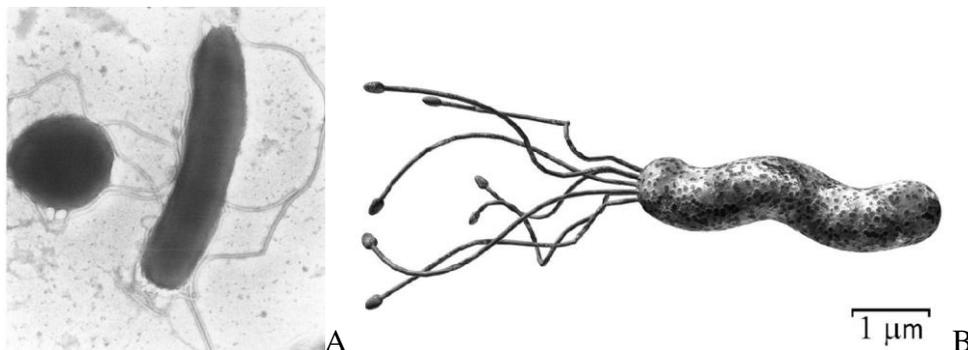


Figura 2.1.2 A: Micrografía electrónica de *H. pylori* en su forma cocoide y espiral (R J Owen 1998) B: Imagen 3D de *H. pylori* (Concrete Bob Software)

2.1.3 Condiciones de crecimiento

Una característica importante de *H. pylori* es que es microaerofílica, con niveles de crecimiento óptimos de O₂ entre 2 a 5 %, de 5 a 10 % de CO₂, 85% de N₂ y alta humedad

El crecimiento ocurre a 34° C con un óptimo en 37° C, aunque su hábitat natural es la mucosa gástrica ácida puede resistir exposiciones ligeras a pH<4, pero el crecimiento ocurre a pH en el intervalo de 5.5 a 8.0, con un crecimiento óptimo a pH neutro.

H. pylori requiere medios complejos para su crecimiento, por lo general estos medios están complementados con sangre o suero. Comúnmente se utiliza un medio sólido para el aislamiento de rutina y el cultivo de *H. pylori* consiste en agar Columbia, Brucella o infusión cerebro corazón (BHI) por sus siglas en ingles, complementado con sangre de caballo , de oveja o con placenta. Para un aislamiento primario o de rutina comúnmente se utilizan antibióticos selectivos sin embargo estos no son necesarios. Comúnmente se utiliza suplemento Dent que consiste en vancomicina, trimetoprim, cefsoludina, y amfotericina B (Dent, 1988). Otro medio utilizado es complemento Skirrow el cual consiste de vancomicina, trimetoprima, polimixina B, y amfotericina B (Skirrow, 1977), ambos complementos están disponibles comercialmente. Los medios líquidos usualmente consisten de alguno de los siguientes medios: Brucella, Mueller-Hinton, caldo infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con 2 a 10% de suero bovino con 0.2 a 1.0% de β-ciclodextrina y comúnmente suplementado con Dent o Skirrow.

Su aislamiento es difícil y no siempre viable, los cultivos deben ser revisados a partir del día 3 al 14 formando colonias pequeñas (1 mm), translúcidas. Después de lograr su aislamiento y realizar sub cultivos, *H. pylori* trata de adaptarse a las condiciones de crecimiento del medio y puede tener un buen crecimiento en los primeros tres días de incubación, cuando se utiliza una cepa adaptada. Cuando el cultivo alcanza una fase estacionaria, la tasa de crecimiento decrece rápidamente y está acompañada de un cambio morfológico a una forma cocoide. Tiempos prolongados de cultivo no llevan a un incremento en el tamaño de las colonias, si no que lleva a una transición de estado cocoide incultivable (Kusters *et al.*, 2006).

H. pylori puede ser almacenada por un largo periodo a -80°C en infusión cerebro corazón o caldo Brucella suplementado con 15 a 20% de glicerol o 10% de dimetilsulfóxido, sin embargo para su manipulación se necesita el uso de cultivos de menos de 48 horas, para asegurar más del 90% de bacterias en forma espiral.

2.1.4 Metabolismo

H. pylori presenta un estrecho intervalo de órganos huésped-objetivo, pero provoca una infección prolongada, esto sugiere que tiene una fuerte adaptación a su hábitat natural que es la capa de mucosa que recubre las células gástricas epiteliales, como consecuencia *H. pylori* carece de varias vías metabólicas de biosíntesis que son frecuentemente encontradas en bacterias menos especializadas.

H. pylori es ureasa, catalasa, y oxidasa positiva, características que son utilizadas en su identificación y es capaz de degradar la glucosa pero no otros azúcares.

a) Respiración y defensa al estrés oxidativo

H. pylori es una bacteria microaerófila por lo que no tolera altas concentraciones de oxígeno, pero requiere al menos 2% de O_2 , esto se debe a que *H. pylori* utiliza al oxígeno como aceptor final de electrones, y no tiene la capacidad de utilizar aceptores electrónicos alternativos, como lo son nitratos o metanoatos. En el huésped humano se cree que *H. pylori* se expone a un estrés oxidativo producido por la respuesta activa del sistema inmune.

b) Metabolismo del nitrógeno

Los aminoácidos y la urea son las dos fuentes principales de nitrógeno en el medio gástrico, se sabe que el amoníaco es un componente clave de en el metabolismo del nitrógeno y también de la resistencia al ácido (Stingl, 2002), sin embargo *H. pylori* puede utilizar distintas fuentes de amoníaco. Las distintas vías que contribuyen a la síntesis de amonio están reguladas en respuesta a diferentes estímulos, que probablemente permitan a *H. pylori* cambiar de vía dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentre.

La ruta principal de producción de amonio es a través de la altamente activa enzima ureasa, la cual funciona en el metabolismo del nitrógeno, en la resistencia ácida y la virulencia. *H. pylori*

produce grandes cantidades de ureasa, y se ha estimado que más del 10% del total de la proteína que contiene *H. pylori* consiste de ureasa.

2.1.5 Envoltura celular

La composición total de la envoltura celular de *H. pylori* es similar a la de las bacterias Gram negativo, estas consisten de una membrana interna citoplasmática, periplasma con péptidoglicano, y una membrana externa. La membrana externa está compuesta de fosfolípidos y lipopolisacáridos, que contienen glucósidos de colesterol.

2.2 Epidemiología de la infección

Helicobacter pylori está asociada al concepto de patología crónica gastro duodenal, la colonización de la mucosa gástrica con *H. pylori* causa la infección bacteriana más frecuente a nivel mundial y es la mayor causante de enfermedades gastrointestinales como: gastritis crónica, úlceras pépticas, adeno-carcinoma gástrico y de colon y desordenes linfoproliferativos como Linfoma-MALT (Kusters *et al.*, 2006).

Se sabe que el 50% de la población mundial está infectada por *H. pylori*, y en los países en desarrollo puede estar presente en el 80% de la población adulta, y menos del 40% en países primermundistas, adquiriendo la infección desde temprana edad (Kusters *et al.*, 2006; Marshall, 2002)

La colonización gástrica producida por *H. pylori* produce gastritis histológica en todos los individuos infectados, pero sólo una minoría desarrollará todos los signos clínicos evidentes de la infección; sólo del 10 al 20% de los individuos infectados en algún momento presentarán úlceras pépticas, las cuales serán más comunes en el duodeno que en el estómago (Marshall 2005) y sólo el 1-2% desarrollarán cáncer gástrico distal (Kusters *et al.*, 2006). En la figura (2.2.1) se muestra un diagrama con la epidemiología asociada a las enfermedades producidas por *H. pylori*, el círculo grande refleja la población mundial entera, dentro de la cual se encuentra el 30% que está infectado con la bacteria (oscuro). La mayor parte de los individuos que desarrollan cáncer duodenal, úlcera duodenal, úlcera gástrica, cáncer gástrico y linfoma gástrico están infectadas con *H. pylori*. Este tipo de enfermedades no son comunes en

personas no infectadas.

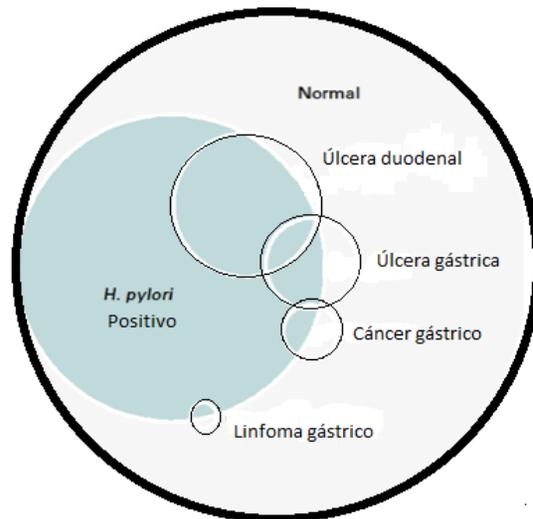


Figura 2.2.1 Epidemiología y asociaciones de las enfermedades producidas por *H. pylori* (Marshall, 2002).

Actualmente está firmemente establecido que *H. pylori* causa más del 90% de úlceras duodenales y más del 80 % de úlceras gástricas, la relación entre la infección con *H. pylori* con la subsecuente gastritis y las úlceras pépticas fueron establecidas a través de estudios en voluntarios, estudios epidemiológicos y estudios con tratamientos antibióticos (Marshall, 2005).

El riesgo de desarrollar alguno de estos desórdenes por presencia de *H. pylori* depende de una variedad de factores, tanto ambientales como del tipo de células huésped, los cuales estarán relacionados con el patrón de severidad de la gastritis (Kusters *et al.*, 2006).

2.3 Aspectos clínicos de las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*

La colonización con *H. pylori* prácticamente siempre conduce a la infiltración en la mucosa gástrica de células mononucleares y neutrófilos en ambas zonas: antro y cuerpo (Kusters *et al.*, 2006). Cuando la colonización se vuelve persistente, existe una estrecha relación entre el nivel

de ácido secretado y la distribución de la gastritis. Esta relación resulta de los efectos contraproducentes del ácido en el crecimiento bacteriano, contra aquellos del crecimiento bacteriano asociados a la inflamación de la mucosa en la regulación y secreción de ácido. Esta relación será de gran importancia en la determinación de los efectos de la infección (Kusters *et al.*, 2006).

En la figura (2.3.1) se muestra una imagen del estómago y las distintas zonas donde *H. pylori* se aloja.

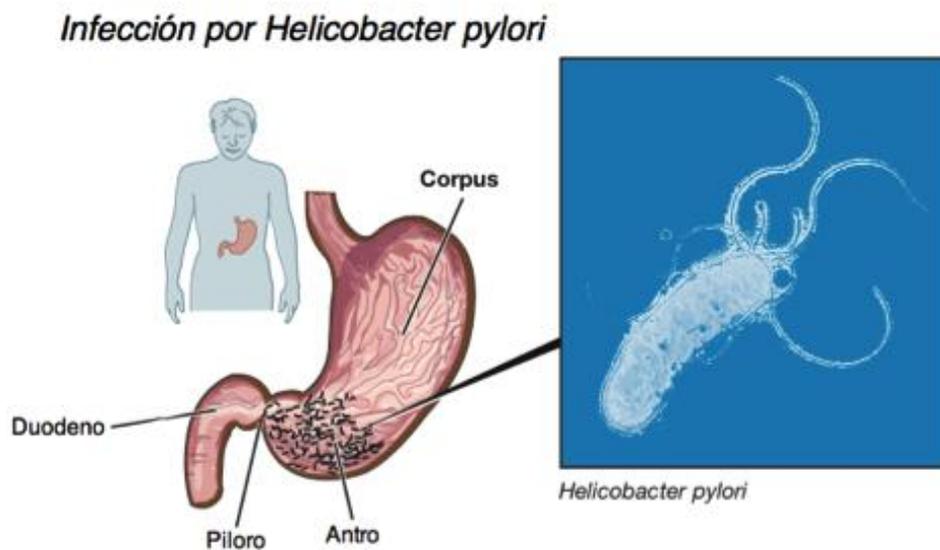


Figura 2.3.1 Zonas del estómago donde se aloja *H. pylori*. “Comunicado de prensa 2005 premio Nobel en medicina y fisiología”. 24 Nov 2010”

En pacientes con secreción de ácido intacta, *H. pylori* en particular coloniza la parte del antro donde hay pocas células parietales secretoras de ácido. En pacientes en los que la secreción de ácido se ve afectada por algún tipo de mecanismo, se tiene una distribución de bacterias en el antro gástrico y en el cuerpo. Las bacterias en el antro gástrico están en contacto cercano con la mucosa, conduciendo a una pangastritis predominante en el corpus.

Estudios muestran que los pacientes con genotipos pro-inflamatorios tienen un mayor riesgo de tener pangastritis (gastritis aguda) predominante en el corpus y con esto una predisposición a gastritis atróficas, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.

La inflamación crónica en la parte distal del estómago causada por la infección de *H. pylori* provoca un incremento en la producción de ácido de la parte no infectada del estómago, esto predispondrá el desarrollo de úlceras en la parte del duodeno que es más vulnerable. La infección causa inflamación de la mucosa gástrica e infiltración de polimorfonucleares a la parte baja del estómago (antro) (Marshall, 2005).

En algunos individuos *H. pylori* también infecta la región del cuerpo del estómago, esto provoca la propagación de la inflamación que predispone no solo a úlceras, también a cáncer de estómago; éste tipo de cáncer ha ido disminuyendo en su incidencia en mucho países desarrollados en los últimos veinte años, por lo que se ha observado también en estos lugares la disminución de úlceras pépticas y cáncer duodenal (Kusters *et al.*, 2006). En la figura (2.3.2) se presenta un esquema de las enfermedades asociadas a *H. pylori* con respecto a la zona del estómago donde se aloje la bacteria.

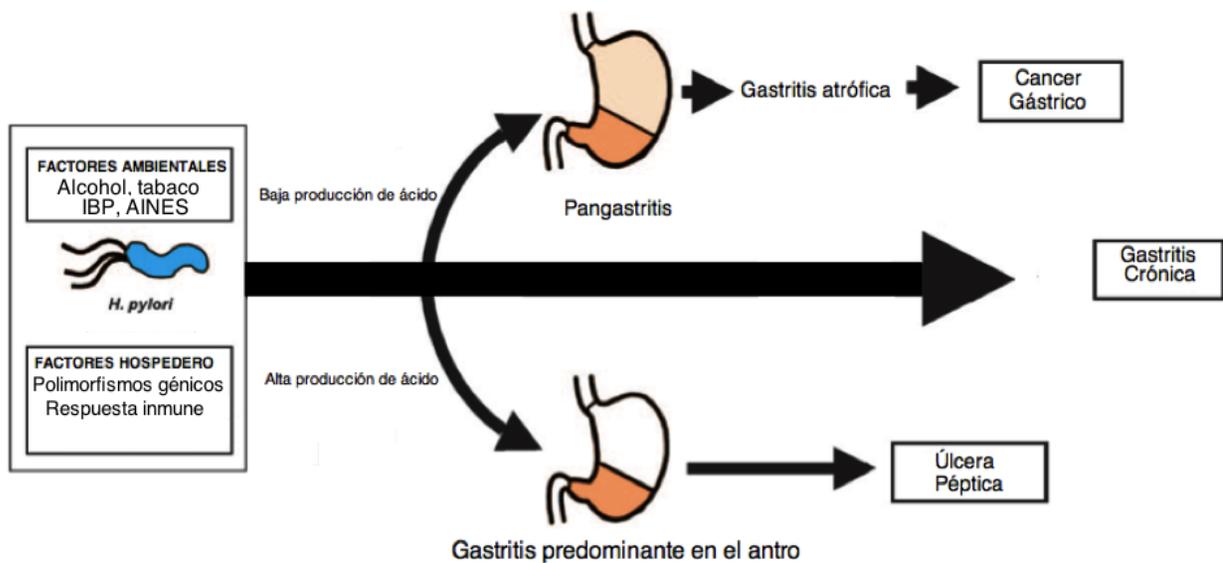


Figura 2.3.2 Representación esquemática de los factores que contribuyen a la patología gástrica y las enfermedades que provoca la infección con *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006).

2.4 Formas de transmisión y fuentes de infección

El modo de transmisión de este patógeno ha sido fuertemente debatido y hasta el momento no se ha determinado con exactitud (Kusters *et al.*, 2006). Dado que este microorganismo coloniza la mucosa gástrica y que se ha demostrado la presencia de formas potencialmente infecciosas en la saliva y las heces de individuos infectados, se han propuesto tres rutas de transmisión: la fecal-oral, gástrica-oral y la oral-oral (mediante la saliva por contacto persona a persona).

Se ha sugerido que la bacteria puede existir de forma natural en el ambiente (Kusters *et al.*, 2006), pero en estudios más recientes se ha evidenciado que el ambiente acuático puede ser un reservorio de *H. pylori* (Cellini *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2005). Sin embargo ninguna ruta *per se*, es capaz de explicar con exactitud su transmisión, ni cómo el microorganismo abandona su hospedador y entra en el ambiente, o dónde reside en el ambiente, ni como las personas adquieren la infección.

Diversos estudios epidemiológicos y ambientales son consistentes en plantear que el agua juega un rol importante en la transmisión (Klein *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1996; Bunn *et al.*, 2002; Cellini *et al.*, 2004). Se ha determinado que *H. pylori* está presente en diversas fuentes de aguas: lagos, ríos, agua potable superficial, subterránea, aguas municipales, residuales y ambientes marinos costeros. En la tabla (2.4.1) se presentan las fuentes de agua donde se ha detectado *H. pylori*, así como el método de detección.

Algunas evidencias sobre la ruta de transmisión acuática de este microorganismo a humanos fueron aportadas por estudios epidemiológicos realizados en algunos países como: Perú, Colombia, Chile y Venezuela. En Lima, Perú, se demostró la asociación entre la permanencia de *H. pylori* en niños y el consumo de fuentes externas de agua, un estudio similar en los Andes concluyó en el incremento de las tasas de infección con el uso de arroyos como fuente de agua potable (Fernández *et al.*, 2008).

Los resultados de estos estudios indican que el agua puede ser un intermediario en la transmisión fecal-oral, actuando como un reservorio en el cual la bacteria puede permanecer

por periodos prolongados antes de ser ingeridos como agua potable o accidentalmente durante el baño o a través de alimentos contaminados (Fernández *et al.*, 2008).

TABLA 2.4.1 FUENTES DONDE SE HA DETECTADO *H. pylori* Y LAS TÉCNICAS DE SU IDENTIFICACIÓN (FERNÁNDEZ ET AL., 2008)

Métodos	Fuente de agua	Referencias
Cultivo	Aguas residuales	Lu <i>et al.</i> , 2002.
	Agua de pozo contaminada <i>in vitro</i>	Degnan <i>et al.</i> , 2003.
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007.
PCR	Agua potable, superficial y subterránea	Hulten <i>et al.</i> , 1996; Hulten <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Baker y Hegarty, 2001; Horiuchi <i>et al.</i> , 2001; Park <i>et al.</i> , 2001; Bunn <i>et al.</i> , 2002; Watson <i>et al.</i> , 2004; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2005.
	Aguas residuales	Hulten <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; Lu <i>et al.</i> , 2002; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Lagos y ríos	McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Moreno <i>et al.</i> , 2003; Fujimura <i>et al.</i> , 2004; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2004; Carbone <i>et al.</i> , 2005; Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007.
Inmunofluorescencia	Agua potable, superficial y subterránea	Hegarty <i>et al.</i> , 1999; Baker and Hegarty, 2001.
FISH	Aguas residuales	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Ríos	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Agua marina	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Aguas de riego	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.

En México, la prevalencia de la infección por *H. pylori* se determinó por la presencia de anticuerpos IgG contra extractos de células enteras. Según los resultados, el 20% de los niños resultaron ser seropositivos para *H. pylori* a la edad de 1 año y 50% están infectados a la edad de 10 años. Más del 80% de los adultos son seropositivos a la edad de 25 años (Torres *et al.*, 1998).

Basados en un pequeño número de estudios sobre los factores ambientales que afectan a *H. pylori*, como ha sido la supervivencia de las bacterias en el agua destilada, agua salina, y agua de mar artificial se ha observado la presencia de la bacteria durante un período de 1-16 días. West *et al* muestran un intervalo de pH óptimo en el agua del ambiente para la supervivencia de *H. pylori* entre 5 a 6, pero se sabe que tolera un amplio rango de pH (Mazari *et al.*, 2001).

Varias investigaciones han examinado el posible papel de las biopelículas en las propuestas de transmisión de *H. pylori* en el agua y han demostrado que *H. pylori* es capaz de formar biopelículas en condiciones de alto contenido de nutrientes así como su persistencia en especies de biopelículas mixtas de agua potable (Linke *et al.*, 2010). Está documentado la presencia de DNA de *H. pylori* en la biopelícula de una tubería del sistema de distribución hecha de hierro fundido, por lo que las células de *H. pylori* que entren en un sistema de distribución pueden ser capaces de sobrevivir dentro de la matriz de las biopelículas en los sistemas de abastecimiento (Baker *et al.*, 2002).

2.5 Implicaciones de la morfología de la bacteria en la salud pública

Se ha postulado que la incapacidad de cultivar *H. pylori* del ambiente se debe a su transformación a su estado viable pero no cultivable (VNC). Las células que han entrado en este estado ya no son cultivables en medios bacteriológicos de rutina, aunque siguen siendo infectivas; la entrada de la bacteria en el estado viable no cultivable es inducida por una variedad de condiciones adversas, tales como la disminución de la temperatura o el agotamiento de nutrientes (She *et al.*, 2003).

Se sugiere que a medida que entra en el estado VNC en el ambiente, existe un cambio morfológico observado en las células de *H. pylori*, por lo tanto, en el ambiente todas las formas morfológicas de esta bacteria estarán presentes en su forma VNC y algunas podrán ser viables y otras no.

Si la bacteria se encuentra en su forma cocoide en un estado VNC puede ser capaz de infectar a su huésped, como se ha sugerido. En el estudio realizado por Fei *et al.*, se encontró que la virulencia de las formas cocoides que fueron inducidas a partir de formas bacilares a través de

cultivos en agua destilada, se mantenían considerablemente activan para infectar a su huésped pero en menor grado que las formas bacilares, esto se probó en ratones y se alcanzó a observar la existencia de pili en las formas cocoides lo cual ayuda a la motilidad de la bacteria la cual está relacionada con su habilidad infecciosa.

3. DESINFECCIÓN CON OZONO

3.1 Técnicas de desinfección

H. pylori es inactivada por el cloro libre en agua potable y por tanto puede ser controlada por esta práctica. Sin embargo, existe evidencia que muestra que *H. pylori* puede sobrevivir en los sistemas de distribución de agua, ya que puede estar presente en las biopelículas debido a que las dosis residuales de cloro a través de los sistemas de distribución pueden no ser suficientes para su inactivación (Baker *et al.*, 2002).

Los desinfectantes oxidantes como: cloro, cloraminas y ozono son la última barrera para inactivar microorganismos y virus. Éstos son los desinfectantes comúnmente utilizados para el agua potable. El hipoclorito se ha utilizado como desinfectante por más de 100 años y es letal para la mayoría de los microorganismos, la monocloramina (NH_2Cl) producida por la reacción del cloro libre y amonio en un proceso llamado cloración, es generalmente considerado un candidato como alternativa al cloro libre.

Si bien en países en vías de desarrollo por razones económicas no es tan común como el cloro o monocloramina, el uso de ozono es cada vez mayor para cumplir con la normatividad referente al control de la formación de organoclorados. Las ventajas del uso del ozono en el agua potable son su potencial de oxidación superior a otros desinfectantes y su rápida descomposición del ozono residual a oxígeno.

La aplicación de ozono en el tratamiento de agua potable es usado en todo el mundo, la principal razón es la desinfección y en algunos casos particulares la oxidación; este último con

el fin de eliminar sabor, olor, micro contaminantes, etc. o una combinación de estas. Al igual que otros desinfectantes para el tratamiento de agua como el cloro o el dióxido de cloro, el ozono es inestable en el agua pero experimenta reacciones con algunos componentes típicos del agua. Sin embargo, su característica única de descomposición en radicales $\bullet\text{OH}$, lo hace un método muy efectivo por ser un oxidante fuerte ya que logra inactivar a los microorganismos rápidamente por que reacciona con las enzimas intracelulares, con el material nucleico, con los componentes de su envoltura celular y con capas de esporas o cápsides víricas.

El ozono es un desinfectante excelente y es capaz de inactivar los microorganismos patógenos más resistentes como son los protozoarios (*Cryptosporidium parvum*), en comparación con otros desinfectantes convencionales los cuales no lo logran. Si la exposición al ozono es muy alta y existe la presencia de bromuros, esto puede conducir a la formación de bromato en particular, el cual es considerado como un potencial carcinógeno. El bromato es particularmente problemático, porque a diferencia de muchos otros subproductos orgánicos no se biodegrada en filtros biológicos que suelen seguir a los procesos de ozonización (Baker *et al.*, 2002).

3.2 Solubilidad del ozono en agua

El gas ozono no reacciona con el agua por lo tanto forma una solución; la disolución de los gases que son parcialmente solubles en agua como el ozono siguen la ley de Henry, la cual establece que la cantidad de gas en solución, a una temperatura dada, es linealmente proporcional a la presión parcial del gas. La concentración de saturación (C_s) del ozono disuelto en agua bajo condiciones termodinámicas ideales sigue la ecuación (3.2.1).

$$C_s = \beta M P_\gamma$$

C_s : Concentración de saturación [$\text{kg O}_3/\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$]

M : Masa volumen de ozono [kg/m^3]

β : Coeficiente de absorción, volumen de ozono disuelto por unidad de volumen de agua .

P_γ : Presión parcial del ozono en la fase gas

La solubilidad en el agua es mayor para el ozono que para el nitrógeno y oxígeno, los valores β son: 0.64, 0.0235 y 0.049, respectivamente. El ozono, sin embargo, es menos soluble en agua que el dióxido de carbono ($\beta=1.71$) y que el cloro ($\beta=4.71$).

La disolución del ozono en agua también puede ser expresada por medio de un término más práctico como lo es la tasa de solubilidad (S_r) expresada en la ecuación (3.2.2).

$$S_r = \frac{\text{mg/L O}_3 \text{ en H}_2\text{O}}{\text{mg/L O}_3 \text{ en fase gas}}$$

La tasa de solubilidad del ozono incrementa conforme la temperatura del agua disminuye, pero existen otros factores que tienen influencia en la disolución del ozono en el agua, como lo es la presión o el tamaño de burbuja. En un sistema de contacto por medio de difusores mientras más pequeño sea el diámetro de burbuja (1-3 mm), mayor será el área de contacto entre el gas y el líquido.

La pureza y el pH del agua afectan en gran medida la velocidad de solubilización del ozono, por ejemplo burbujear ozono en agua doblemente destilada y desionizada es más rápido que en el agua de la llave, ya que el agua de la llave tiene diversos componentes que alteran su pH.

El pH alto del agua de la llave (pH=8) puede desestabilizar al ozono, y por lo tanto disminuye la tasa aparente de solubilización, por lo tanto conforme se incremente el pH del agua la solubilidad del ozono decrece.

El agua de la llave puede contener materia orgánica que consume ozono o la presencia de minerales en el agua también pueden catalizar la descomposición de ozono. Por lo tanto, la solubilidad del ozono aumenta cuando la pureza del agua aumenta (Hoigné *et al.*, 1985).

3.3 Estabilidad del ozono en agua

El ozono es relativamente inestable en soluciones acuosas, se descompone de forma continua y lentamente de acuerdo a una pseudoreacción de primer orden. La vida media del ozono en el agua destilada a 20 °C es generalmente de 20 a 30 minutos.

De acuerdo con Hoigné *et al.*, 1985 la descomposición del ozono incluye varios pasos, como la iniciación, promoción y reacciones de inhibición de acuerdo a la figura (3.3.1).

El primer paso es el de iniciación (paso limitante) el cual da lugar a la formación de dos radicales libres: el ion radical superóxido (O_2^-) y su forma hidrogenada el radical hidroperóxido (HO_2). La formación de estos radicales da lugar a la generación del radical hidroxilo altamente reactivo (OH) y el consumo de una molécula de ozono. El ion ozónido radical (O_3^-) se forma como un producto intermediario de reacción.

El segundo paso incluye las reacciones de promoción en donde se regeneran los radicales OH y O_2^- . El tercer paso son las reacciones de inhibición que se refieren a las reacciones que llevan al consumo del radical hidroxilo, pero sin la regeneración de los iones superóxidos.

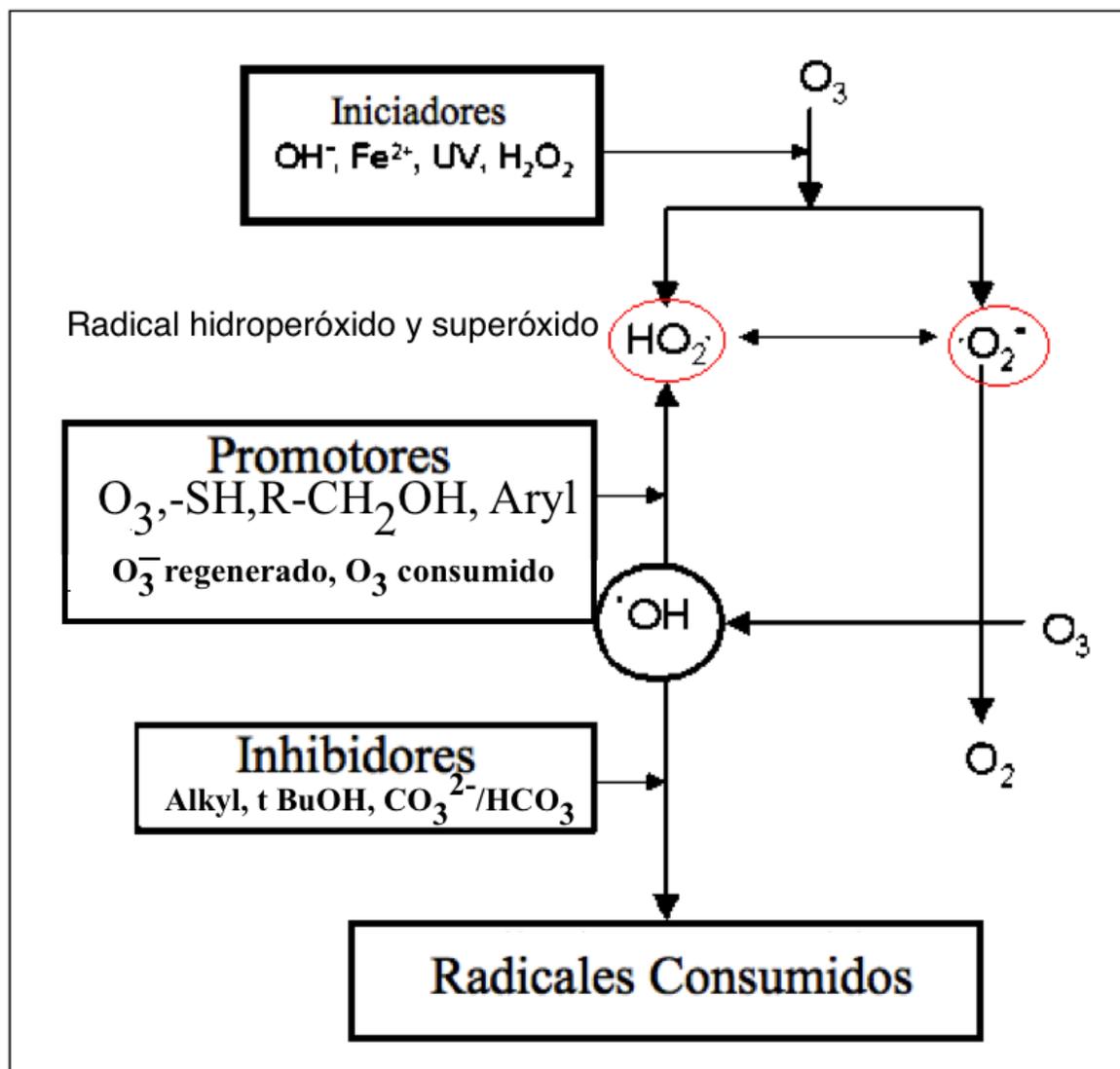


Figura 3.3.1 Reacciones de descomposición del ozono.

3.4 Técnicas para la medición de ozono

Existen métodos físicos, químicos y fisicoquímicos que se utilizan para la determinación del ozono. Los métodos físicos miden la absorción directa en el espectro en la región del ultravioleta, visible e infrarrojo. Los métodos físico químicos son dependientes de efectos tales como el calor o quimioluminiscencia causada por la reacción. Los métodos químicos

cuantifican los productos que se generan cuando el ozono reacciona con un reactivo químico como el yoduro de potasio.

El método de índigo comúnmente utilizado es preciso, rápido y sensible con un nivel más bajo de detección de 0.001 mg/L. El reactivo de índigo reacciona aditivamente con el doble enlace carbono-carbono del colorante, causando decoloración y el cambio en el color es determinado por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. La medición del ozono por el método de índigo no se ve comprometida por la presencia de peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos, iones manganosos, y especies oxidadas en el agua potable. En comparación con el método yodo-métrico, el método índigo es más adecuado para medir ozono residual.

3.5 Cinética de la inactivación microbiana por acción del ozono

El ozono es un fuerte agente de amplio espectro antimicrobiano altamente activo contra diversos microorganismos como: bacterias, hongos, virus, protozoarios y esporas bacterianas y fúngicas. La información acerca de la sensibilidad de un microorganismo particular varía entre los diversos estudios.

Algunos de los factores que pueden crear diferencias entre la comparación de diferentes estudios son: el tipo de cepa del microorganismo, la edad del cultivo, la densidad de la población tratada, la presencia de agentes del medio que consumen ozono, los métodos de aplicación del ozono (ya sea por aplicación directa es decir por burbujeo o por medio de dosis de ozono a partir de una solución acuosa saturada), la precisión de los procedimientos para la medición del ozono, la exactitud de los procedimientos y dispositivos que miden la eficacia antimicrobiana (por ejemplo determinaciones de un solo punto o determinaciones de estudios cinéticos) (Langlais *et al.*, 2000).

La cinética de la desactivación de los microorganismos patógenos (desinfección) es comparable a una reacción química. El modelo más comúnmente utilizado para describir la desinfección del agua por ozono es la ley de Chick-Watson. Esta ley puede ser representado matemáticamente como sigue :

$$k=C^n t$$

k = constante de reacción, depende del tipo de microorganismo y el desinfectante

C=concentración del desinfectante

t = tiempo de contacto, es decir el período de tiempo que el desinfectante se encuentra en contacto con el agua

n = constante

En la mayoría de los casos n es igual a 1, haciendo que la desactivación de bacterias se convierta en una reacción de primer orden. Cuando la constante n es “casi igual” a 1, la ley de Watson se puede abordar como:

$$k = Ct$$

La determinación de la cinética de inactivación microbiana de un sistema de tratamiento continuo puede expresarse mediante valores CT. Basado en este concepto, el CT es una medida de la concentración de desinfectante en mg/L (C) y multiplicado por el tiempo en minutos (T) requerido para alcanzar un nivel dado de inactivación de un microorganismo.

El concepto CT incluye el valor de la dosis de ozono; la determinación exacta de la concentración del ozono se obtiene generalmente como ya se mencionó en forma continua en el agua y por titulación en fase gaseosa. Cabe señalar que en solución acuosa la medición debe ser continua debido a la rápida descomposición del ozono.

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

- 1 reducción log = desactivación 90%
- 2 Reducción log = desactivación 99%
- 3 Reducción log = desactivación 99,9%
- Reducción de 4 log = desactivación 99,99%

Muchas investigaciones se han llevado a cabo sobre los valores CT para varios tipos de microorganismos y para diversos desinfectantes. Los datos sobre valores CT en la literatura pueden ser diferentes. Para la comparación de desinfectantes, el valor CT siempre debe estar asociado con la reducción logarítmica (Gunten, 2002)

3.6 Estructura de los constituyentes celulares

Los constituyentes celulares son macromoléculas que por lo regular tienen un alto peso molecular, con enlaces de baja energía. En general los componentes celulares pertenecen al grupo de la química orgánica.

El estudio de los efectos del ozono en las células es complicado ya que se necesitan técnicas analíticas avanzadas capaces de medir los componentes de la ozonación y sus subproductos. Por otro lado la gran cantidad de sitios en los componentes celulares pueden inducir diferentes tipos de mecanismos directos de reacciones de ozonación así como reacciones a través de radicales. Es importante conocer cuáles son las estructuras celulares más sensibles ya que la destrucción de estas llevará a la muerte celular.

Carbohidratos: Los carbohidratos son un importante componente celular, dentro de los cuales se encuentran los monosacáridos que son poli alcoholes cíclicos (5-8 átomos de carbón) que incluyen estructuras como hexosa y pentosa. La combinación de dos hexosas por medio de un enlace glucosídico forma un disacárido y conforme se agrega un grupo más se obtienen los polisacáridos. Otros componentes celulares pueden ser azúcares principalmente glicolípidos (lipopolisacáridos) y glicoproteínas (McKee, 2011).

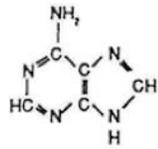
Proteínas: Son polipéptidos y son uno de los grupos más complejos y esenciales de la célula, están formadas de polímero de aminoácidos unidas por cadenas peptídicas, donde las proteínas se conjugan con lípidos para hacer lipoproteínas o glúcidos para formar glicoproteínas. Cada proteína tiene una estructura específica como formas enrolladas o hélices.

Lípidos: Los lípidos simples son glicerol y ésteres de ácidos grasos (saturados e insaturados), combinados con lípidos son fosfolípidos (Esterificación de glicerol fosfato y ácido graso) y glicolípido (polisacárido con ácido graso combinado). Independientemente de los antes mencionados, algunos lípidos como esteroides, pigmento y vitaminas presentan una estructura más compleja.

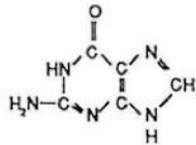
Material nucleico: El material nucleico es muy importante y está conformado por las nucleótidos bases, las cuales se derivan por un lado de la purina (Adenina y guanina) y de la pirimidina (uracilo, timina y citosina). Una de estas bases, la ribosa (desoxirribosa) y el ácido fosfórico ligado por enlaces carbón-nitrógeno y carbón-oxígeno, constituyen una clase de nucleótido precursor del ácido nucleico, ácido ribonucleico (RNA) y desoxirribonucleico (DNA). Por último la adenina es parte de la estructura de otras moléculas de interés como adenosina trifosfato incluyendo tres coenzimas esenciales (NAD^+ , FAD y CoA). En la figura (3.6.3) se muestra una imagen del DNA y el RNA.

En la imagen (3.6.1 y 3.6.2) se muestran las estructuras de los principales compuestos orgánicos de las células.

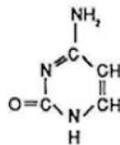
Nucleobases



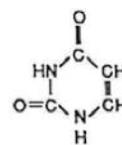
Adenina
(A)



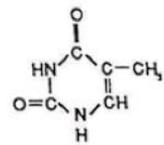
Guanina
(G)



Citosina
(C)

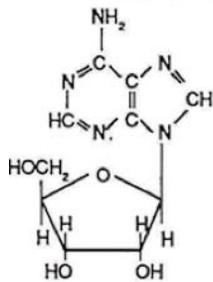


Uracilo
(U)

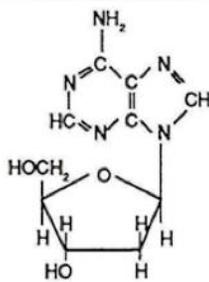


Timina
(T)

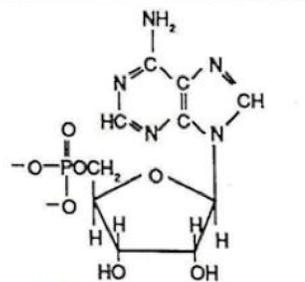
Nucleosidos



Adenosina



Deoxiadenosina



Adenosín monofosfato cíclico
(AMP)

Nucleotidos

AMP, GMP
CMP, UMP
dAMP, dGMP
dCMP, dTMP

Ácidos nucleicos

DNA

Ácido fosfórico
2- Deoxiribosa
Timina
Citosina
Adenina
Guanina

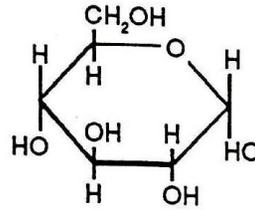
RNA

Ácido fosfórico
Ribosa
Uracilo
Citosina
Adenina
Guanina

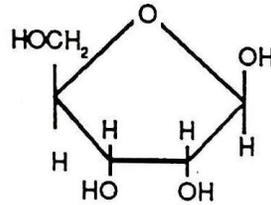
Figura 3.6.1 Principales compuestos del material nucleico(Langlais et al.,2000).

Sacáridos

Hexosa- Glucosa

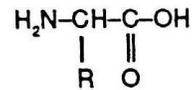


Pentosa- Ribosa



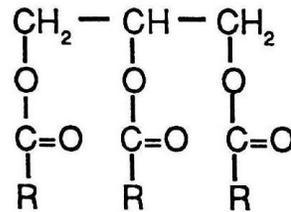
Aminoácidos

R= Alquilo, aromático, alquilo sulfurado.



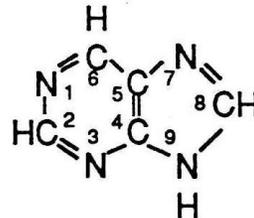
Lípidos

R= Grupos alquilo saturados e insaturados



Nucleobases

Purina- Adenina y guanina



Pyrimidina- Uracilo, timina y citosina

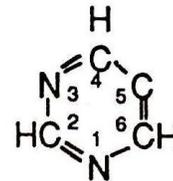


figura 3.6.2 Principales compuestos orgánicos dentro de la célula (McKee 2011)

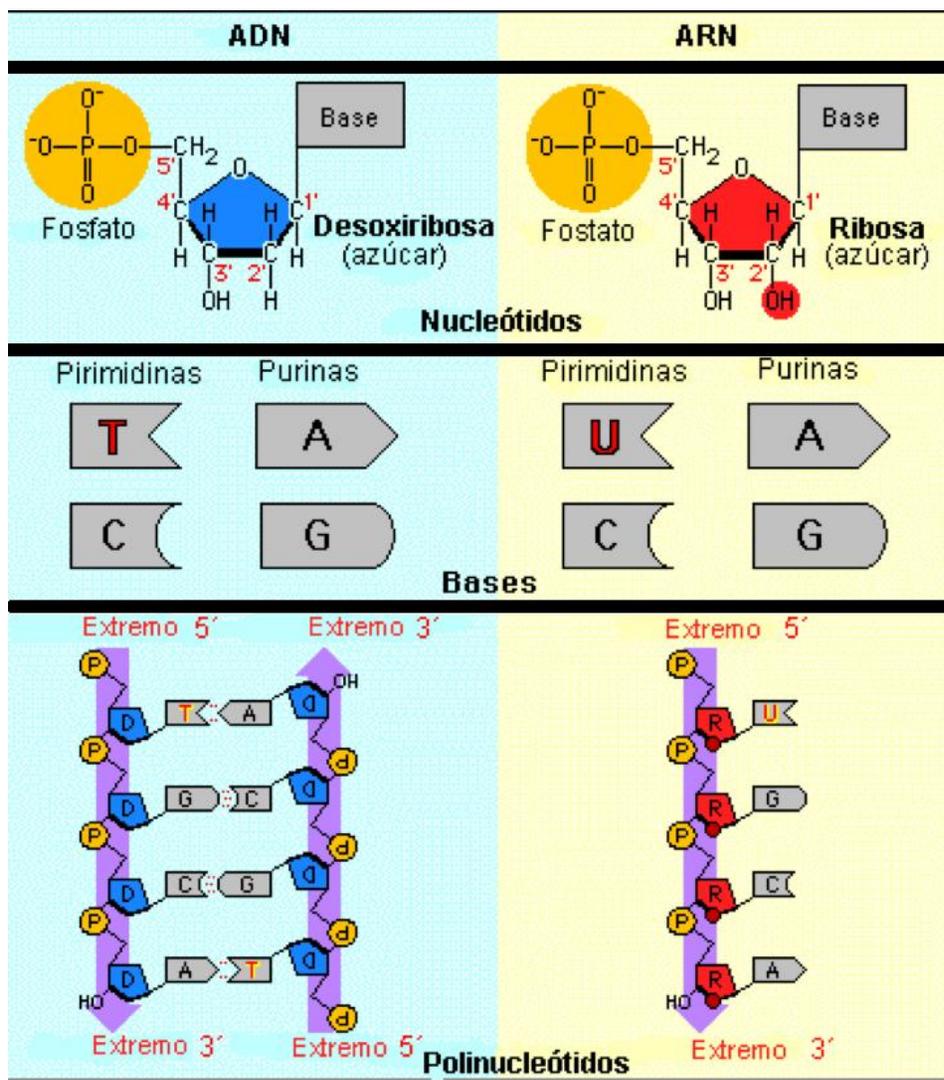


Figura 3.6.3 Esquema del DNA y RNA

3.7 Reactividad del ozono con los constituyentes de la célula

La molécula de ozono actúa como dipolo con propiedades electrófilas y nucleófilas. Los compuestos orgánicos e inorgánicos en soluciones acuosas siguen dos vías de reacción con el ozono, una directa y una indirecta por la acción de los radicales OH.

Los mecanismos por los cuales se explica la aguda acción del O₃ pueden ser descritos por medio de categorías, las cuales se muestran a continuación:

- Formación de radicales libres e intermediarios reactivos;
- Iniciación de reacciones en cadena de peroxidación de lípidos;
- Pérdida oxidativa de grupos funcionales y de las actividades de biomoléculas incluyendo enzimas;
- Alteraciones de permeabilidad de la membrana;
- Inducción de inflamación;
- Iniciación de procesos secundarios.

El ozono provoca una oxidación de los diversos grupos funcionales, por ejemplo en los grupos: sulfhidrilo, amina, alcohol, aldehídos (presentes en las proteínas), enzimas, ácidos nucleicos, membranas y otras biomoléculas grandes y pequeñas. Ambos mecanismos pueden ocurrir de forma directa por la acción de los radicales libres y la oxidación puede alterar el estado redox celular y algunas funciones metabólicas.

Dado que las funciones de las proteínas, enzimas, coenzimas, y otras biomoléculas, que contienen grupos sulfhidrilo (SH) en los sitios activos se pueden perder o alterar tras la oxidación, ésta representa una de las principales vías de acción del ozono (Mustafa, 1990).

Sacáridos

El ozono reacciona lentamente con los polisacáridos ya que no contienen sitios nucleofílicos fuertes, dando lugar al rompimiento de los enlaces glucosídicos, seguido por la oxidación de las funciones alcohólicas de los monosacáridos libres y eventualmente a la formación de ácidos alifáticos, peróxido de hidrógeno y aldehídos. La reacción de ozonación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios puede conducir a la formación de hidroperóxidos, precursores de radicales hidroxilo, que a su vez reaccionan fuertemente con los hidrocarburos. Se sabe que la N-acetil glucosamina, un compuesto presente en el peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas y en cápsidas víricas, puede llegar a ser resistente a la acción del ozono en solución acuosa a un pH de 3 a 7 (Pérez et al., 1995).

La ozonación de la glucosa, xilosa, y celobiosa a pH ácido sin radical hidroxilo, provoca la formación de ácido fórmico y glucónico, otros autores han encontrado formaldehído y ácido pirúvico.

La glucosamina reacciona relativamente rápido con el ozono, pero la glucosa es relativamente resistente a la degradación, esta observación podría explicar al menos en parte, la gran resistencia de las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas; las primeras contienen una mayor cantidad de peptidoglicano en sus paredes celulares (Khadre *et al.*, 2001).

Aminoácidos

Los aminoácidos pueden reaccionar con el ozono de dos maneras dependiendo de la estructura que se ataque; ya sea al grupo amina o el grupo R. Es sabido que con respecto a la función primaria de la amina, la reactividad del ozono es muy dependiente del pH (Langlais, 2000). Los productos que pueden ser encontrados son hidroxilamina, oximas o amidas y finalmente aldehídos, ácidos y iones nitrato.

El grupo R de los aminoácido puede ser un grupo alquilo (alifático saturado), alquilo sulfuro o un grupo aromático heterocíclico insaturado (imidazol o indol). En el primer caso con el grupo R substituido por un grupo alquilo, el ozono es poco reactivo a pH ácidos como es el caso con las alquilaminas. Sin embargo al aumentar el pH se acelera la velocidad de reacción como es el caso con la glicina, alanina y leucina. Así como con las alquilaminas, el ozono será reactivo por el proceso electrofílico sobre el nitrógeno y finalmente se conducirá a la descarboxilación parcial además de generar un residuo de ácidos aldehídos, iones nitrato y amoniaco.

En el segundo caso del grupo R cuando es substituido por un grupo alquilo sulfuro, la reactividad del ozono es muy alta aún a pH ácido e incrementan proporcionalmente con el aumento en el pH. La reacción central se da en el átomo de azufre oxidandandolo a un sulfóxido o a un grupo sulfónico.

En el tercer caso del grupo de substitución R (Aromáticos o heterocíclicos insaturados), el ataque del ozono puede ocurrir ya sea en el grupo R de la amina o en la amina, dependiendo del pH y los productos que se pueden formar son ácidos alifáticos aromáticos y aldehídos.

Lípidos

La producción de radicales libres se ha detectado durante la reacción entre el ozono y los ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Se cree que algunos de los radicales de ozono libres inducidos en los sistemas biológicos se derivan de la descomposición oxidativa de los AGP.

Los ácidos grasos saturados son el constituyente principal de los lípidos, estos reaccionan muy poco con el ozono. Sin embargo su reactividad aumenta conforme se tengan varios enlaces etilénicos en la cadena carbonatada. Cuando esto ocurre los principales productos de ozonación son: aldehídos, ácidos y peróxido de hidrógeno. Con esto se demuestra un probable ataque del ozono al ciclo de adición dipolar 1-3 del doble enlace.

Se piensa que la per oxidación de los lípidos de membrana es el mecanismo más importante de lesión del O₃. La reacción inicial (no radical) AGP es una adición de O₃ al doble enlace carbono-carbono, produciendo un intermediario llamado trioxígeno (1,2,3 trioxolano), que se reordena a un ozónido por el mecanismo de Criegee. El ozónido se descompone para producir peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Los ácidos grasos con un doble enlace y epóxidos de colesterol producen epóxidos y aquellos con dos o más conjuntos de dobles enlaces dan lugar a dialdehídos (por ejemplo, malonaldehído) e hidroperóxidos.

Los dos componentes principales de las membranas son los lípidos y las proteínas. La oxidación de los ácidos grasos insaturados en los lípidos y de los susceptibles aminoácidos de las proteínas, pueden alterar fuertemente las propiedades biológicas de las membranas, por ejemplo la habilidad de regular la permeabilidad. En este sentido los principales sitios de daño del O₃ pueden ser las membranas de las células y organelos intracelulares, que contienen grandes cantidades de AGP en sus fosfolípidos (Mustafa, 1990).

Enzimas

Varios autores se refieren a la inactivación de las enzimas como un mecanismo importante por el cual el ozono mata a las células. Se sabe que el cloro destruye ciertas enzimas, mientras que el ozono actúa como un oxidante protoplásmico general. Otra vía general de destrucción del ozono en células de *E. Coli* es a través de la destrucción de los sistemas enzimáticos

deshidrogenantes en la célula, esto es interfiriendo con el sistema respiratorio. La inactivación de las enzimas por el ozono es probablemente debido a la oxidación de grupos sulfhidrilo en los residuos de cisteína.

Material nucleico

La purina y la pirimidina son las principales estructuras de las cinco nucleobases que forman nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. Sin considerar la baja reactividad del ozono con la purina y la pirimidina, sus correspondientes bases nucleicas reaccionan rápidamente con el ozono, como lo demuestran los estudios cinéticos de Doré et al 1989. En el estudio realizado por Ishizaqui et al 1984 proponen la siguiente secuencia de reactividad Timina > Uracilo > Guanina > Adenonina > Citosina.

La reacción del ozono acuoso con los ácidos nucleicos *in vitro* apoya la idea de que se puede dañar el material nucleico dentro de la célula. En otro estudio el ozono abrió el plásmido circular y redujo su capacidad de transformación, produciendo rupturas simples y de doble cadena del DNA, y la disminución de la actividad de transcripción.

El ozono en solución induce divisiones en la estructura del DNA de doble cadena, principalmente en el enlace desoxirribosa-fosfato, por acción de radicales hidroxilo, produciendo la liberación de carbohidratos y iones fosfatos.

4. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA

Desde los brotes de cólera en Londres en el siglo XIX descubiertos por John Snow donde se asoció el brote de cólera a una fuente de agua comunitaria, se comenzó a tener en cuenta la calidad del agua para consumo humano. La Organización Mundial de la salud reporta millones de muertes por enfermedades diarreicas adquiridas principalmente por falta de salubridad en el agua de consumo humano.

Los microorganismos de importancia sanitaria están presentes en aguas naturales, aguas residuales domésticas y aguas de escorrentía que contienen las excretas de los seres humanos y animales. Los ríos, lagos y aguas costeras sirven para recibir, diluir y dispersar las aguas residuales domésticas y los residuos no tratados de humanos y animales. El grado de tratamiento de los residuos domésticos varía considerablemente y su influencia en la calidad del agua y la salud sigue siendo un problema importante en todo el mundo. La operación incorrecta con la que operan los sistemas sépticos, el escaso mantenimiento y la aplicación superficial de las aguas residuales y de inyección directa, han dado lugar a la contaminación de las aguas subterráneas. La eutrofización, la perturbación del ecosistema, la toxicidad y la enfermedad, tanto en las comunidades humanas y animales, son consecuencias de la descarga de desechos directamente al ambiente.

La principal fuente de patógenos contaminantes del agua son de tipo fecal; en un estudio realizado por (Bitton, 2011) encontraron que en un gramo de materia fecal se encuentran hasta 10^{12} bacterias, lo que representa el 9% en peso húmedo.

Los principales grupos de bacterias encontrados en el agua residual pertenecen a los siguientes grupos:

- Bacterias Gram negativas anaerobias facultativas: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Shigella*;
- Bacterias Gram negativas aerobias: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*;
- Bacterias Gram positivas formadoras de esporas: *Bacillus spp*;
- Bacterias no formadoras de esporas Gram positivas: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*;

Debido a que el control de todos los microorganismos patógenos no es posible, muchos países han adoptado el concepto de microorganismos indicadores, con este fin los coliformes fecales y totales fueron escogidos debido a que su presencia indica que el agua puede estar contaminada con desechos fecales de animales y humanos.

El uso de microorganismos indicadores para evaluar la desinfección funciona bien siempre y cuando la inactivación de los patógenos no deseados sea al menos tan eficaz como la inactivación de los microorganismos indicadores seleccionados, sin embargo, si la inactivación de los microorganismos indicadores es más eficiente que la inactivación de patógenos, la ausencia de microorganismos indicadores no significa necesariamente que el agua esté libre de contaminaciones.

4.1 Patógenos en los sistemas de distribución de agua

Diversos organismos infecciosos pueden causar enfermedades en los seres humanos, estos agentes incluyen: bacterias, hongos, protozoos, metazoos (helminetos), rickettsias y virus. La evaluación de la infectividad de dichos agentes infecciosos se basa en su virulencia o su potencial para causar enfermedades en humanos. La virulencia está relacionada con la dosis de agente infeccioso necesario para infectar al huésped y causar la enfermedad y el potencial para causar la enfermedad depende de la estabilidad del agente infeccioso en el ambiente. La dosis infecciosa mínima (DI) varía ampliamente con el tipo de agente patógeno o parásito.

Por ejemplo para *Salmonella typhi* o *E. Coli* enteropatógena, miles de millones de organismos son necesarios para establecer la infección, mientras que el DI para *Shigella* puede ser tan baja como 10 células.

Un depósito del agente infeccioso puede ser un ser viviente o no viviente y le permite al patógeno sobrevivir y multiplicarse, por ejemplo el cuerpo humano es la fuente de numerosos agentes patógenos, el agua es un depósito no viviente de agentes infecciosos que tiene consecuencias graves en la salud de la población. A continuación se muestra una lista con los principales patógenos que pueden ser transmitidos a través del agua.

TABLA 4.1.1 ORGANISMOS PATÓGENOS ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN ACUOSA (BITTON, 2011).

Organismo	Principal enfermedad
Bacterias	
<i>Escherichiacoli O157:H7</i>	Síndrome urémico hemolítico
<i>Campylobacterjejuni</i>	Gastroenteritis
<i>Helicobacter pylori</i>	Úlceras pépticas y cáncer de estómago
<i>Shigella spp.</i>	Disentería
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
<i>Shigella</i>	Disentería bacilar
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis
<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedades respiratorias agudas
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Leptospira</i>	Leptospirosis
Virus	
<i>Calicivirus</i>	Gastroenteritis
<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis
<i>poliovirus</i>	Polio
<i>Hepatitis A</i>	Hepatitis infecciosa
Protozoarios	
<i>Giardialamblia</i>	Gastroenteritis
<i>Naegleriafowleri</i>	Meningoencefalitis primaria amebiana
<i>Toxoplasma gondii</i>	Síntomas similares a gripa

4.2 Organismos indicadores

Debido a que el agua puede contaminarse con una gran variedad de patógenos, es necesario detectar dichos contaminantes en el agua para asegurar la calidad de ésta, sin embargo existen millones de patógenos que pueden estar presentes en el agua y sería muy difícil detectarlos a todos; es por esto que se han adoptado diversas técnicas que miden sólo algunas familias de patógenos, y que la presencia de estos indica que pueden estar contenidos muchos más.

Los criterios que debe de cumplir un microorganismo para poder ser considerado como indicador son los siguientes:

1. Debe ser miembro de la micro flora intestinal de animales de sangre caliente;
2. Debe de estar presente cuando los patógenos están presentes y ausente en muestras no contaminadas;
3. Debe estar presente en mayor cantidad que el patógeno;
4. Debería ser al menos igual de resistente que el patógeno a agresiones ambientales y a la desinfección en las plantas de tratamiento de agua;
5. No debe multiplicarse en el ambiente;
6. Debe ser detectable por medio de métodos sencillos, rápidos y de bajo costo;
7. El organismo indicador no debe ser patógeno para el analista;

Los indicadores más comunes que se miden en el agua son:

- Coliformes totales;
- Coliformes fecales;
- Streptococo Fecal;
- Bacterias anaerobias;
- Esporas bacterianas;
- Fagos bacterianos;
- Conteo heterótrofo en placa;
- Indicadores químicos;

4.2.1 Indicadores comúnmente medidos en agua

Coliformes totales: Estos pertenecen al grupo de la familia *Enterobacteriaceae* e incluye bacterias aerobias y anaerobias facultativas; Gram negativo, no formadoras de esporas, forma circular, fermentadoras de lactosa con producción de gas (APHA, 1998)

Coliformes fecales: Este grupo incluye a los coliformes termotolerantes que fermentan lactosa a 44.5°C, esto incluye a los grupos *Escherichia coli* y *Kleibsellla pneumoniae*. La presencia de coliformes fecales indica la presencia de materia fecal de animales de sangre caliente, pero no es fácil distinguir si la fuente pertenece a humanos o animales.

Streptococo Fecal: Este grupo está compuesto por *Streptococcus faecalis*, *S. bovis* y *S. Avium*, que normalmente habitan en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente y que se utilizan para detectar la contaminación fecal en agua. Los miembros de este grupo sobreviven por más tiempo que otros indicadores bacterianos, pero no se reproducen en el ambiente. Un subgrupo del grupo de los estreptococos fecales, los enterococos (*S. faecalis* y *S. faecium*), han sido sugeridos como indicadores útiles para mostrar la presencia de virus, particularmente en los biosólidos y en agua de mar.

Bacterias anaerobias: Dentro de las principales bacterias anaerobias se tienen a las de los grupos: *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides spp.* y *Methanobrevibacter smithii*.

Esporas bacterianas: Esporas aeróbicas no patógenas omnipresente en los medios acuáticos, se producen en grandes concentraciones superando a los quistes de protozoarios parásitos, estos no crecen en el ambiente y su detección es simple, barata y relativamente rápida.

Bacteriófagos: Los colifagos que se utilizan en la evaluación de la calidad del agua se dividen en tres grupos principales: colifagos somáticos, colifagos de ARN F-específicos (específicos para *E. Coli* F+) y los específicos para *B. Fragilis*.

Recuento heterótrofo en placa: El conteo de colonias heterótrofas (RHP) incluye aquellos microorganismos aeróbicos y anaerobios facultativos que obtienen su energía del carbón y de compuestos orgánicos. El número de bacterias recuperadas depende de la composición del medio y del período de incubación.

Este grupo incluye las bacterias Gram negativas pertenecientes a los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Flavo-bacterium*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* y *Moraxella*.

Indicadores químicos: Dentro de esta categoría se encuentran varios grupos como: esteroides, cloro residual, endotoxinas y agentes fluorescentes.

Los esteroides fecales incluyen: coprostanol, colesterol, y coprostanona, algunos investigadores han reportado una correlación entre los esteroides fecales y la contaminación fecal. Una buena relación se encontró entre los niveles de *E. Coli* y las concentraciones de coprostanol (Isobe et al., 2004) bitton. Sin embargo, los esteroides fecales pueden ser degradados después del tratamiento de aguas residuales y pueden no verse afectados por la cloración. Los ácidos biliares (por ejemplo, desoxicólico y ácido litocólico) también son posibles indicadores útiles de la contaminación de las aguas residuales.

Las endotoxinas son lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas y algunas cianobacterias, algunos de los síntomas asociados a las endotoxinas son: fiebre, diarrea, y vómito.

En conclusión, no existe un indicador ideal, ya que ninguno cumple todos los criterios necesarios. Es posible que se tenga que recurrir a pruebas directas para la detección de ciertos patógenos importantes como hepatitis A o parásitos como *Cryptosporidium*. También podría considerarse el uso de un indicador de enterovirus como el de polio y un indicador de protozoarios de *Giardia* para los quistes de protozoarios y parásitos coliformes para patógenos bacterianos.

4.3 Metodologías de detección y conteo de patógenos

Las bacterias se enumeran para una variedad de propósitos que incluyen la detección de la contaminación, la detección de fenotipos o grupos específicos filogenéticos para asegurar el cumplimiento de las regulaciones de calidad del agua (Kator et al., 2003).

La detección y el conteo de bacterias ambientales es un tema extenso que se somete a continuos cambios, esto debido al desarrollo de nuevos métodos. En los últimos años se ha sido testigo de una revolución en las técnicas de detección basadas en la biología molecular, éstas tienen el potencial de reducir el tiempo de obtención de resultados e incrementan la sensibilidad y especificidad de las pruebas, comparadas con las técnicas tradicionales que son hoy en día las más usadas.

Mientras que los métodos moleculares, basados en secuencias de genes específicos, ofrecen la posibilidad de detección simultánea de múltiples agentes patógenos, con lo que se hace frente al problema clásico en la microbiología sanitaria de los distintos tipos de aguas; su aplicación también plantea importantes cuestiones relacionadas con la viabilidad e infectividad de los microorganismos objetivo.

Existen diversos métodos para detectar la presencia de organismos en muestras ambientales, incluyendo el agua potable y residual. Algunos procesos estén completamente estandarizados y son utilizados rutinariamente ya que se encuentran en las normas de calidad del agua de muchos países.

En los procesos de detección de microorganismos es importante considerar que se requieren de varias consideraciones técnicas desde que se recolecta la muestra, la forma en la que se toma, el material y las condiciones donde se guarda; todo esto para garantizar la correcta detección y contabilización de patógenos.

Existen una gran cantidad de métodos para medir a los microorganismos, desde los métodos tradicionales hasta los más novedosos. A continuación se describen los principales métodos.

4.3.1 Número más probable (NMP)

Se trata de un método de enumeración común e importante para estimar el número de bacterias viables en las aguas superficiales, suelos, sedimentos, excrementos de animales y mariscos. Como técnica cuantitativa es extremadamente versátil y su uso se extiende mucho más allá de su aplicación más común para la estimación de coliformes totales y fecales en el agua potable y en suelos.

La prueba NMP es una estimación estadística de las unidades cultivables y asume que estas unidades se distribuyen al azar dentro de una muestra. Funcionalmente, la prueba de NMP se basa en la dilución de un microorganismo objetivo hasta su extinción, estas diluciones generalmente son decimales, con varios tubos de repetición. El NMP es útil cuando las células están presentes en bajas densidades como una estimación estadística sobre la base de la distribución binomial; la precisión de un valor de NMP es una función del número de porciones de muestra ensayadas para cada dilución (Kator, 2003).

Las limitaciones con los resultados del método del NMP provienen de los supuestos de que las células están distribuidas al azar y de los efectos de interferencia o inhibición, lo que puede producir resultados falsos negativos o falsos positivos.

4.3.2 Filtración por membranas

Los filtros de membrana están preparadas a partir de una variedad de químicos y están disponibles para la recuperación de los microorganismos del agua, donde sus concentraciones son a menudo demasiado bajas para la siembra directa o en grandes plantas de tratamiento donde utilizar el NMP sería engorroso. Los filtros de membrana tienen varias distribuciones de tamaño de poro, que se pueden acoplar con los medios apropiados para la recuperación selectiva de los organismos objetivo (ejemplo los medios m-FC o el MF-Endo). El tamaño de poro del filtro utilizado para los métodos microbiológicos es $0.45\mu\text{m}$, dependiendo del filtro las células se separan debido a la exclusión mecánica debido al tamaño físico de los poros o por fuerzas electroquímicas. La principal limitación de este método es la alta concentración de sólidos suspendidos que puede estar presente en muestras ambientales.

4.3.3 Ensayos enzimáticos

Estos métodos se basan en un enfoque alternativo para la detección de bacterias indicadoras, como coliformes totales y *E. Coli* en distintos tipos de agua. Estos ensayos son específicos, sensibles y rápidos, se basan en la detección de enzimas presentes en los microorganismos o en la hidrólisis de dichas enzimas, logrando detectar por fluorescencia dicha enzima o fracciones de éstas.

4.3.4 Cuentas directas

Los conteos directos difieren de los recuentos cultivables ya que las células son generalmente contadas por una observación microscópica y por lo tanto no requieren el uso de medios complejos para facilitar el crecimiento de células para producir densidades visibles a simple vista. Los conteos directos se pueden determinar en suspensiones de muestra preparadas a partir de agua, suelo o sedimento.

Las células pueden ser visualizadas mediante microscopía de contraste de fase para las células no teñidas o por tinción celular a partir de los filtros de membrana utilizando una gran variedad de tintes fluorescentes ahora disponibles comercialmente. Los métodos de conteo directo pueden ser automatizados con procesadores de imágenes en equipos de cómputo con los programas y aditamentos necesarios. Se puede aumentar la especificidad de en el conteo usando tintes fluorescentes asociadas a anticuerpos objetivo (hibridación *in situ*) o por medio de sondas que se unen a secuencias específicas de oligonucleotidos.

4.3.5 Densitometría de flujo

Se ha avanzado mucho en la adaptación de la densitometría de flujo para su uso en la microbiología ambiental, en los últimos años. Aunque es costoso un densitómetro de flujo éste ofrece beneficios para el conteo de células individuales con un alto flujo de procesamiento de muestras, identificación y clasificación de células. Los avances en las técnicas de conteo directo ahora incluyen el uso de densitómetros para cuantificar bacterias totales o cuando se combinan las técnicas con colorantes fluorescentes específicos se pueden utilizar para contar las células fisiológicamente activas. La densitometría de flujo se puede combinar con métodos moleculares mediante el uso de sondas características de los ensayos de PCR en tiempo real.

4.3.6 Métodos bioquímicos y moleculares

Las técnicas moleculares basadas en genómica, proteo genómica y transcriptómica han crecido rápidamente en los últimos años, debido a que la secuenciación de genomas microbianos está cada vez más disponible y los avances más importantes se dan en el este campo. Es por esto que las técnicas que están de moda son aquellas donde se utilizan sondas específicas como la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) o cuantitativa (qPCR). También se

ha avanzado mucho en las técnicas de detección de proteínas y en los enfoques inmunológicos con otras técnicas moleculares como la amplificación isotérmica en forma cíclica (LAMP) y los micro-arreglos.

Las técnicas dependerán de lo que se desee medir dentro de la célula y la matriz en la que se va a detectar. El objetivo a detectar puede ser: una proteína de la superficie celular microbiana, una enzima en el interior de la célula, un producto metabólico, un ácido graso o polisacárido o un producto de ácido nucleico (DNA o RNA). Los análisis para componentes celulares como proteínas, lípidos, ácidos grasos, así como productos metabólicos son caracterizados por métodos fenotípicos con excepción de la transcriptómica, que junto con la detección de los componentes de ácidos nucleicos son llamados métodos genotípicos.

Para una detección rápida (screening), los métodos genéticos son una buena opción, en muchos casos donde el microorganismo de interés es incultivable, no habrá otra opción más que utilizar un método de detección genotípico. La sensibilidad de la detección, también dependerá de si se requiere un resultado cualitativo o cuantitativo.

Por último también será importante de considerar la matriz acuosa a analizar, ya que un agua residual contendrá mayor cantidad de microorganismos que el agua tratada y probablemente no sea necesario el paso de concentración/amplificación. Las pruebas basadas en objetivos como el RNA o ácidos nucleicos expresados no necesitan ser amplificados ya que estos compuestos existen en grandes cantidades en la célula en replicación.

En la figura (4.3.6) se muestran los objetivos celulares que pueden ser seleccionados para realizar pruebas y los métodos con los que se puede llevar a cabo su detección.

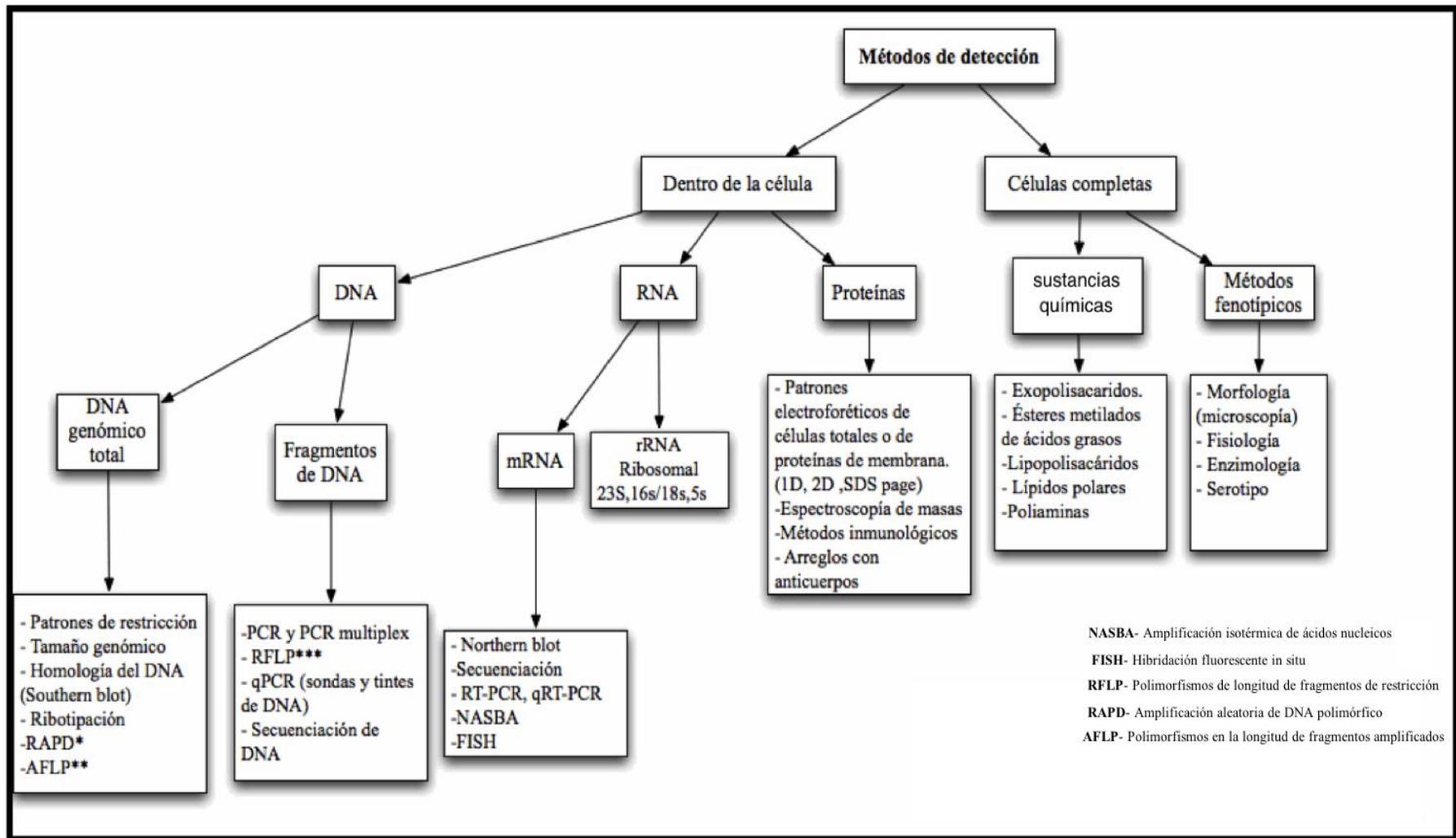


Figura 4.3.6 Métodos de detección para identificación de microorganismos (Sen, 2011).

4.4 Técnicas de detección basadas en DNA como objetivo

El genoma completo de un microorganismo o una secuencia específica de genes, puede ser el objetivo de un ensayo de detección, la selección de alguno de estos dependerá de la información que se desee obtener. En general se utiliza el genoma completo cuando la información epidemiológica que se desea conocer es la diferencia entre cepas; mientras que las secuencias específicas del genoma se utilizan cuando se desea conocer la patogenicidad o virulencia de una cepa específica. Para el caso de la virulencia, los genes asociados a la virulencia o a funciones específicas suelen estar dentro de las subunidades ribosomales 16S, 18S, y 23S. La subunidad 16S (RNA) suele utilizarse para la detección bacteriana ya que están presentes de 2-8 copias del gen y las secuencias están altamente conservadas entre especies.

4.4.1 Método de detección basado en fragmentos de DNA por medio de PCR

Aunque el PCR es una técnica con 25 años de antigüedad, sigue siendo una técnica de trabajo en los principales laboratorios alrededor del mundo, esto debido a que la técnica logra amplificar una secuencia genética objetivo un billón de veces en el transcurso de un par de horas, logrando así detectar una secuencia que sin esa amplificación sería imposible.

Existen muchas metodologías de PCR utilizadas como: PCR convencional, PCR múltiplex, PCR anidado y transcriptasa reverso (rt-PCR); todas estas metodologías involucran varios cambios en la temperatura de ciclaje y al final los productos amplificados son examinados en un gel mediante electroforesis, en la cual los genomas producto de la amplificación son analizados por el tamaño del producto y por consecuencia la zona donde dicho producto se detiene en un gel de agarosa o acrilamida. La detección en gel de los productos amplificados hoy en día sigue siendo utilizada, sobre todo para una identificación preliminar del producto. Es necesario utilizar bromuro de etidio o SYBR green® para observar los productos fluorescentes.

Existen otras metodologías para evaluar los productos de PCR, algunas son metodologías más rápidas o utilizando distintas plataformas, la selección de alguna dependerá en mayor medida del equipo con el que se cuente.

4.4.2 Método de detección basado en fragmentos de DNA por medio de qPCR

La técnica de PCR cuantitativa tiene casi 15 años de antigüedad, pero hasta hace poco se convirtió en una herramienta de diagnóstico utilizada en la microbiología ambiental.

En el PCR convencional el producto (amplicon) es medido al final de la reacción, y éste puede verse alterado por efectos de saturación debido al exceso de amplicon y a las bajas tasas de reacción en la optimización. El rendimiento del amplicon no está relacionado con la concentración inicial de partida (Sen, 2011); sin embargo como ya lo hemos comentado es obligatorio un segundo paso de verificación del producto.

Existe una relación cuantitativa entre la cantidad de amplicon inicial y la cantidad de producto del PCR durante la fase exponencial del proceso de qPCR; si el rendimiento del amplicon es medido durante la fase exponencial o la fase lineal inicial, como es en el caso de qPCR, entonces la información obtenida puede brindar una relación cuantitativa de la cantidad inicial de amplicon utilizada. Cuando se utiliza qPCR también se usan sondas fluorescentes además de los cebadores utilizados en PCR convencional, por lo tanto se logra la hibridación *in situ* del amplicon blanco. Con el incremento en los ciclos del qPCR, incrementa la cantidad del producto y por lo tanto se da el incremento en la fluorescencia emitida y ésta es cuantificada. Esta técnica en sí no es cuantitativa ya que miden la cinética de una reacción, no miden la reacción tal cual ocurre; si no que mide el resultado en un momento estático entre ciclos, tal vez sería más correcto decir PCR cinético, pero no se adoptó este término.

Las sondas fluorogénicas en los ensayos de qPCR se pueden clasificar de dos formas; sondas lineales o sondas estructuradas. Dentro de las sondas lineales se tiene: a) las doblemente marcadas (dual-labelled) TaqMan™ y las sondas para ligandos de unión del surco menor (MGB) y b) las que sólo están marcadas de un punto (single-labelled), como las FRET o las HybProbes las cuales se utilizan en equipos Roche.

Dentro de las sondas doblemente marcadas, se tiene a las de tipo TaqMan el cual es un método muy específico y muy útil para cuantificaciones, además de ser muy utilizado en lo que respecta a la detección de patógenos del agua, por ejemplo con esta técnica se han montado ensayos para detectar *Cryptosporidium* spp, *Helicobacter pylori*, Norovirus y *E. Coli* 0157:h7.

Esta técnica explota las propiedades de la Taq polimerasa que actúa como exonucleasa de 5'-3'. La sonda es un oligonucleótido que tiene una partícula fluorescente reportera que tiñe el extremo 5' con (FAM, VIC, NED, etc) y un extintor en el extremo 3 comúnmente TAMRA. Inicialmente no hay fluorescencia debido a que la Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) mantiene un mecanismo de extinción entre el reportero y el extintor, el mecanismo de extinción FRET se basa en la distancia de interacción de entre dos moléculas y pueden suceder en una distancia de 10 a 100 Angstrom, dependiendo de los fluoróforos.

Cuando la sonda se hibrida a su secuencia blanco el reportero se escinde por la acción de la nucleasa 5' de la Taq polimerasa, y se vuelve capaz de emitir fluorescencia la cual es medida por un detector, conforme se incrementa el número de ciclos, más fluorescencia es generada. En los ciclos iniciales (3-15) donde la fluorescencia es pequeña, se determina la línea base (base line) y se fija una línea para el umbral de detección de fluorescencia, el ciclo de la señal fluorescente en el cual la secuencia objetivo cruza con la línea pre seleccionada como el umbral es llamado valor Ct y es proporcional con la concentración inicial del material objetivo, en la figura (4.4.2.1) se muestra una gráfica de resultados de qPCR con el significado de sus líneas. Mediante una curva estándar donde cantidades conocidas de DNA en gramos y el número de copias de la secuencia objetivo se grafican contra los respectivos valores de Ct, puede determinar la cantidad de copias en la muestra a determinar. Esta metodología describe el método de cuantificación absoluto pero también se puede hacer la medición por medio del método comparativo ($2^{\Delta\Delta Ct}$). El método comparativo no necesita una curva estándar, pero el valor de Ct de la secuencia objetivo es comparada con la amplificación de una concentración de referencia de DNA o un calibrador con un número fijo de células o mediante un control endógeno.

En la figura (4.4.2.2) se muestra un esquema de la forma en la que funcionan los cebadores y las sondas en los ensayos de qPCR.

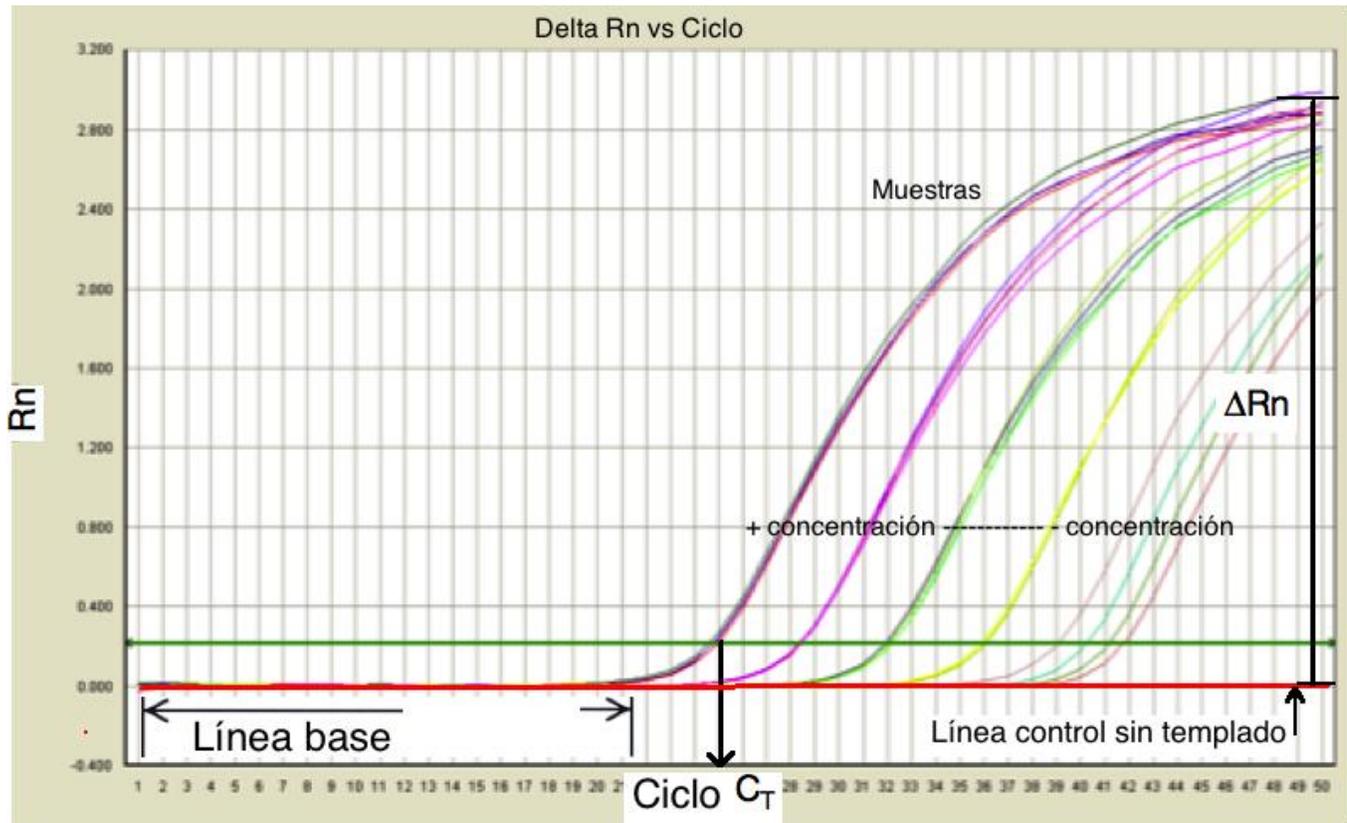


Figura 4.4.2.1 Gráfica de resultados qPCR con significado de líneas

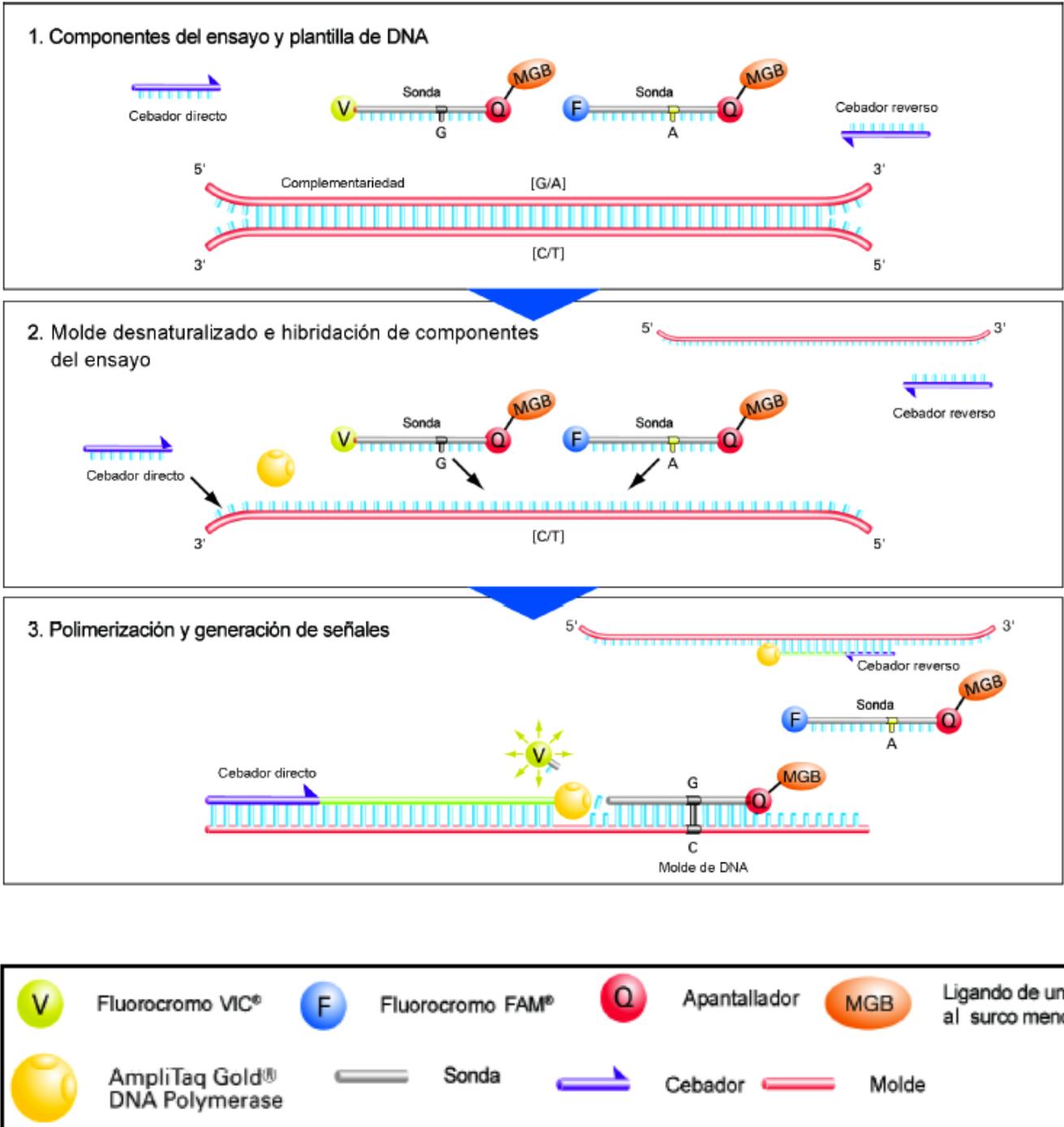


Figura 4.4.2.2 Esquema de funcionamiento de la técnica de qPCR (APPLIED, 2010)

4.4.3 Metodología para implementar una técnica de detección de microorganismos (DNA objetivo)

En general para montar una metodología de detección, el primer paso suele ser la concentración del microorganismo, seguido a esto la extracción de DNA del microorganismo de interés para ser utilizada en la detección por algún método molecular.

El primer paso que corresponde a la concentración del microorganismo, puede hacerse con la ayuda de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μm o más pequeño, se recomienda que el filtro sea de policarbonato ya que por las propiedades de este material toda la película bacteriana se queda pegada a la superficie de la membrana y es fácil desprenderla con un alto rendimiento. Una vez filtrado se procede a la extracción del DNA la cual se lleva a cabo con kits específicos para este proceso; es importante destacar que es necesario probar estos kits para saber el rendimiento y pureza del kit a partir de una muestra, por lo que se deberán hacer varias pruebas para conocer y en su caso ajustar los volúmenes necesarios para llevar a cabo una extracción adecuada. Una vez extraído y purificado el DNA se procede con los análisis moleculares como PCR o qPCR.

Dependiendo del microorganismo de interés se deberá llevar a cabo un proceso de búsqueda de información para encontrar artículos relacionados con la detección por medio de PCR o qPCR del microorganismo en estudio. Una vez encontrada una secuencia de DNA específica para el ensayo, ésta debe ser probada por medio de BLAST® (Herramienta de búsqueda de alineamientos locales) en la cual se deberá buscar que dicha secuencia no presente homologías con otros microorganismos y además que cumpla con las especificaciones que debe tener un cebador (primer).

El diseño de las sondas y los cebadores son el punto decisivo en el éxito de un ensayo de tipo qPCR para lo cual es necesario la información genética, es decir el genoma del microorganismo de interés. La información puede ser obtenida de diversas bases de datos con acceso libre, hoy en día la información es compartida e integrada entre tres bases de datos principales llamadas: Genbank la cual forma parte de la NCBI, la EMBL la cual es el laboratorio molecular de la unión europea y la DDBJ que es la base datos genómica de Japón.

En general existen diversos programas computarizados que revisan si las secuencias son aptas para utilizarse en qPCR, estos programas analizan las secuencias y observan que las temperaturas de alineamiento sean correctas y analizan las estructuras para que no se puedan enrollar entre si las sondas.

Otro tema de gran importancia es el de la inhibición de la reacción de qPCR y los controles internos. Sabemos que las muestras ambientales provienen de matrices acuáticas complejas ya que contienen: polisacáridos, ácidos húmicos, fúlvicos o tánicos, urea, óxidos de hierro y metales pesados. Estas sustancias pueden ser purificadas junto con el DNA o RNA y pueden inhibir la reacción de qPCR, además de ser purificadas estas sustancias pueden interferir la lisis durante la extracción del material nucleico ya que estas sustancias podrían capturar o degradar el ácido nucleico; todo lo anterior podría contribuir a dar resultados falsos negativos. Algunos de estos problemas pueden ser eliminados con un adyuvante como T34 gen proteína, polivinilpirrolidona (PVP), albúmina bovina sérica, EDTA o DMSO. El problema es que no son completamente efectivos para la química de qPCR, por lo tanto se debe de incluir controles de la inhibición los cuales son cada vez más comunes y son vendidos junto con los kits de qPCR. El control de inhibición puede ser DNA genómico; ya sea de un organismo entero o una sección de DNA la cual se añade a la reacción de PCR, cuando ésta se añade al mismo tubo de reacción es clasificada como control de amplificación interno (IAC), mientras que el control externo es añadido a una muestra duplicado. Estos dos tipos de controles internos y externos son clasificados como controles exógenos. Cuando se utiliza un IAC éste es amplificado junto con la reacción de la secuencia objetivo y se distingue mediante una señal fluorescente diferente.

A continuación se muestra una tabla (4.4.3) de las páginas y los recursos importantes donde puede obtenerse información detallada de cómo implementar una técnica, cómo seleccionar una secuencia y dónde analizarla.

TABLA 4.4.3 RECURSOS ELECTRÓNICOS CON INFORMACIÓN RELEVANTE A PRUEBAS MOLECULARES.

Dirección WEB	Descripción
http://www.cepheid.com/media/files/smart-notes/SmartNote6.1.pdf	Protocolo donde se describe cómo iniciar un experimento de tipo qPCR y dónde se describen los tipos de sondas existentes y la forma de diseñar un cebador.
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Herramienta de búsqueda básica de alineamiento local. Se pueden buscar genomas y probar homologías entre muchas otras funciones.
http://www.embl.de/services/index.html	Laboratorio de biología molecular de la Unión Europea, donde se puede encontrar información acerca de genomas y proyectos de interés mundial.
http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/	Base de datos genómica de bacterias patógenas
http://mbgd.genome.ad.jp/	Base de datos genómica microbiana para análisis comparativos.
http://rdp.cme.msu.edu/	Base de datos ribosomal para secuencias basadas en la subunidad 16S del rRNA.
http://www.idtdna.com/scitools/scitools.aspx	Software para el diseño de sondas y cebadores.

4.5 Adaptación de microorganismos al medio

Los microorganismos, especialmente los que normalmente están asociados con los animales de sangre caliente, a menudo entran en un estado de estrés debido a la exposición a temperaturas desfavorables y a los factores abióticos como la luz, estrés osmótico, la disponibilidad de carbono, y los factores estresantes químicos como el cloro en la desinfección. Es importante destacar que existe una relación directa entre la eficiencia de la recuperación y el grado de estrés de los microorganismos cuando se utilizan métodos y procedimientos tradicionales. Muchos investigadores también han observado cambios en la capacidad de cultivarlos microorganismos y en la tasa de recuperación.

Un concepto importante que influye en la detección de ciertos patógenos entéricos y organismos indicadores después de la exposición al medio ambiente fue descrito por primera vez por Xu *et al.* (1982), quien demostró que las células cultivadas en el agua del mar entran rápidamente en una fase inactiva no recuperable parecida a un estado latente, cuando se ensaya con los medios y condiciones estándar, pero permanecen viables cuando se realiza un ensayo directo de viabilidad.

La capacidad para cultivar al microorganismo se ha visto reducida y ha sido ampliamente reportada en una gran variedad de géneros microbianos. Por otra parte, el estado (VNC) de determinadas especies se caracteriza por una secuencia de cambios fisiológicos y bioquímicos. Si la entrada en el estado VNC representa una respuesta de supervivencia fisiológicamente programada a condiciones ambientales adversas, las células VNC deben ser capaces de reanimarse en las circunstancias adecuadas (Bitton, 2011).

Una consecuencia de este fenómeno es que, aunque existan un número variable de células metabólicamente activas que pueden permanecer en una muestra sujeta a algún tipo de estrés, seguirán presentes un número considerable de patógenos debido a su incapacidad de cultivo, con esto el verdadero número de células (y con ello las consecuencias) de microorganismos indicadores (Ej. *E. coli*) o microorganismos patógenos pueden ser subestimados. Por lo tanto

la efectividad de los estándares públicos basados en la recuperación cuantitativa de microorganismos estará comprometida.

Enterococcus faecalis, un microorganismo identificado como un indicador de alto riesgo asociado con las enfermedades relacionadas con las aguas recreacionales ha sido detectado que entra en el estado VNC (Kator *et al.*, 2003)

A continuación se muestra una lista de organismos que entran en el estado VNC en la tabla (4.5.1)

TABLA 4.5.1 MICROORGANISMOS CAPACES DE ENTRAR EN UN ESTADO DE RESISTENCIA EN EL AMBIENTE (OLIVER, 2005).

<i>E.coli o157:H7</i>	<i>Shigella</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lysteria</i>
<i>Salmonella sp.</i>	<i>Campilobacter jejuni</i>
<i>Vibrio sp</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Será interesante conocer más acerca de los microorganismos que entran en estados VNC para poder aplicar técnicas de análisis efectivas. Los organismos antes mencionados deberán ser estudiados de forma diferente o al menos deberían de formar parte de formas distintas de medición en el agua, esto debido a su importancia en la salud humana.

4.5.1 Medición de la viabilidad en ensayos qPCR por medio de colorantes indicadores

El conocimiento de la presencia o ausencia de microorganismos en muestras ambientales es casi siempre suficiente información para saber acerca de la calidad de un sistema; sin embargo es necesario determinar si los microorganismos en las muestras ambientales están activos o viables. La última medida de la viabilidad microbiana es el crecimiento en algún tipo de sistema de cultivo, desafortunadamente debido a diversas limitaciones, el crecimiento no es el método de detección más rápido o sensible.

La información sobre la viabilidad de los microorganismos es necesaria por las industrias relacionadas con el agua potable y residual, para ayudar a valorar el riesgo a la salud pública representado por los patógenos en medios acuáticos ambientales, y para evaluar la eficacia de las técnicas de desinfección y tratamiento. La medida de la viabilidad y actividad son requeridas para determinar si los microorganismos están interactuando con el medio ambiente y son responsables de algunos de los procesos biológicos, químicos, biogeológicos o físicos que ocurren dentro de los ecosistemas.

Los métodos de cultivo microbianos tienen una variedad de limitantes cuando se usan para estudiar las poblaciones ambientales, muchas bacterias de muestras ambientales no crecerán en medios de cultivo tradicionales de los laboratorios de microbiología, además estas técnicas no consideran las capacidades de adaptación de los microorganismos al ambiente, sin embargo los métodos de cultivo son una prueba irrefutable de viabilidad; ya que si una bacteria es aislada y crece en un medio de cultivo y crea una colonia, esta bacteria está indudablemente activa. Sin embargo los métodos moleculares de detección de microorganismos en muestras ambientales suelen ser más rápidas, sensibles y específicas, pero en general sólo nos dan información acerca de presencia o ausencia de microorganismos y no nos hablan de viabilidad, actividad o infectividad de los microorganismos detectados.

Ahora existen en el mercado una variedad de herramientas moleculares que pueden ser utilizadas para diferenciar entre microorganismos viables o muertos, para evaluar y medir la expresión génica (potencial de actividad) en muestras ambientales. Estos métodos abarcan: inclusión o exclusión de tintes fluorescentes en células microbianas, conversión enzimática de compuestos de sustratos a compuestos fluorescentes (casi siempre en conjunto con métodos

basados en ácidos-bases nucleicos), amplificación de ácidos nucleicos ligada a plataformas de biosensores y microarreglos, detección y caracterización de proteínas

Tintes intercalados en DNA (PMA)

Como hemos mencionado el PCR convencional puede detectar DNA de microorganismos pero es ciego a su estado de viabilidad, a menos que el DNA de un organismo muerto esté tan degradado que sea imposible de amplificarlo, aunque se sabe que es posible detectar DNA de organismos muertos (Dupray *et al.*, 2003).

la combinación del PCR con los tintes de membrana impermeables que tienen como objetivo el ADN, proveen un método robusto y relativamente sencillo para la evaluación de la viabilidad.

Los tintes como PMA (monoazida de propidio) o EMA (monoazida de etidio), penetran sólo las células que tengan comprometida la membrana (células muertas o muriendo) y no a las células sanas con la membrana intacta (Rudi *et al.*, 2005). Estos colorantes fluorescentes contienen un grupo azida el cual se intercala con el DNA y después de una exposición a una fuente de luz extrema, el colorante se une covalentemente al DNA y se mantiene unido durante los procesos de extracción del DNA con lo que al realizar el ensayo de qPCR el colorante inhibe la amplificación. Esta tecnología se ha utilizado para diversos estudios ambientales, pero ha sido imposible utilizarlo para la evaluación de la desinfección con UV ya que con este procedimiento la membrana permanece intacta.

El tinte es débilmente fluorescente por sí mismo, pero se vuelve más fluorescente después de unirse a los ácidos nucleicos. En la fotólisis, el grupo azida (fotoreactivo) se convierte en un radical muy reactivo (radical nitreno, intermediario reactivo), que reacciona fácilmente con cualquier hidrocarburo en cualquier sitio de unión del DNA para formar enlaces covalentes nitrógeno-carbono muy estables, lo que resulta en una modificación permanente del DNA (Biotum, California USA).

El tinte es casi completamente impermeable a la membrana celular, y por lo tanto puede ser utilizado de manera selectiva para modificar el DNA sólo de las células muertas que son las que tengan daño en la membrana provocado por el ozono, dejando el DNA de células viables

intacto. Esta característica hace que el tinte sea de gran utilidad en la detección selectiva de las células patógenas viables y pueda ser cuantificadas por qPCR, ya que en las células modificadas por el tinte, el DNA modificado no podrán amplificarse y no podrán ser contadas.

El debate que surge con este colorante comienza al plantearse la metodología experimental ya que hay que saber los alcances que tiene la técnica y así poder diseñar un experimento que pueda ser interpretado.

En la figura (4.5.1) podemos observar en (1) que el qPCR detectaría todas las formas bacterianas y el PCR con PMA (v-PCR) detectaría sólo las formas viables.

En (2) podemos notar la sección (a) las cuales son los falsos negativos, que pueden ser por células semi rotas en las que penetró el colorante pero la bacteria logró repararse o aquellas donde el colorante penetró membranas de células vivas. La fracción (b) correspondería a aquellas donde el colorante no traspasó la membrana de las células rotas, teniendo falsos positivos.

Un ejemplo de un falso positivo se tendría con una muestra ambiental muy turbia donde no se pudiera llevar a cabo la reacción del colorante con el DNA, ya que la luz no podría traspasar la muestra.

En (3) podemos ver que con la técnica de v-PCR podríamos cuantificar el máximo número de células viables esto incluye: el mínimo número de células viables (mV) y las falsas positivas (b). El método de PCR detectará todos los organismos incluyendo los viables y los no viables. La diferencia entre los dos métodos dará el máximo número de células no viables que incluye el mínimo número de células no viables (mNV) y los falsos negativos (a).

Entonces para estimar (a) se tendrá que utilizar un cultivo celular en fase exponencial que se sepa que está mayormente viable y realizar un qPCR y un v-PCR, con esto tendríamos los falsos negativos.

Para estimar la fracción (b) se tendrá que realizar un proceso en el cual se asegure estar eliminando todos los microorganismos es una condición de ozono extrema.

Entonces el valor de v-PCR inicial menos el valor del ensayo de v-PCR muerte total (kv-PCR), dará una estimación de los falsos positivos.

Entonces con el cálculo de los falsos negativos (a) y de los falsos positivos (b), se podrá tener un análisis más adecuado.

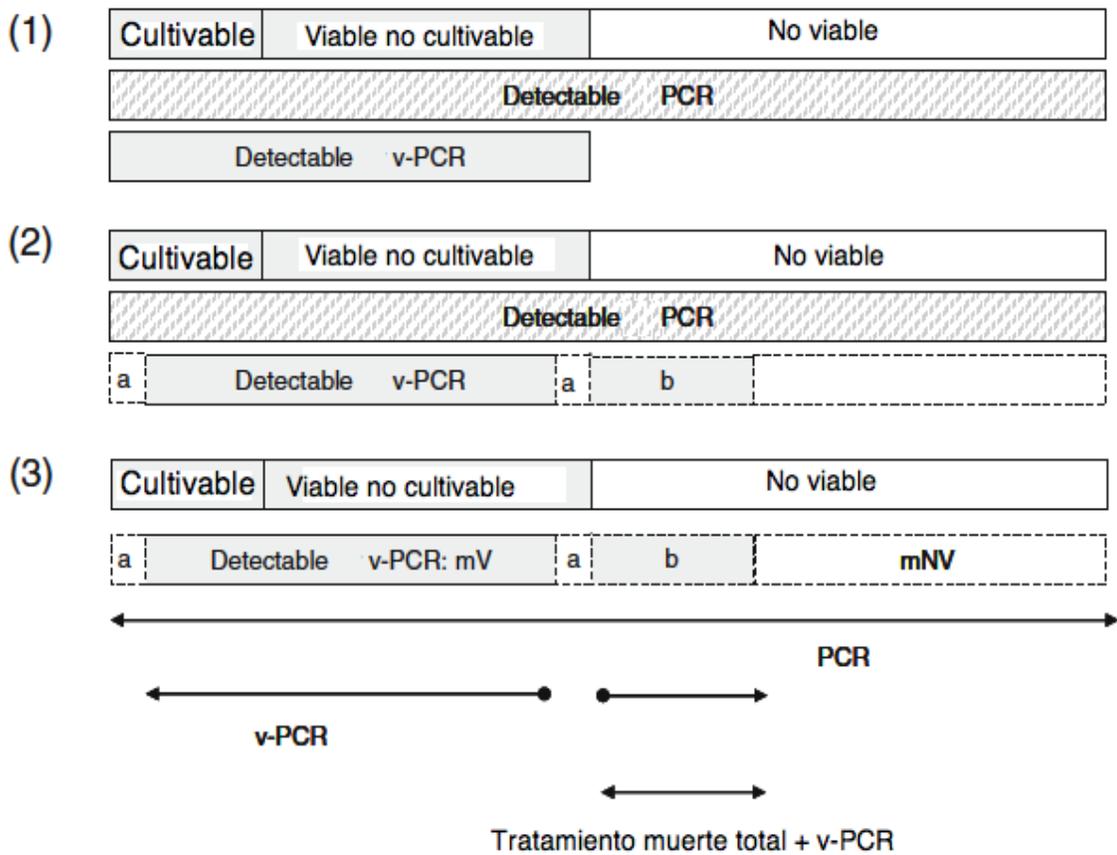


Figura 4.5.1 Esquema del alcance de la técnica v-PCR (Fittipaldi et al., 2010).

5. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología experimental del trabajo de investigación, la cual está dividida en temas dependiendo del tipo de trabajo que se realizó. En la figura (5.1) se muestra el diagrama general de la experimentación.

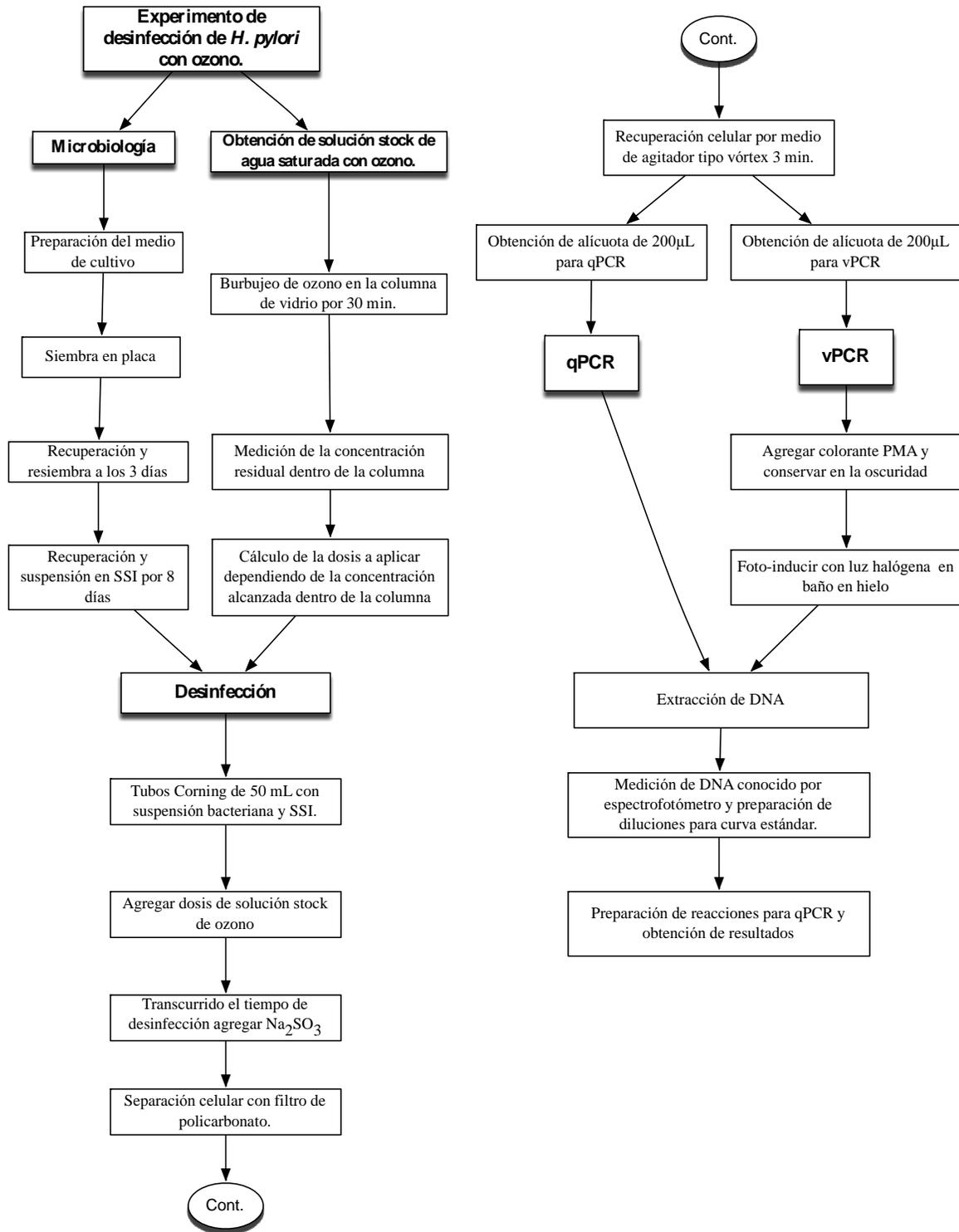


Figura 5.1 Diagrama general de experimentación.

5.1 Microbiología

La cepa de *H. pylori* que se utilizó fue aislada de pacientes con resistencia a antibióticos por medio de biopsias y en algunos experimento la cepa control ATCC435031.

La suspensión bacteriana que se utilizó contenía al menos 80% de formas cocoides, debido a su importancia ambiental (Azevedo *et al.*, 2007).

De acuerdo con expertos del Laboratorio de Infectología del INCMNSZ, la bacteria permanece en la forma cocoide viable no cultivable (VNC) hasta por un periodo de 10 días a partir de la inducción a esta forma, preservándola en una suspensión salina isotónica a 15°C, por lo que dicho periodo fue tomado en cuenta para la experimentación.

Se realizó una tinción de Gram de la suspensión bacteriana a los 8 días de la inducción para verificar el estado cocoide de la bacteria en más del 80% de dicha suspensión.

La dosis mínima infectiva publicada para monos Rhesus por *H. pylori* es de alrededor de 10^4 UFC/mL (Solnick *et al.*, 2001), pero se ha detectado la presencia de *H. pylori* en biopelículas de 10 y 30 meses de antigüedad con una concentración de 1.5×10^6 UFC/cm² y 2.5×10^7 UFC/cm² respectivamente. A partir de estas concentraciones se propuso trabajar con una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL para la prueba de detección en agua de pozo, debido a que es una concentración cercana a lo que se podría encontrar en los sistemas de distribución de agua. Para llevar a cabo los experimentos de desinfección se trabajó con una suspensión de *H. pylori* ajustada a una concentración de 2.25×10^7 UFC/mL.

5.1.1 Metodología para la preparación de las muestras bacterianas

El medio de cultivo de la bacteria fue el siguiente: medio BHI con polienriquecimiento al 1% (BD), sangre de caballo al 5%, anfotericina y vancomicina (6 mg/L). Se sembró la cepa en el medio y se incubó durante 3 días en una jarra de anaerobiosis (*Oxoid*) con una mezcla de gases de 85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂ y posteriormente se resembró a los 3 días de crecimiento en 6 nuevas cajas Petri. El material celular se recolectó en un tubo con 3 mL de solución salina

isotónica (SSI) ajustado hasta obtener una concentración aproximada a 3 en la escala nefelométrica de McFarland (9×10^8 UFC/mL) y fue dejado a condiciones normales del medio ambiente por 3 días.

Se realizaron 2 ensayos: el experimento de desinfección y el experimento de detección de la bacteria en agua real de pozo.

El volumen total para medir la eficiencia de desinfección con el que se trabajó fue de 39 mL de una solución salina isotónica donde se llevó a cabo la reacción de oxidación, más 1 mL de la solución bacteriana, la cual contenía 2.25×10^7 UFC/mL.

$$9 \times 10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} 1 \text{ mL} = 9 \times 10^8 \text{ UFC}$$

$$\frac{9 \times 10^8 \text{ UFC}}{40 \text{ mL}} = 2.25 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

Para la detección de *H. pylori* en agua de pozo se utilizó 1L de agua de pozo y se generó una serie de 4 diluciones decimales. Para preparar la dilución cero se utilizó 1.6 mL de la solución bacteriana que equivale a 1.5×10^6 UFC, la cual cumple con la dosis infectiva y fue calculada de la siguiente forma:

$$1.5 \times 10^6 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 1000 \text{ mL} = 1.5 \times 10^9$$

$$1.5 \times 10^9 \frac{1 \text{ mL}}{9 \times 10^8 \text{ UFC}} = 1.66 \text{ mL}$$

En la tabla (5.1.1) Se muestra el número de UFC que se detectaron con la metodología de detección por medio de qPCR en agua de pozo.

TABLA 5.1.1 NÚMERO DE UFC PRESENTES EN LAS DILUCIONES DE LA PRUEBA DE AGUA DE POZO

Dilución	Número de UFC
0	1.5×10^6
1	1.5×10^5
2	1.5×10^4
3	1.5×10^3
4	1.5×10^2

5.2 Obtención de solución stock de ozono para desinfección

5.2.1 Metodología para la obtención de agua saturada con ozono (solución Stock)

La solución Stock utilizada en las pruebas de desinfección fue preparada empleando un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) que utiliza aire enriquecido con oxígeno como gas de alimentación el cual es alimentado a partir de un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA). Como contactor gas-liquido se utilizó una columna de burbujeo de vidrio de 2L de volumen (5 cm de diámetro y 110 cm de altura) la cual fue previamente lavada y desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 20% y posteriormente enjuagada con suficiente agua destilada.

Se llenó la columna con 1L de agua destilada y se suministró al reactor una corriente de gas ozono mediante un difusor de vidrio poroso (10 μm de tamaño de poro), a una concentración aproximada de 35 mg/L y con un flujo de 0.4 L/min; el burbujeo del gas ozono se mantuvo hasta alcanzar la concentración de saturación deseada en la solución stock. El excedente de ozono que no es transferido al agua, es transformado nuevamente a oxígeno en una unidad de destrucción catalítica (PCI OZONE & CONTROL SYSTEMS INC, Fairfield Crescent, Westalwell NJ 07006), para su liberación en forma segura al ambiente. En la figura (5.2.1) se muestra un diagrama de la unidad de oxidación utilizada en este estudio.

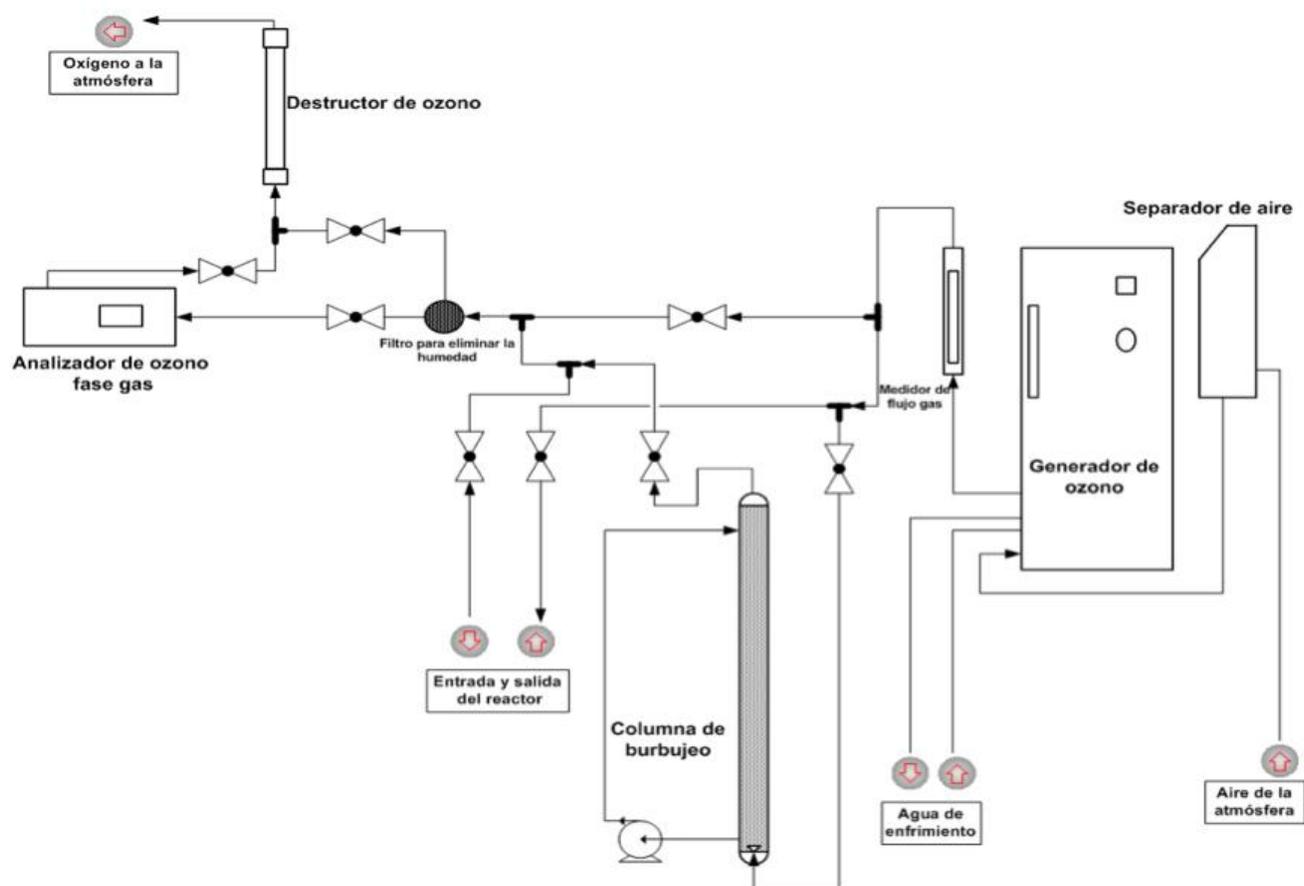


Figura 5.2.1 Diagrama de la unidad de oxidación con ozono

5.2.2 Metodología para la medición de la concentración de ozono en fase líquida

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

La solución madre de índigo que se utilizó se preparó de acuerdo a Bader & Hoigné, 1985, y el procedimiento para tomar lectura de las muestras se detalla en el diagrama (5.2.1).

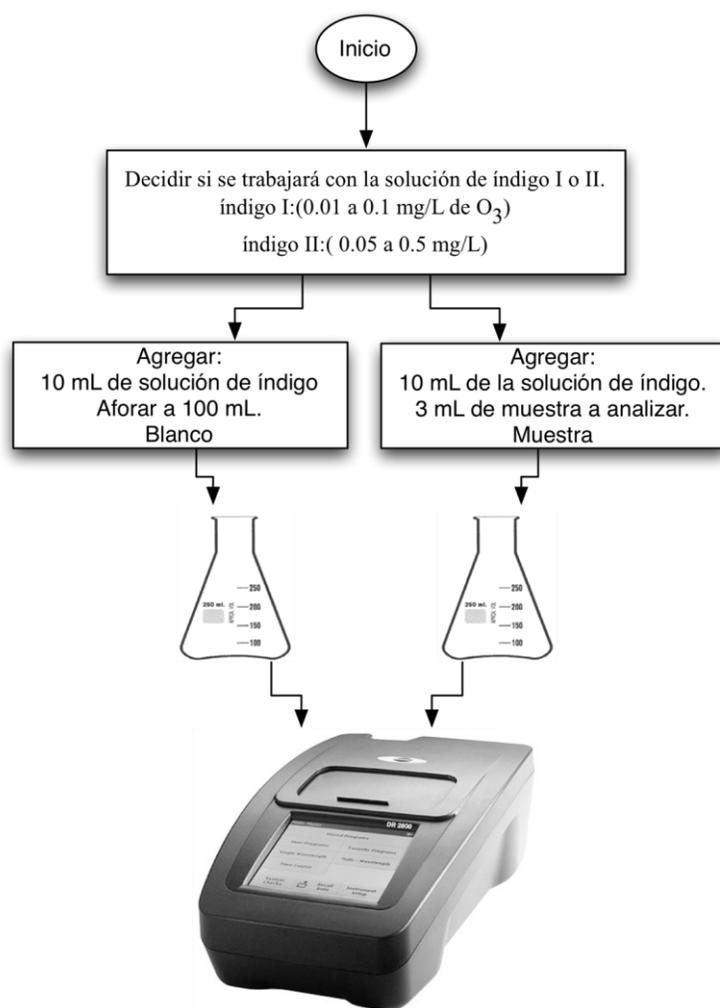


Figura 5.2.2 Diagrama de flujo para medición de ozono residual en fase líquida.

5.3 Pruebas de desinfección

Una vez alcanzada la concentración residual de ozono (entre 1 y 8 mg/L) en el agua de saturación o solución Stock, se tomaron diferentes volúmenes y fueron aplicados a una mezcla de reacción compuesta por 1 ml de suspensión celular de *H. Pylori* contenida en tubos de tipo

Corning (50 mL capacidad) y solución salina isotónica (SSI) para alcanzar un volumen final de reacción de 40 mL. Las dosis de ozono y los tiempos de contacto fueron controlados para alcanzar diferentes valores de “CT” en los experimentos de desinfección, donde C es la concentración de ozono alcanzada en la mezcla de reacción en mgO_3/L ; y T el tiempo de contacto o reacción en minutos. En una primera serie de experimentos se utilizó una concentración constante de ozono (0.4, 1.0, 2.0 mg/L) y se manejaron diferentes tiempos de contacto (10 s, 30s, 1 min, 3 min, 5 min). En la segunda serie de pruebas, se manejaron valores de CT en un intervalo de (0.1 – 7.0 mg/L) y un tiempo de contacto T de 1 minuto fijo.

Al término de cada tiempo de contacto, se agregó 1 mL de solución de Na_2SO_3 (concentración) esterilizada para detener la reacción del ozono y posteriormente procesar las muestras para los ensayos de cuantificación.

5.4 Recuperación del paquete celular

Uno de los pasos limitantes de la técnica implementada fue la etapa de recuperación de las células de *H. Pylori*, sometidas a la desinfección con ozono mediante filtración. Para ello se realizaron pruebas buscando asegurar que no se obtuvieran diferencias significativas en la forma de desprender el paquete celular de la membrana de filtración.

Se preparó un tubo Corning con 40 mL de SSI y 1 mL de la solución bacteriana ajustada a 3 de Mcfarland. Se filtró la totalidad del volumen en una unidad de filtración Millipore™, empleando membranas de policarbonato de 0.4 μm de poro y 47mm de diámetro. La membrana con la células recuperadas fue colocada en un tubo de 50 mL conteniendo 10 mL de solución PBS (buffer de fosfato) y se agitó por medio de un vórtex durante 2 minutos hasta desprender el paquete celular de la membrana, posteriormente se tomó una alícuota de esta suspensión en tubos Eppendorf de 2.5 mL.

En cada tubo Eppendorf de 2.5 mL se agregó 200 μL de la suspensión resuspendida para el proceso con Monoazida de propidio (PMA) vPCR y para qPCR.

5.5 Análisis de muestras por medio de qPCR

5.5.1 Extracción de DNA de *H. Pylory*.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el kit de extracción y purificación de DNA marca QIAGEN QIAamp™ blood and tissue mini kit.

Las soluciones ATL, AL, AW1, AW2 y AE, son particulares al kit de extracción.

Los pasos para la extracción fueron los siguientes:

- 1.- Se agregó 100 µL de solución ATL.
- 2.- Se agregó 20 µL de proteinasa k, se usó el vórtex 5 segundos, se incubó por 10 minutos a 56 °C y se centrifugó por 10 segundos.
- 3.- Se agregó 200 µL de solución AL, se usó vórtex 5 segundos e incubó por 10 minutos a 70 °C y se centrifugó por 10 segundos.
- 4.- Se agregó 200 µL de etanol al 96% , se usó vórtex 5 segundos y se centrifugó por 10 segundos.
- 5.- Se colocó la muestra en la columna de extracción del Kit y se etiquetó la columna, ésta se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se colocó en un nuevo tubo.
- 6.- Con cuidado se abrió la columna y se agregó 500 µL de buffer AW1, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se colocó un nuevo tubo.
- 7.- Con cuidado se abrió la columna y se agregó 500 µL de buffer AW2, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos, se descartó el filtrado y se colocó en un nuevo tubo.
- 8.- Se repitió el centrifugado por 1 minuto para asegurar la ausencia de buffer AW2.
- 9.- Se agregó 25 µL de buffer AE y se dejó reposar 3 minutos, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.
- 10.- Se repitió paso 9 una vez.

5.5.2 Ensayo de qPCR

Para llevar a cabo la medición del material genético se utilizó un equipo de PCR tiempo real marca Applied Biosystems Fast 7500, utilizando las siguientes secuencias de cebadores y sonda de tipo TaqMan específicas para la subunidad ureA del gen urea; debido a que ha sido reportado como altamente específica (McDaniels *et al.*, 2005) y no muestra homologías cruzadas con bacterias relacionadas o subespecies de *Helicobacter*.

Sonda (400nM) HpyP1: 6FAM-AAACTCGTAACCGTGCATACCCCTATTGAG-TAMRA

Cebador en sentido (5µM) HpyF1: GGGTATTGAAGCGATGTTTCCT

Cebador en contrasentido (5µM) HpyR1: GCTTTTTTGC- CTTCGTTGATAGT

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

La mezcla de reacción incluyó los siguientes elementos:

Taq Man universal master mix 2x	12.25 µL
Primer HpyF	0.25 µL
Primer HpyR	0.25 µL
Sonda HpyP1	0.25 µL
H2O	7 µL
<u>DNA</u>	<u>5 µL</u>
Total	25 µL

De cada muestra del proceso (extracción de DNA) se dividió en 3, para cumplir con la característica de triplicado que la técnica requiere para la cuantificación, y en cada corrida de cuantificación se agregó material genético para construir una curva estándar de 5 puntos.

5.6 Pruebas de detección de *Helicobacter pylori* en agua de pozo mediante qPCR

Para las pruebas de detección (no de cuantificación) de *Helicobacter pylori* por medio de qPCR, se utilizó agua de pozo de la facultad de química y el kit de control interno para la reacción de qPCR (TaqMan® Exogenous internal Positive control) para asegurar que no existiera algún tipo de inhibición en la reacción de qPCR debida a algún elemento presente en el agua de pozo.

En la tabla (5.6.1) se muestra los parámetros más relevantes de calidad del agua de pozo utilizada, sabiendo que los inhibidores más importantes de la técnica de qPCR son: sales (NaCl), materia orgánica, ácidos húmicos y fúlvicos, entre otros.

TABLA 5.6.1 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA DE POZO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, PROMEDIO QUINCENAL DE MUESTRAS JUNIO 2011 (PUMAGUA).

Parámetro	
pH	7.2
Turbiedad (UTN)	1
Conductividad (mS/cm)	0.5
Sólidos disueltos totales (mg/L)	200
Nitratos (mg/L)	1.8
Cloro residual (mg/L)	0
Coliformes fecales (UFC/100mL)	1
DQO (mg/L)	<10

En la tabla (5.6.2) se muestra el número de UFC presentes en las diluciones evaluadas.

TABLA 5.6.2 NÚMERO DE UFC PRESENTES EN LAS DILUCIONES DE LA PRUEBA DE AGUA DE POZO

Dilución	Número de
0	1.5×10^6
1	1.5×10^5
2	1.5×10^4
3	1.5×10^3
4	1.5×10^2

5.7 Ensayo de viabilidad con PMA

Se utilizó una solución de (PMA) con una concentración de 20 mM almacenada a -20°C en la oscuridad.

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

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

6. RESULTADOS

6.1 Microbiología

En la figura 6.1.1 se muestran imágenes de las colonias de *H. pylori* en forma bacilar, estas colonias fueron recogidas y suspendidas en solución salina isotónica e inducidas a la forma cocoide. Para asegurarnos de trabajar con más del 80% de las bacterias en forma cocoide se realizaron frotis por medio de tinciones de tipo Gram para monitorear la suspensión. Las fotografías mostrada en la figura (6.1.1) representan una de las mejores siembras, ya que no todos los cultivos salían tan claros o muchas veces el medio se contaminaba fácilmente; lo

anterior debido a la dificultad que implica el cultivo de esta bacteria. Se observó que conforme se mantenía el cultivo por más días, el tamaño de la colonia no se modificaba, solamente cambiaba el color de la colonia el cual se iba poniendo amarilla hasta llegar a un color marrón y en consistencia se volvía más densa.

Se constató que *H. pylori* es un microorganismo difícil de cultivar, esto debido a que su hábitat natural es muy complejo y al tratar de igualarlo para el cultivo no siempre se obtienen tan buenos resultados.

Fue interesante observar las tinciones periódicas porque se pudo apreciar muy bien cómo el microorganismo pasa de una forma bacilar a una forma de tipo u, hasta llegar a una forma cerrada circular. Ahora se sabe que el DNA de la bacteria se mantiene activo cuando se encuentra en su forma cocoide, lo cual le sigue confiriendo la capacidad de infectar pero en menor intensidad que su forma bacilar.



Figura 6.1.1 Imágenes de siembra en placa de H. pylori.

6.2 Solución de ozono stock para desinfección

Previo a los experimentos de desinfección se evaluó la estabilidad del ozono de la solución stock (agua de saturación) y en la mezcla de reacción. Esto con el fin de conocer el

comportamiento del ozono en solución acuosa y corroborar que el nivel de saturación en el agua destilada (a 22°C y pH 7), se mantiene constante por un periodo de tiempo lo suficientemente adecuado para dosificar el ozono. Los resultados indicaron que la concentración se mantiene constante por al menos 2 horas, tiempo que fue suficiente para llevar a cabo las pruebas de desinfección.

6.2.1 Decaimiento del ozono residual en presencia de la suspensión celular.

Se tomaron 34 mL de SSI, 1 mL de suspensión celular ajustada a 3 de Mcfarland y 5 mL de agua saturada con ozono con una concentración 4 mg/L, y se midió la concentración residual de ozono durante un periodo de 10 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 6.2.1.

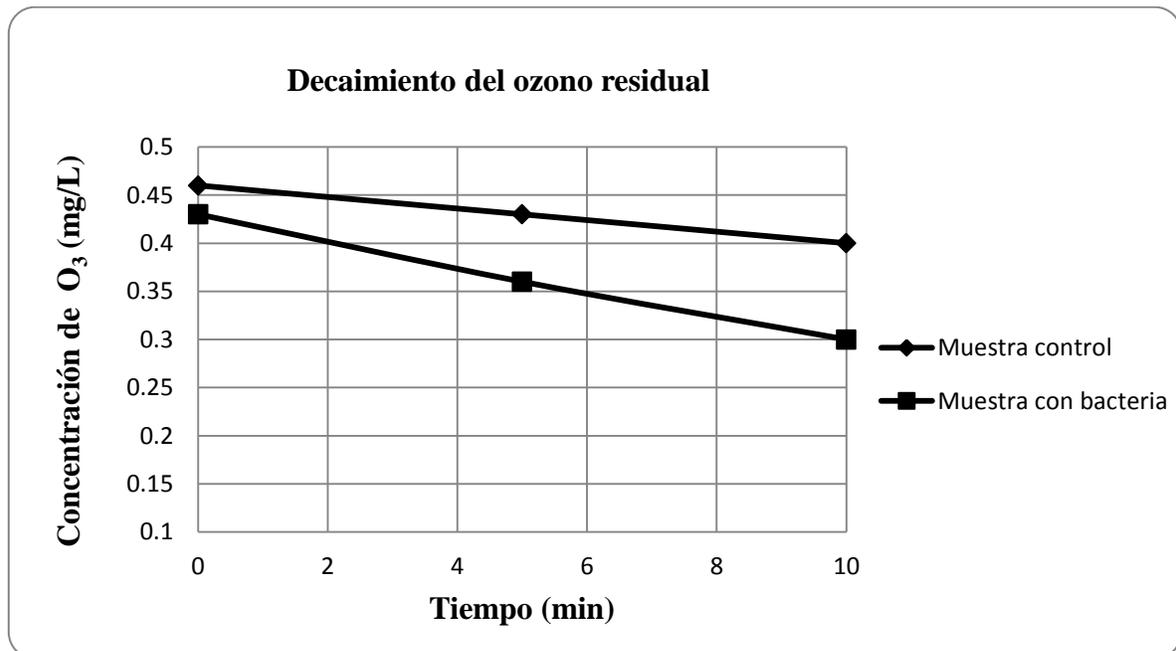


Figura 6.2.1 Decaimiento de la concentración residual de ozono en solución salina con/sin suspensión bacteriana, desde 0.45 mg/L durante 10 minutos.

En la figura (6.2.1) se puede notar que durante 10 minutos la muestra control decae un promedio de 0.06 mg/L de ozono residual dentro del tubo de reacción donde se llevó a cabo el experimento, mientras que para la muestra con suspensión celular decae un promedio de 0.13 mg/L. Por lo tanto se concluye que hay una demanda de ozono debido a la densidad

bacteriana, sin embargo la diferencia es poco significativa durante los primeros dos minutos de tiempo de contacto por lo que se debe considerar para las pruebas de desinfección.

6.3 Extracción de DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA por medio del kit QIAGEN QIAamp blood and tissue mini kit. Se realizaron varias extracciones y se probó la pureza y concentración de las extracciones por medio de electroforesis en gel de agarosa en la figura (6.3.1), por espectrofotometría de acuerdo a la relación de densidad óptica a 260 y 280 nm en la tabla (6.3.1) y por medio de qPCR en la figura (6.3.2).

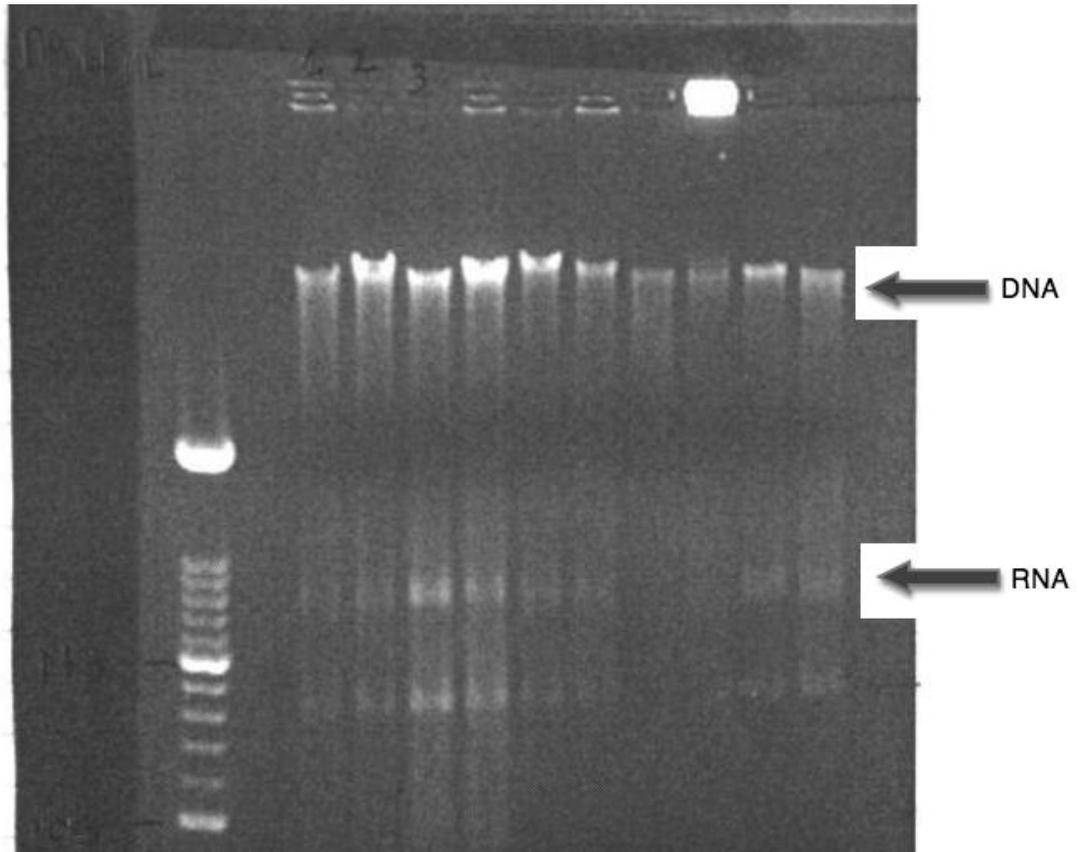


Figura 6.3.1 Gel de agarosa con los DNA de *Helicobacter pylori*, producto de la extracción con kit QIAGEN QIAamp.

TABLA 6.3.1 TABLA DE RESULTADOS DE PUREZA DEL DNA, MEDIANTE RELACIÓN DE DESINDAD ÓPTICA 260/280.

Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
λ (nm)	ABS (AU)						
260	0.129	260	0.327	260	0.34	260	0.089
280	0.09	280	0.185	280	0.204	280	0.058
A260/A280	1.43	A260/A280	1.76	A260/A280	1.66	A260/A280	1.53

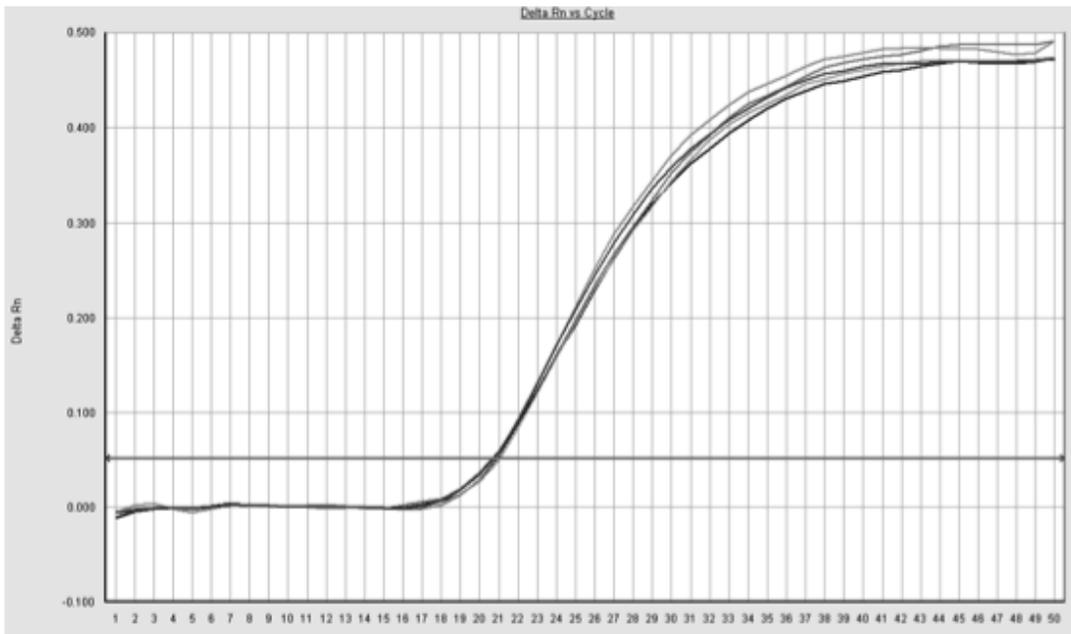


Figura 6.3.2 Curva de eficiencia de la técnica de extracción de DNA.
(Delta Rn vs Número de ciclo)

Los resultados de la extracción de DNA con el kit Quiagen QIAamp blood and tissue son excelentes, en la figura (6.3.1) donde las bandas de DNA se observan con una gran intensidad y sin contaminaciones, por otro lado la relación de densidad óptica A260/A280 varía desde 1.43 hasta 1.76, siendo 1.65-1.9 considerado como el intervalo óptimo de pureza. Respecto a las señal de qPCR de la figura (6.3.2) se observa una sola señal clara y repetida en el mismo

ciclo de detección cT=21, por lo que se concluye que la extracción de DNA mediante el kit se llevó a cabo de manera óptima, es decir que el kit de extracción de DNA funciona correctamente.

6.4 Implementación de la técnica de detección y cuantificación por medio de qPCR

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

6.4.1 Curvas estándar para qPCR

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

- 1.- Conociendo el tamaño del genoma de *Helicobacter pylori* (n=1,667,867 pb).
- 2.- Conociendo la masa del DNA, multiplicando por el peso en gramos de un par de bases

$$m = n \cdot x$$

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

$$m = 1,667,867 \text{ pb} \cdot 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp} \qquad m = 1.82798 \times 10^{-15} \text{ g}$$

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

$$1.82798 \times 10^{-15} \text{ g} \cdot \frac{1 \times 10^{12} \text{ pg}}{1 \text{ g}} = 0.001828 \text{ pg}$$

$$\frac{0.001828 \text{ pg}}{1 \text{ copia de ureA}} = \frac{0.001828 \text{ pg} \cdot \frac{\text{genoma}}{\text{genoma}}}{1 \text{ copia}} = \frac{\text{pg}}{1 \text{ copia}}$$

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

TABLA 6.4.1 TABLA DE CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN FINAL DE DNA, PARA OBTENER UNA CURVA ESTÁNDAR DE 5 PUNTOS.

#copias	Masa de gDNA necesaria	Concentración final, µL
3.00E+06	5.48E+03	1096.789
3.00E+05	548.3946	109.6789
3.00E+04	54.83946	10.96789
3.00E+03	5.483946	1.096789
3.00E+02	0.54839	0.109678

Ejemplo de cálculo de tabla (6.4.1)

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

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

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

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

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

$$16.47 \frac{mg}{mL} = 0.01647 \frac{mg}{mL}$$

$$\text{Dilución 1:10} = 0.001647 \frac{mg}{mL} = 1647 \frac{pg}{mL}$$

TABLA 6.4.2 TABLA DE CÁLCULO DE μL DE DNA PARA PREPARAR LA CURVA ESTÁNDAR.

Dilución	fuelle de Dna	C1, inicial (pg/ μL)	V1, volumen de gDNA, (μL)	Volumen de diluyente, (μL)	V2, Final, (μL)	C2, Final de dilución, (pg/ μL)	# de copias resultantes de UreaA/5 μL
1	stock	1647	66.59	33.40	100	1096.789	3.00E+06
2	D1	1096.789	10	90	100	109.6789	300000
3	D2	109.6789	10	90	100	10.96789	30000
4	D3	10.96789	10	90	100	1.096789	3000
5	D4	1.096789	10	90	100	0.1096789	300

Ejemplo de cálculo de tabla 6.4.2 (Volumen final del dilución 100 μL)

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

$$100 \text{ mL} - 66.59 \text{ mL} = 33.4068 \text{ mL}$$

Por lo tanto para preparar la solución stock de DNA se realizó una dilución 1:10 del DNA de *H. pylori* y se tomó 67 μL de la solución stock de DNA y 33 μL de H₂O Libre de nucleasas. A partir de esta se tomó 10 μL de solución y se diluyó en 90 μL , hasta obtener las 5 diluciones.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a la curva de calibración que tuvo el mejor ajuste; en dos formas de observar los datos (lineal y logarítmica).

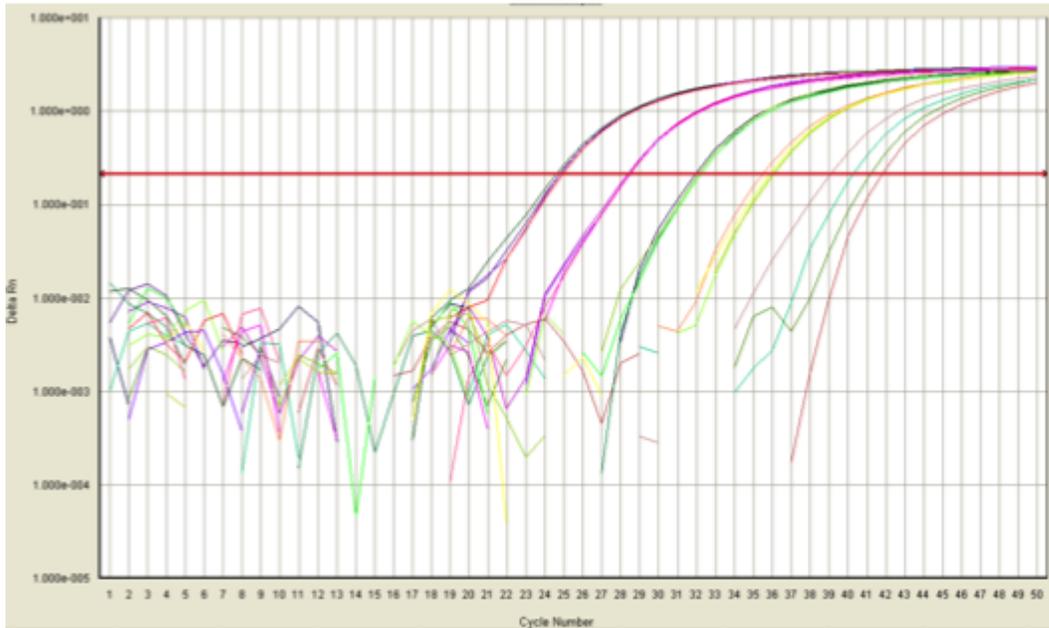


Figura 6.4.1 Curva de calibración en forma log, detectando desde 300 genomas hasta 3×10^6 (Delta Rn vs Número de ciclo).

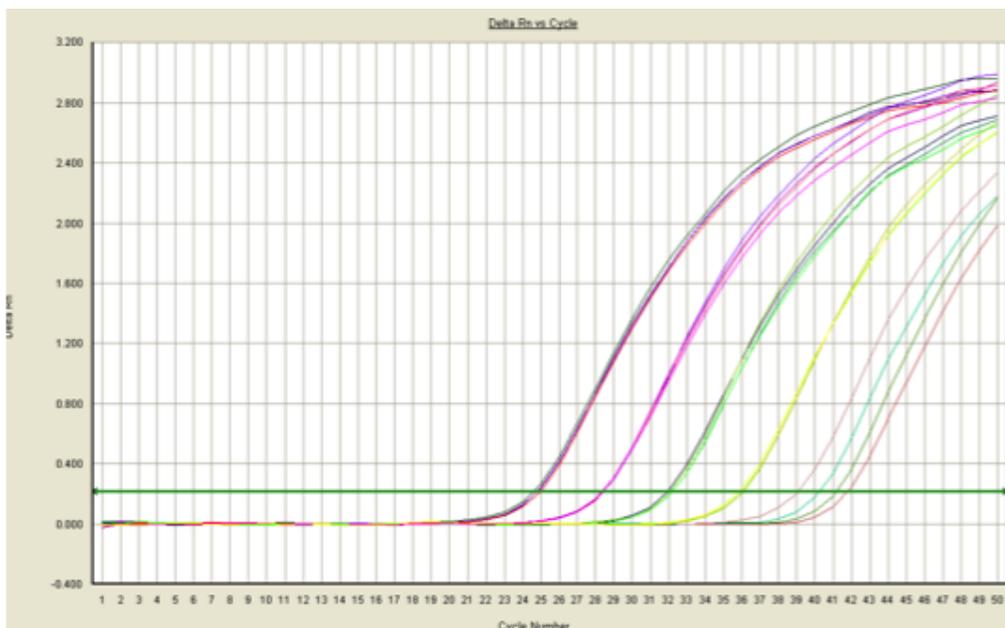


Figura 6.4.2 Curva de calibración en forma lineal, detectando desde 300 genomas hasta 3×10^6 (Delta Rn vs Número de ciclo).

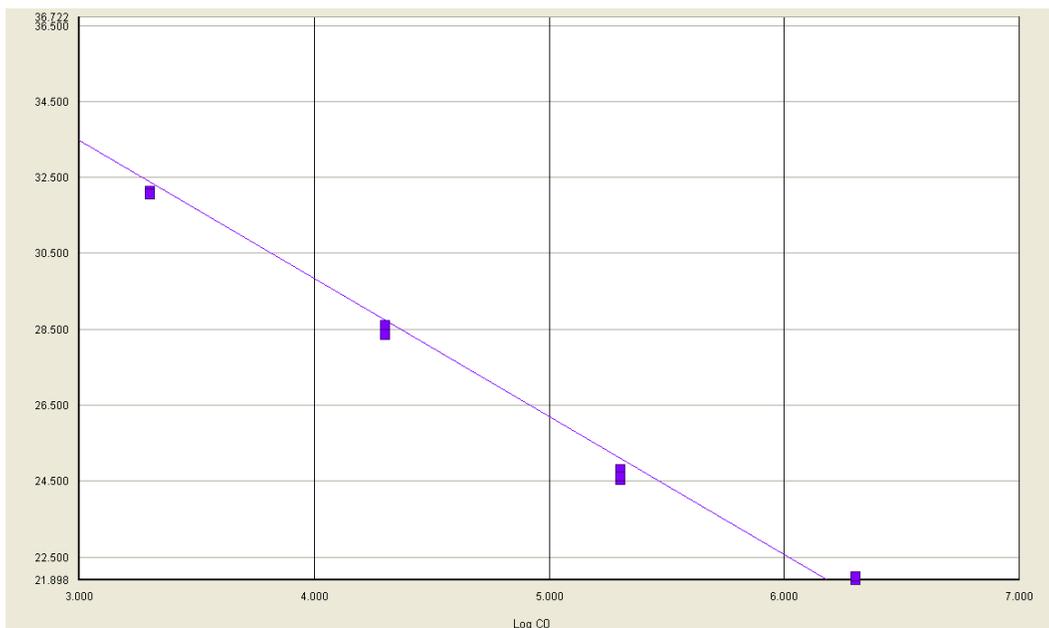


Figura 6.4.3. Recta de ajuste estándar con $R^2=0.998$, y eficiencia del 92%, $cT=44.38-3.63*\log cel.$

En las figuras (6.4.1) y (6.4.2) se puede observar que las líneas correspondientes a cada dilución se encuentran a 3.5 ciclos de distancia entre cada dilución lo que representa un orden decimal de magnitud, esto demuestra que la curva estuvo bien preparada. Se observa como la señal correspondiente a la mayor concentración de microorganismo la cual es la que se encuentra en el extremo izquierdo es una señal muy clara, en la que todas las repeticiones de la misma muestra se levantan en el mismo ciclo, sin embargo, al cuantificar concentraciones muy pequeñas como las que se encuentran en la parte extrema derecha se observa como las señales son dispersas, lo cual genera ineficiencia en la curva estándar. En la figura (6.4.3) se muestra como aun teniendo algunas muestras desiguales, se logró construir una recta con una regresión lineal bastante aceptable para este tipo de experimentos en los que se busca una $R^2 \geq 0.99$.

6.5 Pruebas de recuperación del paquete celular

Se realizaron 6 pruebas de filtración para conocer si la recuperación celular era constante, por lo que se realizó la filtración, la recuperación y se midió por medio de qPCR.

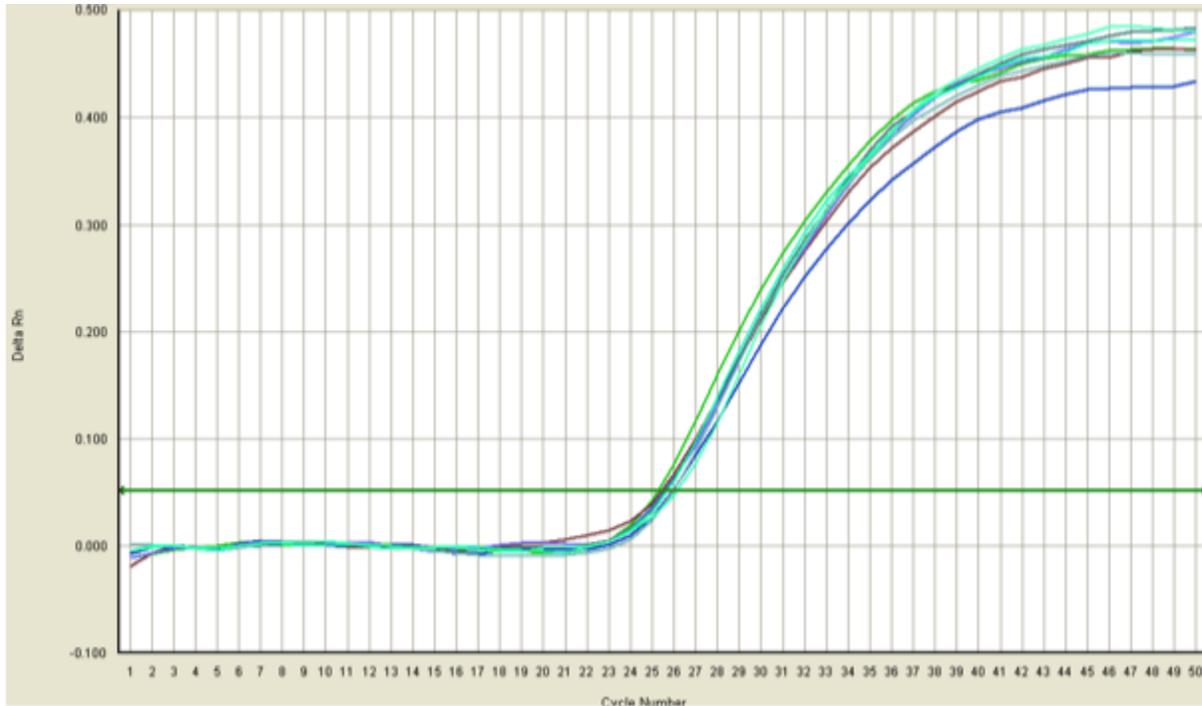


Figura 6.5.1 Curva de eficiencia de recuperación del cultivo celular por medio de filtración (Delta Rn vs Número de ciclo).

En las curvas de resultado del qPCR de la figura (6.5.1) se observa que las curvas (señales) se levantan aproximadamente en el mismo ciclo (C_T), esto significa que en cada muestra existe la misma cantidad de microorganismo. Lo anterior demuestra que la metodología utilizada para realizar la recuperación celular (proceso de filtrado y el desprendimiento celular por medio de agitador vórtex), es adecuado, ya que se obtienen resultados similares en las distintas repeticiones, lo que comprueba que es un procedimiento reproducible.

6.6 Pruebas de detección de *Helicobacter pylori* en agua de pozo mediante qPCR

Para las pruebas de detección de *H. pylori* en agua de pozo se generaron 4 diluciones (1.5×10^2 - 1.5×10^6) de una suspensión bacteriana diluida en un 1L de agua de pozo. En la figura (6.6.1) se muestran los resultados de la prueba de qPCR.

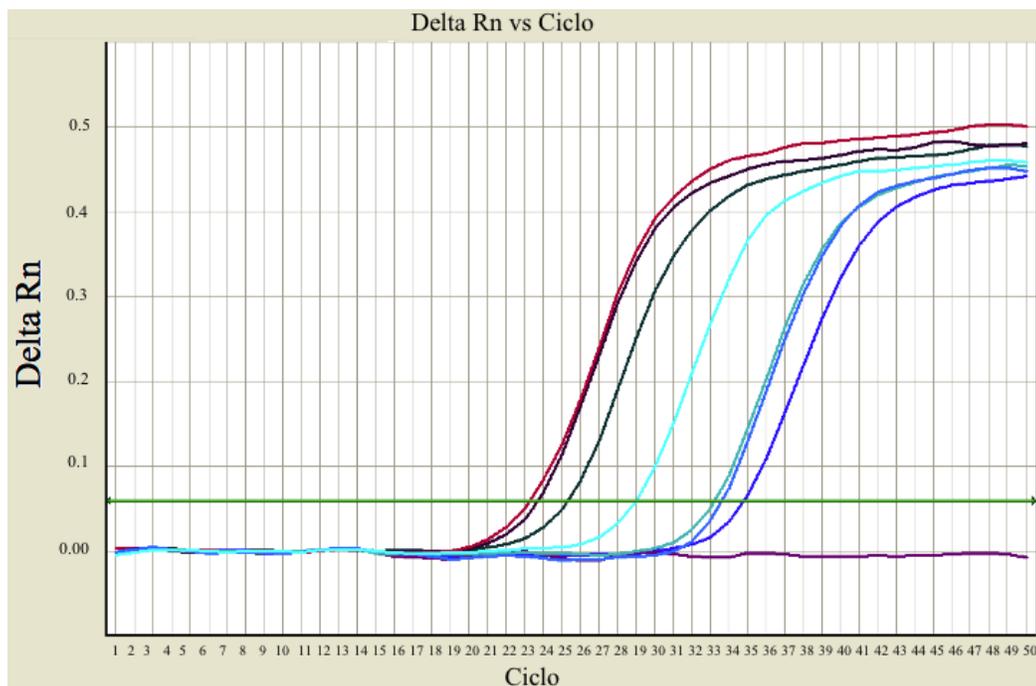


Figura 6.6.1 Gráfica de resultados positivos de la prueba de detección de *H. pylori* en agua de pozo. (Delta Rn vs Número de ciclo)

A partir de los resultados de la prueba de qPCR se comprobó que no existe inhibición en la técnica de qPCR por la acción de los componentes del agua de pozo, esto se observa en la figura (6.6.1) donde podemos observar todas las señales correspondientes a todas las diluciones del qPCR son positivas. Fue posible detectar la presencia de *H. pylori* hasta de 150 UFC/L, por lo que esta metodología puede ser utilizada perfectamente para cuantificar este microorganismo en agua de pozo, sin el temor a tener una inhibición, siempre y cuando el agua no tenga un valor alto de conductividad lo que nos hablaría de alto contenido de sales o

un alto valor de DQO que reflejaría alto contenido de materia orgánica, la cual si puede interferir con el qPCR, por lo que se tendría que aplicar un proceso de limpieza de la muestra.

6.7 Experimentos de desinfección

A continuación se muestran los resultados de los experimentos de desinfección realizados; estos están organizados de acuerdo a la forma en la que se aplicó la solución stock. Los primeros corresponden a una dosis específica de ozono y diferentes tiempos de contacto y los segundos, corresponden a la variación de dosis con un tiempo de contacto de 1 minuto.

6.7.1 fase experimental 1

Se realizaron 3 experimentos en los cuales se utilizó una solución stock de ozono con concentraciones de 4 y 8 mg/L, con un volumen final de reacción de 40 mL y concentraciones de ozono residual de 0.4, 1, 2 mg/L. Se probaron 4 tiempos de contacto (10 s, 30 s, 1 min, 5 min) con 1 mL de la solución bacteriana ajustada 3 de mcFarland, es decir con 2.25×10^7 UFC/mL.

Los CT utilizados en los experimentos se muestran en la tabla (6.7.1.1)

TABLA 6.7.1.1 TABLA DE VALORES DE CT UTILIZADOS PARTE I

Stock [Ozono] (mg/L)	0.4	1	2
	CT (min-mg/L)		
10 s (0.16 min)	0.06	*****	*****
30 s (0.5 min)	0.2	0.5	1
1 min	0.4	1	2
3 min	*****	3	6
5 min	2	*****	10

Ejemplo de cálculo de tabla (6.7.1)

$$C1 = 8 \frac{mg}{L} \quad V2 = 40 mL$$

$$C2 = 0.4 \frac{mg}{L} \quad V1 = ?$$

$$V1 = \frac{8 \frac{mg}{L} * 40 mL}{0.4 \frac{mg}{L}} = 2 mL \text{ de solución stock de } O_3$$

$$CT = C * T$$

$$CT = 0.4 \frac{mg}{L} * 0.16 min = 0.06$$

Los resultados de los experimentos se describen a continuación en la tabla (6.7.1.2):

TABLA 6.7.1.2 TABLA DE RESULTADOS DE EXPERIMENTOS PARTE I

Muestra	CT min*mg/L	Ct* prom qPCR	UFC	% Desactivación	Reducción Log
Control	0	20.14	6.00E+06		
10s	0.06	23.65	1.00E+06	83.33	0.78
1min	0.4	24.14	3.00E+05	95.00	1.30
5min	2	24.22	3.00E+05	95.00	1.30
30s	0.2	25.79	1.70E+05	97.17	1.55
control	0	25.32	3.00E+05		
1min	1	32.40	3000.00	99.00	2
3 min	3	32.40	3000.00	99.00	2
30 s	0.5	32.40	3000.00	99.00	2
control	0	25.32	3.00E+05		
5 min	10	33.76	500.00	99.83	2.77
30 s	1	34.20	500.00	99.83	2.77
3 min	6	36.05	500.00	99.83	2.77
1 min	2	37.58	500.00	99.83	2.77

*Ct= Ciclo de detección de la señal de qPCR.

Los resultados de los primeros experimentos no presentan un comportamiento favorable, debido a que se genera una incongruencia en los datos correspondiente a la muestra de 30 s para los experimentos 1 (azul) y 2 (verde), en el experimento 3 (rojo) todos los valores aparecieron en un orden no adecuado, tabla (6.7.1.2); ya que los valores deberían estar ordenados de acuerdo a su valor CT, esto es, mientras más alto el valor CT debería de haber existido mayor desactivación, sin embargo esto no se puede apreciar en los resultados.

Cabe mencionar que se probaron 3 concentraciones de ozono distintas en la solución stock, por lo tanto se concluyó que la variable tiempo era la que no respondía a la técnica implementada, por lo que se sugirió modificar la forma de aplicación y manejar un tiempo de contacto constante.

6.7.2 fase experimental 2

En esta parte del experimento se cambió la estrategia de dosificación debido a inconsistencias en las primeras pruebas.

Estos experimentos se realizaron con una solución stock de ozono con una concentración residual de 4 y 8 mg/L, con un volumen final de reacción de 40 mL y un intervalo de valores CT de 0.1 mg/L y hasta 15 mg/L, manteniendo un tiempo de contacto de 1 minuto (excepto 1 muestra), con 1 mL de la solución bacteriana ajustada 3 de mcFarland, es decir con 2.25×10^7 UFC/mL. Los CT utilizados en este experimento se muestran en la tabla 6.7.2.1, así como las configuraciones que tuvo cada muestra. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones, por experimento.

TABLA 6.7.2.1 VALORES CT UTILIZADOS EN EXPERIMENTO PARTE II

<i>CI Stock (mg/L)</i>	8					
<i>V (H₂O-O₃)</i>	0.5	3.5	7.5	12.5	17.5	35
<i>CT (min-mg/L)</i>	0.1	0.7	1.5	2.5	3.5	7

<i>CI Stock (mg/L)</i>	4						
<i>V (H₂O-O₃)</i>	1	5	10	15	35	39	39*
<i>CT (min-mg/L)</i>	0.1	0.5	1	1.5	3.5	4	15

*Esta muestra se dejó por 4 minutos

Los resultados de los experimentos se muestran en las tabla (6.7.2.2) y (6.7.2.3).

TABLA 6.8.2.2 TABLA DE RESULTADOS DE EXPERIMENTO #1

Muestra	CT min-mg/L	Ct* promedio	UFC	% Desactivación	Reducción Log
Cepa	0	14.60	8.65E+06		
Control	0	19.49	1.78E+06		
2	0.1	26.92	1.61E+05	90.96	1.04
3	0.7	28.29	1.03E+05	94.21	1.24
4	1.5	28.87	8.30E+04	95.34	1.33
5	2.5	29.29	8.07E+03	99.55	2.34
6	3.5	30.87	450	99.97	3.6
7	7	31.71	345	99.98	3.71

*Ct= Ciclo de detección de la señal de qPCR.

TABLA 6.7.2.3 TABLA DE RESULTADOS DE EXPERIMENTO #2

Muestra	CT min-mg/L	Ct* promedio	UFC	% Desactivación	Reducción Log
Control		26.40	1.00E+06		
1	0.1	26.60	1.10E+05	89.00	0.959
2	0.5	27.76	7.00E+04	93.00	1.155
3	1	32.95	2.00E+03	99.80	2.699
4	1.5	34.09	600	99.94	3.222
5	3.5	34.66	500	99.95	3.301
6	4	34.88	445	99.96	3.352
7	15	36.87	120	99.988	3.921

*Ct= Ciclo de detección de la señal de qPCR.

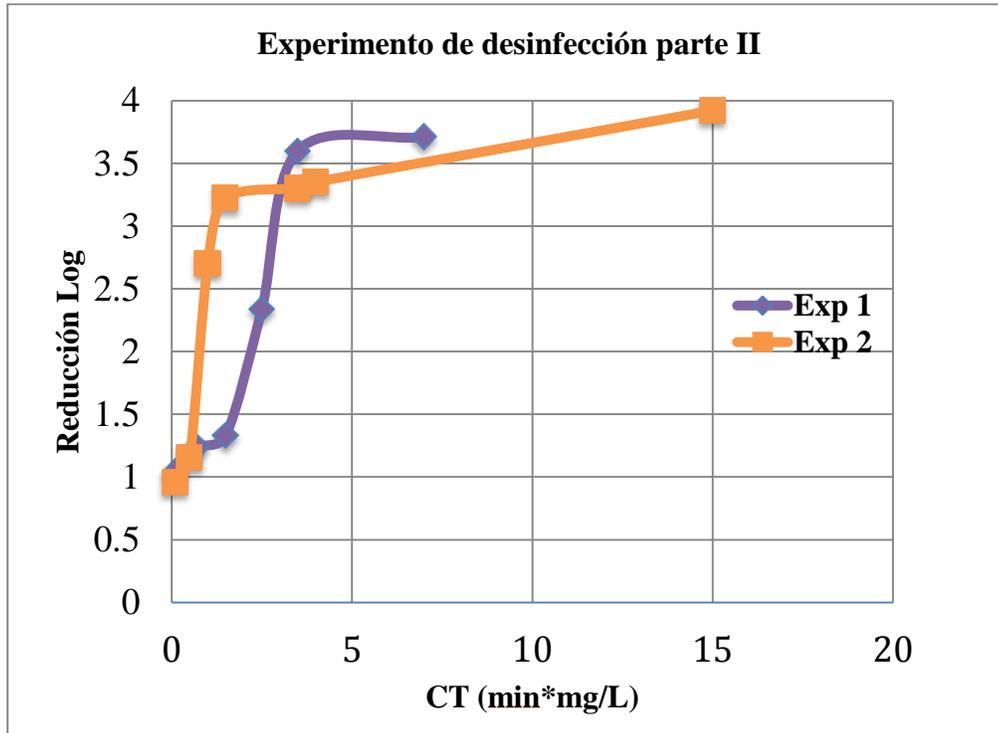


Figura 6.7.2.1 Gráfica de resultados de desinfección de experimentos parte II

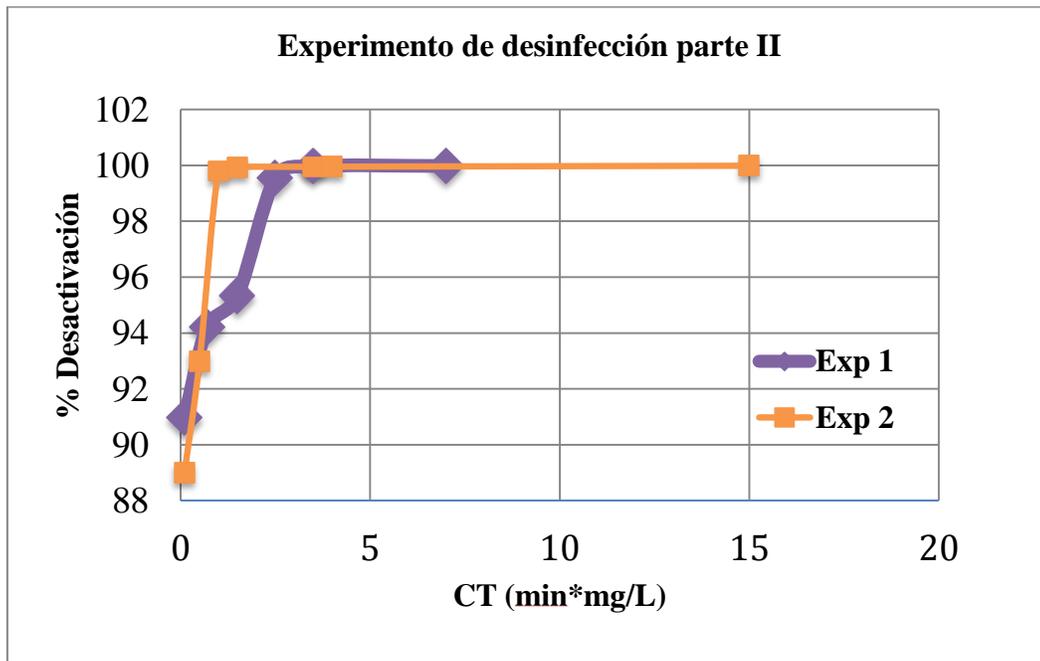


Figura 6.7.2.2 Gráfica de resultados de desinfección de experimentos parte II

En los resultados obtenidos podemos observar que al cambiar la estrategia en la forma de suministrar el ozono encontramos que la técnica comienza a responder a las distintas dosis aplicadas, por lo tanto se puede observar que la técnica montada sigue el proceso de desinfección. Los resultados obtenidos nos muestran una desactivación logarítmica de 3.71 que corresponde a un 99.98% de desinfección, el cual representa un buen nivel de desinfección, sin embargo éste corresponde a un CT de 15 min-mg/L el cual es un valor extremadamente alto, por lo tanto se estimó que para un CT de 2.0 min-mg/L el grado de desactivación es de 3-log, siendo este un valor aceptable de inactivación logarítmica.

6.8 Pruebas de desinfección con PMA

Las pruebas con el colorante PMA se realizaron en dos fases, la primera de carácter exploratorio de la técnica y la segunda como complemento al proceso de desinfección para conocer la viabilidad de las bacterias ante un proceso de desinfección con ozono.

6.8.1 Fase exploratoria

Las primeras pruebas consistieron en evaluar si existía algún tipo de interferencia sobre la reacción de qPCR con el uso del colorante, ya que se eliminó de la metodología el paso del lavado del colorante de la muestra, debido a que con el lavado también se perdía el paquete celular. Sin embargo el proceso de extracción de DNA se realizó con columnas especiales del kit de extracción Quiagen, las cuales capturan el DNA y permiten la elución de otros materiales celulares y en este caso del colorante. Se utilizó un kit de control interno TaqMan® Exogenous internal Positive control reagents, para el cual se utilizó la siguiente reacción, con un volumen final de 25 µL:

Taq Man universal master mix 2x	12.25 µL
Exo IPC 10X MIX	2.5 µL
Exo IPC DNA 50X	0.5 µL
Primer HpyF (5µM)	0.25 µL
Primer HpyR (5µM)	0.25 µL
Sonda (400 nM) HpyP1	0.25 µL
H ₂ O	4 µL
DNA	5 µL

Los resultados se muestran en la figura (6.8.1)

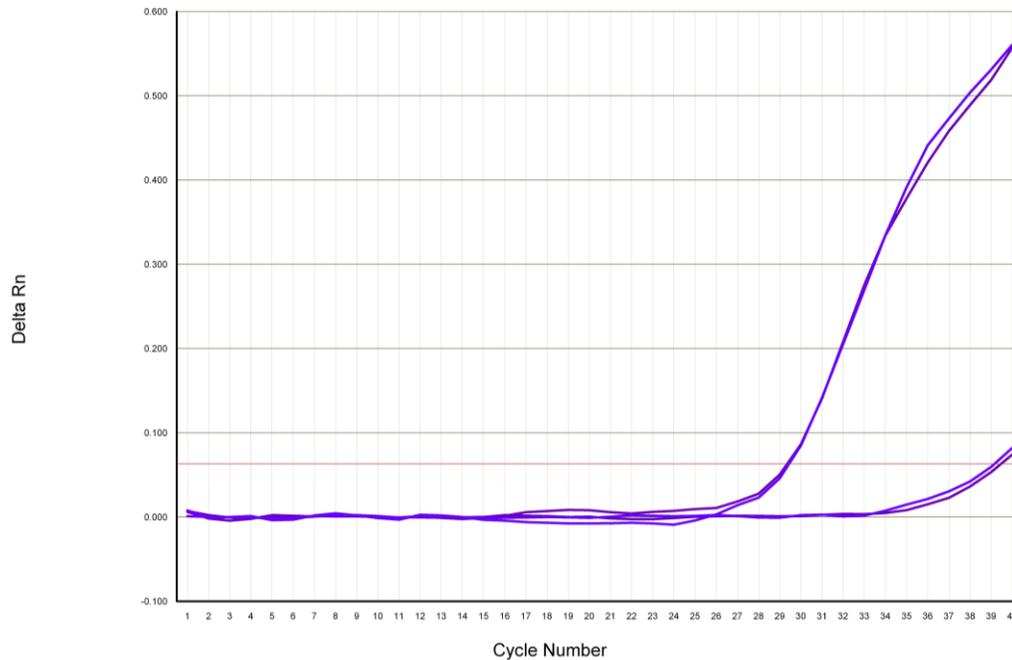


Figura 6.8.1 Gráfica de resultados de la prueba de interferencia de PMA y qPCR.

Podemos observar que para las dos señales correspondientes a 2 muestras en la figura (6.8.1) son positivas, y cada una tiene su señal del componente del control interno, la cual representa la curva inferior, y se observa como éstas se levantan en el mismo ciclo Ct por lo que no existe evidencia de una interferencia del colorante con la reacción del qPCR.

6.8.2 Fase experimental

Este experimento se realizó con una solución stock de ozono con una concentración de 10 mg/L, con un volumen final de reacción de 40 mL y un intervalo de CT desde 0.5 min-mg/L y hasta 20 min-mg/L, 1 tiempo de contacto de 1 minuto (excepto para la muestra de CT 20 mg/L), con 1 mL de la solución bacteriana ajustada 3 de mcFarland, es decir con 2.25×10^7 UFC/mL.

Los CT utilizados en este experimento se muestran en la tabla (6.8.2), así como las configuraciones que tuvo cada muestra.

TABLA 6.8.2 TABLA DE VALORES DE CT UTILIZADOS EN EXPERIMENTO #1

Muestra	1	2	3	4	5
C1 Stock (mg/L)	10				
CT (min-mg/L)	0.5	1	2	5	20
V2 Total (mL)	40				
V1 Stock (H ₂ O-O ₃)	2	4	8	20	40*
Microorganismo (mL)	1	1	1	1	1
SSI	37	35	31	19	0

*Esta muestra se dejó actuar por 2 minutos

Los resultados del experimento se describen a continuación y representan la tendencia de las muestras, por lo que no se realizó cuantificación en el experimento #1, posteriormente se realizó la cuantificación en el experimento #2.

Experimento #1

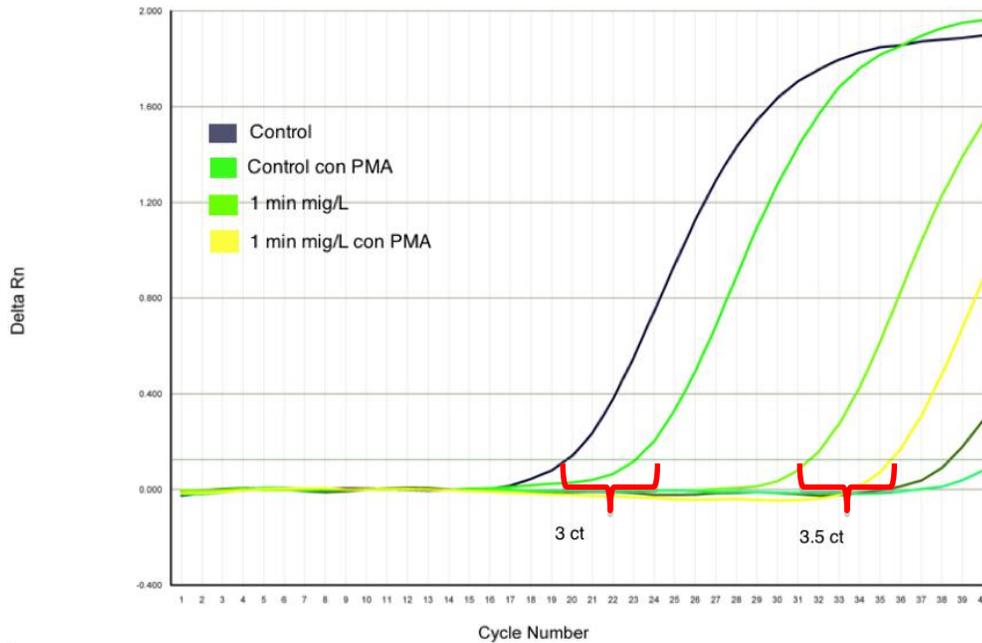


Figura 6.8.2 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad, en experimento #1.

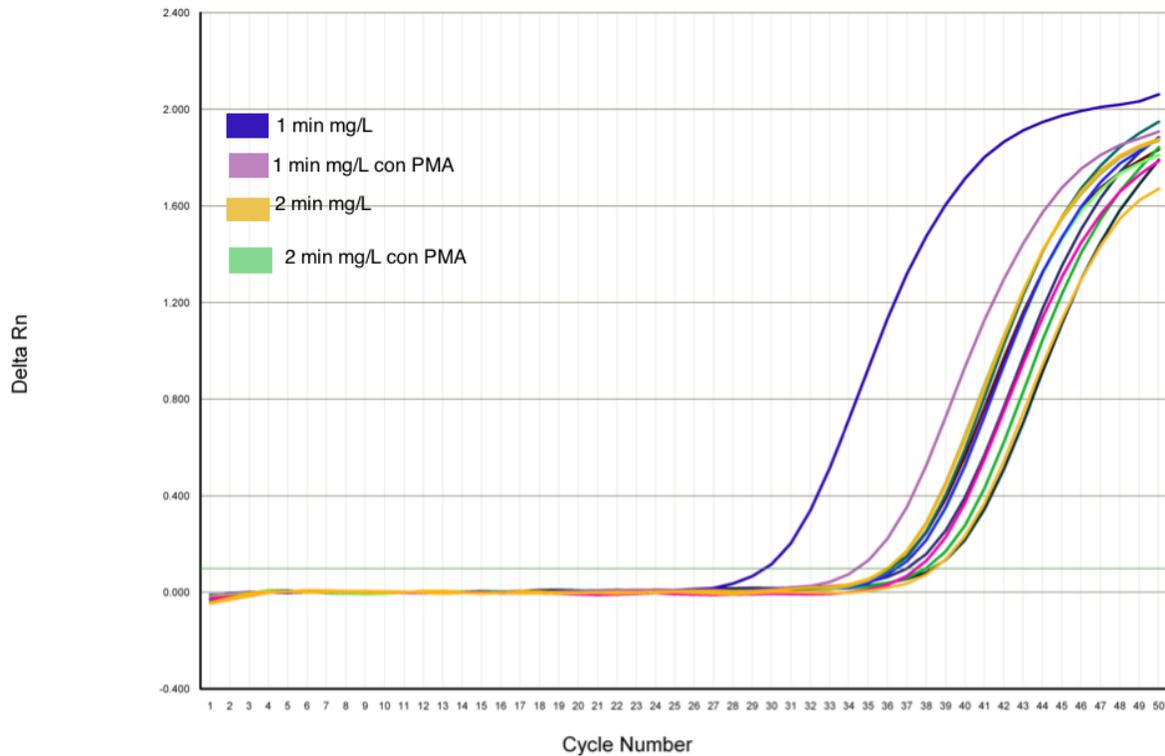


Figura 6.8.3 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#1.

Podemos observar en la figura (6.8.2) una tendencia importante, al comparar el experimento control con su similar con PMA, se observó una diferencia la cual refleja que la suspensión bacteriana que se utilizó no estaba completamente viable, probablemente existen bacterias con daño parcial que logran retenerse en la membrana de policarbonato pero éstas estarán muy dañadas de la membrana lo cual lo hace que el PMA las traspase y no sean cuantificadas, sin embargo esto comprueba que la suspensión inicial se encuentra en un estado mayormente cocoide. Esto mismo pasa con un CT de 1 min-mg/L, en donde el ozono daña a las bacterias pero no lo suficiente para lisarlas e inactivarlas por completo. Conforme se va aumentando la dosis de ozono los valores con y sin colorante se van acercando más, y a partir de 2 min-mg/L la diferencia es muy pequeña, esto significa que el ozono en un CT de 2 min-mg/L es suficiente para romper casi por completo la membrana bacteriana e inactivar la bacteria en su totalidad.

Experimento #2

El experimento se repitió para incluir una curva estándar y poder hacer la cuantificación bacteriana. A continuación se muestran los resultados en la tabla (6.8.3.1), los cuales reflejan el promedio de 3 repeticiones.

TABLA 6.8.3.1 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS EXPERIMENTO #2

Muestra	UFC promedio	Diferencia entre métodos
Cepa exp.	1.00E+07	3.00E+06
Cepa exp. PMA	7.00E+06	
Control	5.71E+07	5.14E+07
Control PMA	5.71E+06	
0.5 min-mg/L	2.11E+06	
PMA 0.5 min - mg/L	2.07E+06	4.30E+04
1 min-mg/L	3.72E+04	35143
PMA 1 min-mg/L	2.06E+03	
2 min-mg/L	2.10E+03	274
PMA 2 min-mg/L	1.83E+03	
20 min-mg/L	1.62E+02	
PMA 20 min - mg/L	1.15E+02	47

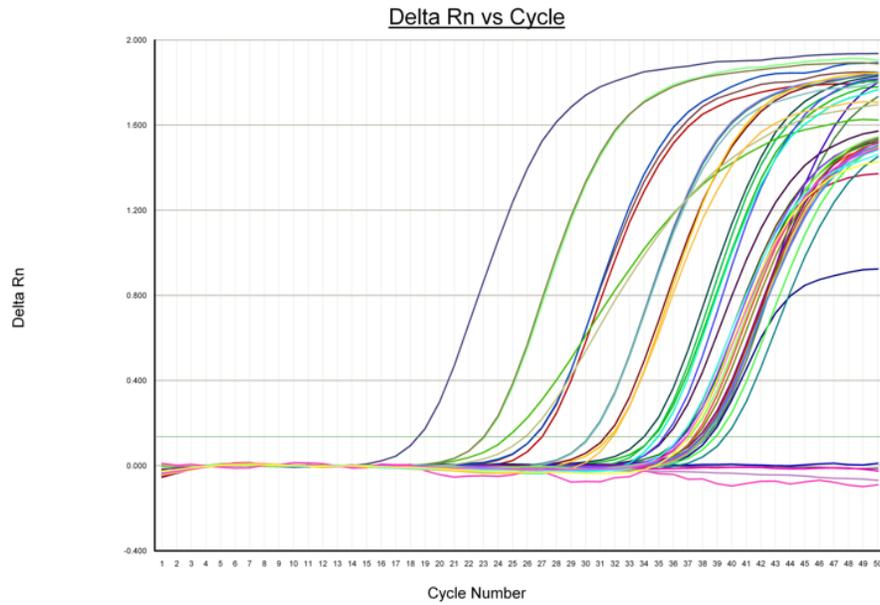


Figura 6.8.4 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#2.

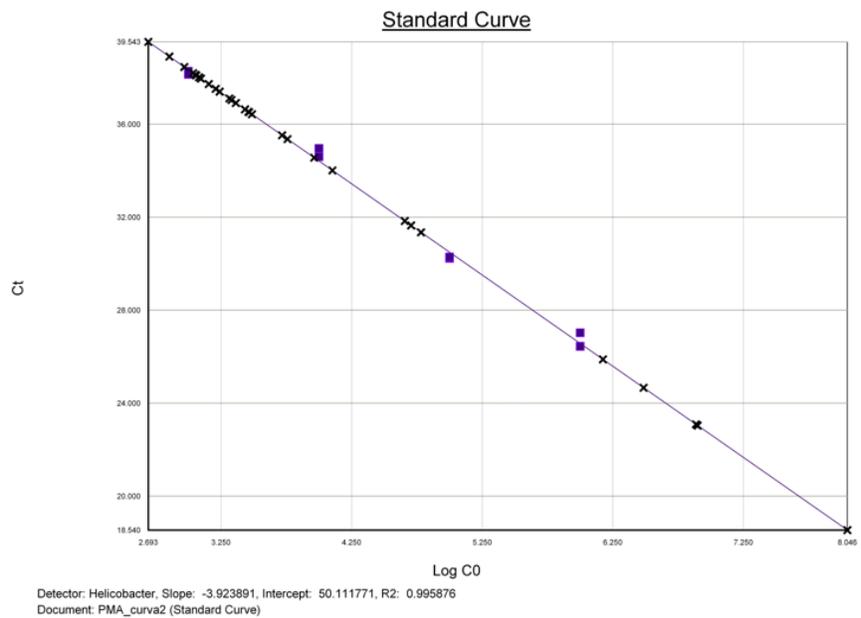


Figura 6.8.5 Gráfica de resultados de la prueba de viabilidad experimento#2, ajuste de curva estándar.

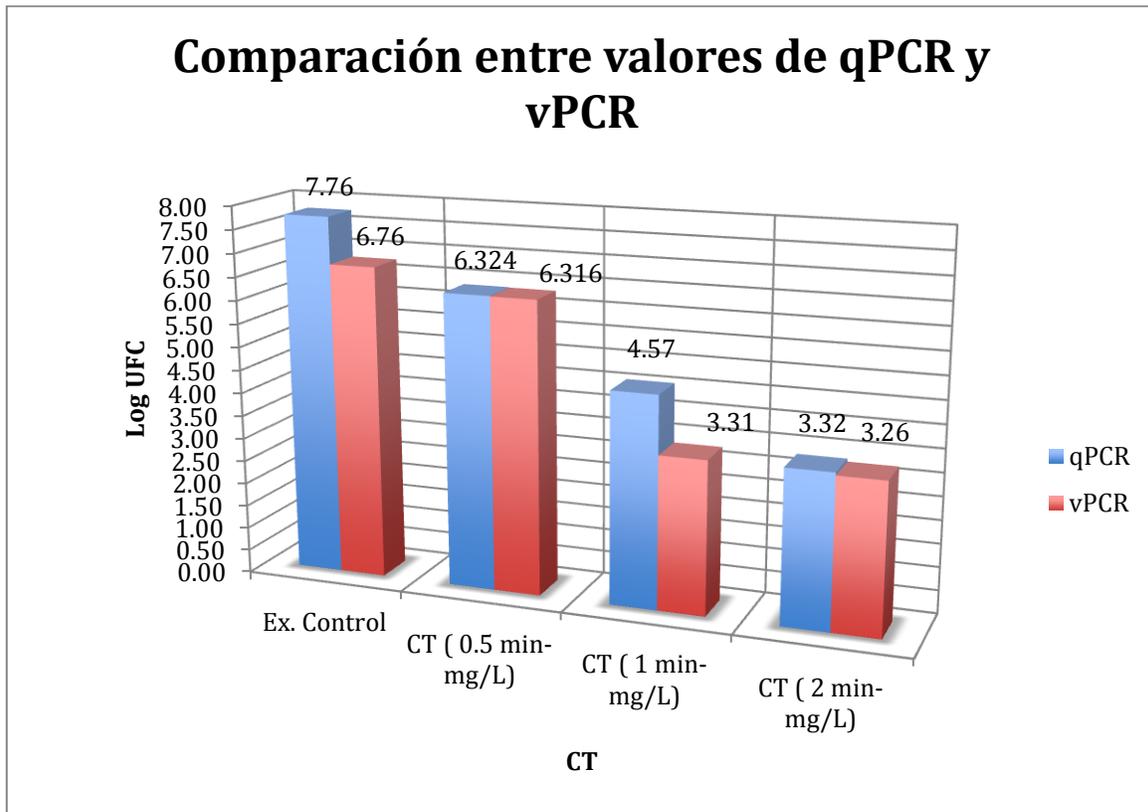


Figura 6.8.6 Comparativo entre ensayo qPCR y vPCR con valores logarítmicos.

De la tabla (6.8.3.1) se puede deducir que sí existe diferencia en los resultados del experimento, entre la muestra con colorante PMA y sin PMA. Fue interesante observar que la cepa original tuvo un 70% de células viables, mientras que la muestra del experimento control tuvo un bajo número de células inviables 10%, lo cual es entendible si sabemos que partimos de la cepa en un estado exponencial y debe estar prácticamente con todas las células viables, mientras que la cepa que se utiliza para el experimento de desinfección se encuentra en estado cocoide y ha sido inducido dicho estado a través de un periodo de tiempo, por lo que la suspensión ha sufrido una pérdida en la viabilidad de las bacterias.

Conforme se fueron aplicando las dosis de ozono, se observó que con la dosis de ozono más baja (0.5 min-mg/L), la diferencia entre el conteo con PMA y sin PMA era muy alto, esto

significa que la cantidad de ozono aplicada no fue suficiente para romper las células y el colorante penetró sólo en algunas bacterias que fueron dañadas. Esto provoca un alto grado de incertidumbre entre las técnicas, lo cual generaría una diferencia significativa en la medición a dosis bajas. Al incrementar la dosis se observó cómo el ozono fue lo suficientemente fuerte logrando no sólo ocasionar daños en las membranas, si no que también provocó daños al DNA y por lo tanto el resultado del qPCR y vPCR fue consistente.

Por lo tanto se comprobó que la metodología de cuantificación funciona de manera correcta, siempre y cuando se mantengan los valores de CT mayores de 1 min-mg/L para poder asegurar los resultados. Esto se puede observar en la tabla (6.8.3.2) en la cual vemos que los resultados en porcentaje de los procesos de desinfección son muy diferentes para dosis de 0.5 min-mg/l, pero muy similares conforme se aumenta la dosis.

El uso del colorante PMA requirió de un análisis de falsos positivos y falsos negativos, éste se explica detalladamente en la sección (5.6); con el cual se pudo conocer el número de células reales de partida, este cálculo se realizó partiendo del esquema de la figura (6.8.7), en la cual se delimitan con la letra (a) los falsos negativos y con la letra (b) los falsos positivos. Para calcular estas fracciones se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Para esta prueba se generaron muestras con viabilidad cercana al 100% es decir la suspensión bacteriana en su forma exponencial y un valor de muerte total con una dosis extrema de ozono.

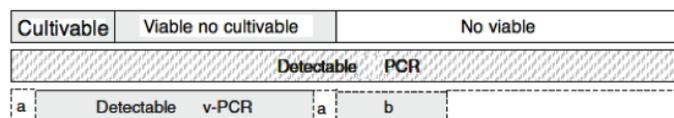


Figura 6.8.7 Esquema para el análisis de las muestras con PMA

$$a = qPCR \text{ exp} - vPCR$$

$$b = vPCR - kPCR$$

$$rPCR = vPCR + a - b$$

Memoria de cálculo:

$$a = 1x10^7 - 7x10^6$$

$$a = 3x10^6$$

$$b = 7x10^6 - 1.15x10^2$$

$$b = 6999885$$

$$rPCR = 7x10^6 + 3x10^6 - 6999885$$

$$rPCR = 3x10^6$$

TABLA 6.9.3.2 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS DE DESINFECCIÓN EXPERIMENTO #2.

Muestra	UFC promedio	% Desinfección sin PMA	Reducción log sin PMA	% Desinfección con PMA	Reducción log con PMA
Control	5.71E+07				
Control PMA	5.71E+06				
0.5 min-mg/L PMA 0.5 min - mg/L	2.11E+06	96.3034	1.43	31.05	0.16
1 min-mg/L PMA 1 min-mg/L	3.72E+04	99.9349	3.19	99.93	3.16
2 min-mg/L PMA 2 min-mg/L	2.10E+03	99.9963	4.43	99.94	3.22
20 min-mg/L PMA 20 min-mg/L	1.62E+02	99.9997	5.55	100.00	4.41
	1.15E+02				

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La técnica implementada para detectar y cuantificar *H. pylori* por medio de qPCR, amplificando una fracción del gen *ureA* como secuencia blanco, permitió evaluar a dicha bacteria en su forma viable y en su forma VNC en matrices tales como agua de pozo y en agua destilada con 0.9 % NaCl (SSI).

El procedimiento de filtrado y recuperación del paquete celular por medio de una membrana de policarbonato de 0.4 μm de tamaño de poro, tuvo un impacto significativo para cuantificar a *H. pylori* después del proceso de ozonación. Gracias al procedimiento de filtrado se tuvo la ventaja de llevar a cabo la separación de bacterias rotas e íntegras por medio de el tamaño de poro del filtro, sin embargo las baterías semi-rotas serán recuperadas, por lo cual será necesario agregar una prueba extra de viabilidad como vPCR. Sin embargo, aunque el proceso de recuperación de la células por medio de agitación funcionó adecuadamente; si éste no se realiza adecuadamente podrían generarse variaciones en la medición, ya que se necesita ser muy cuidadoso en el desprendimiento de toda la película bacteriana y aplicar una agitación vigorosa, de tal manera que se genere una suspensión bacteriana homogénea. Existen concentradores de proteínas que se pueden utilizar en lugar de la filtración por membrana, sin embargo éstos tienen un costo muy elevado, lo cual volvería al ensayo muy difícil de costear.

Mediante la técnica implementada fue posible detectar y cuantificar a *H. pylori* antes y después de un proceso de desinfección con ozono, con lo cual fue posible conocer la

dosis de ozono necesaria para causar daños irreversibles a la bacteria y lograr inactivarla, pudiendo determinar su resistencia al desinfectante. Los resultados muestran que con un valor de CT de 1.5 min-mg/L se alcanza una inactivación del 99% equivalente a una inactivación 2 log, pero se recomienda un CT de 2 min-mg/L para asegurar una inactivación 3 log. Este valor CT se encuentra dentro de los parámetros internacionales de desinfección con ozono, ya que para la desinfección se suele recomendar un residual de 0.4 mg/L de ozono durante 10 minutos, o seguir los lineamientos para la inactivación de quistes de *Giardia lamblia* uno de los microorganismos más difíciles de eliminar, para el cual se necesita aplicar un CT de 4-5 min-mg/L (Owens *et al.*, 1994), por lo tanto para la eliminación de esta bacteria, bastaría con seguir los lineamientos para *Giardia lamblia*.

Se logró conocer la viabilidad del proceso de desinfección mediante el uso de un colorante fotorreactivo de alta afinidad al DNA llamado PMA, con el cual se evaluó la integridad de las membranas bacterianas mediante el conteo por medio del ensayo de vPCR,; un conteo sólo de células viables durante el proceso de ozonación y se llevó a cabo una comparación con la técnica implementada de qPCR.

La técnica de tinción con PMA mostró que a dosis por debajo de 0.5 min-mg/L de ozono y arriba de 1.0 min-mg/L, los resultados entre la técnica de qPCR y vPCR pueden ser comparables; sin embargo con dosis de 0.5-1.0 min-mg/L se generan diferencias en el conteo bacteriano entre las técnicas, esto debido a que el ozono no logra romper la membrana de todas las bacterias, dejando algunas bacterias semi-rotas las cuales son teñidas por el colorante y no son tomadas en cuenta en la cuantificación por qPCR; por lo tanto sólo se rompe parcialmente la membrana pero no se alcanza a degradar el DNA, con lo cual el qPCR es capaz de detectar y cuantificar dichos genomas, generando falsos positivos. Sin embargo en dosis >1 min-mg/L el ozono logra romper las células completamente y degrada no solo la membrana si no que alcanza al material nucleico. Mediante esta técnica se establecieron los límites dentro de los cuales se puede asegurar el uso de qPCR en términos de viabilidad, evitando la contabilización de falsos positivos.

8. CONCLUSIONES

Este trabajo logró implementar y evaluar la aplicación de una técnica molecular como qPCR en la ingeniería ambiental. Probablemente *H. pylori* no sea un candidato para convertirse en un organismo indicador, ya que su incidencia en los sistemas públicos de distribución de agua es bajo pero debería de tomarse muy en cuenta a los microorganismos que entran en estados morfológicos no cultivables por métodos tradicionales y por lo tanto difíciles de detectar y cuantificar, convirtiéndolos en problemas públicos de salud. Será necesario conocer más acerca de este estado para poder desarrollar una metodología molecular que se incluya en los ensayos de rutina de calidad del agua, y este trabajo brinda una importante aportación a este tema.

También se logró entender la resistencia de la bacteria en su forma cocoide (VNC) de adaptación al medio ambiente ante un proceso de desinfección por medio de ozono, lo cual no ha sido reportado en la literatura internacional. Se obtuvo la dosis necesaria de ozono para causar daños irreversibles sobre la membrana de la bacteria y el DNA, provocando la muerte celular; esto es de gran relevancia ya que sin una metodología molecular esto no hubiera sido posible de observar debido a la imposibilidad de cultivo de la bacteria en su estado VNC.

Se implemento un procedimiento alternativo para detectar la viabilidad de las bacterias sometidas al ozono mediante la técnica de vPCR, con la cual se diferenció entre formas

viables y no viables. Este es un tema que se cita constantemente, por que se demuestra la deficiencia de la técnica de qPCR para medir viabilidad. Con esta prueba se logró fijar los límites dentro de los cuales la técnica implementada de qPCR arroja datos que pueden ser comparables con evaluaciones de viabilidad.

Este trabajo aporta información sobre técnicas comúnmente utilizadas en otras áreas académicas y cómo es posible aplicarlas en la ingeniería ambiental, por lo que abre un canal de investigación muy interesante y con un gran potencial dentro de la ingeniería ambiental, el cual se irá viendo reflejado conforme la tecnología vaya facilitando las herramientas moleculares, con lo que se irán cambiando y dejando atrás algunas metodologías obsoletas.

Recomendaciones para estudios posteriores

Como recomendaciones para estudios posteriores se sugiere continuar el estudio y aplicación de técnicas moleculares en el campo ambiental en lo que respecta a la medición de la eficiencia de desinfección con agentes que dañen el DNA como lo es el ozono, UV, campo eléctrico pulsado.

Se sugiera continuar con el estudio de la forma de resistencia VNC de bacterias que entran en dicho estado, sobre todo por que las normas de calidad sólo abarcan la medición de patógenos por plaqueo.

El uso de un ensayo de viabilidad será necesario para poder evaluar las diferencias que puedan ser generadas con el qPCR.

9. BIBLIOGRAFÍA

- APHA, American Public Health Association, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. *American Public Health Association*, Washington, DC.
- Adams, B. L.; Bates, T. C.; Oliver, J. D. (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (12), 7462–7466; Am Soc Microbiol.
- Agustí, G.; Codony, F.; Fittipaldi, M.; Adrados, B.; Morató, J. (2010) Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter*, **15** (5), 473–476; Wiley Online Library.
- Almeida, C.; Guimarães, N.; Keevil, C. W.; Vieira, M. J. (2006) Maintenance of spiral morphology and formation of biofilms on copper surfaces by water-exposed *Helicobacter pylori*.
- Azevedo, N. F.; Almeida, C.; Cerqueira, L.; Dias, S.; Keevil, C. W.; Vieira, M. J. (2007) Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (10), 3423–3427.
- Bader, H. Hoigné, J. (1981) Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Research*, **15**(4), 449 - 456.
- Baker, K. H.; Hegarty, J. P.; Redmond, B.; Reed, N. A.; Herson, D. S. (2002) Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (2), 981–984; Am Soc Microbiol.
- Bitton, G (2011), *Wastewater microbiology*, 4th ed, Willey-Blackwell, USA, 777.
- Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT (2002) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett appl. Microbiol.* (34) 450-454.
- Carbone M, Mageri TL, Gugliandolo C, La Camera E, Biondo C, Ferrà MT (2005) Occurrence of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina). *J. Applied Microbiology* (98) 768-774.
- Cellini L, Del Cecchio A, Di Candia M, Di Campi E, Favaro M, Donelli G (2004) Detection of free plankton-associated *Helicobacter pylori* in sea water. *J. Appl. Microbiology* (97)

285-292.

- Defining Established and Emerging Microbial Risks in the Aquatic Environment: Current Knowledge, Implications, and Outlooks. (2011) Defining Established and Emerging Microbial Risks in the Aquatic Environment: Current Knowledge, Implications, and Outlooks, **2011**, 1–15.
- Dent, C., McNulty, C.A.M (1988) Evaluation of a new selective médium for *Campylobacter pylori*. *J. Microbiology infection* (7), 555-568.
- Dupray, E., Caprais, M.P., Derrien, A., Fach, P. (2003) Salmonella DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.* (**82**), 507-510.
- Fernández-Delgado, M.; Contreras, M.; García-Amado, M. A. (2008) Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*; INCI.
- Fittipaldi, M.; Codony, F.; Adrados, B.; Camper, A. K.; Morató, J. (2010) Viable Real-Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? *Microb Ecol*, **61** (1), 7–12.
- Ford, A.; Delaney, B.; Forman, D. (2008) Tratamiento de erradicación de la úlcera péptica en pacientes con pruebas positivas para el *Helicobacter pylori*. *La Biblioteca ...*
- Goodwin, Armstrong, J.A, Chilvers, T, Peters, M., Colins, M.D., Sly, L., McConnell, W. & Harper, W.E.S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. As *Helicobacter pylori* com. Nov. And *Helicobacter mustelae* com. Nov., respectively *Int. J syst. Racterol.*, (39), 397-405.
- Goodman KJ, Correa P, TenganaAux HJ, Ramírez H, DeLany JP, Guerrero Pepinosa O, López Quiñones M, Collazos Parra T (1996) *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* (144) 290-299.
- Goodwin, C.S. (1993) Gastric Cancer and *Helicobacter pylori*: the whispering killer? *The Lancet* (342), 507-508.
- Gunten, Von, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*, **37**(7), 1443–1467.
- Gupta, V. K.; Carrott, P. J. M.; Ribeiro Carrott, M. M. L.; Suhas. (2009) Low-Cost Adsorbents: Growing Approach to Wastewater Treatment—a Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **39** (10), 783–842.
- Hoigné J, Bader H. (1985) Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. III: Inorganic compounds and radicals. *Water Res* (19), 993.
- Kator, H. Rhodes, M (2003), Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance, en *The handbook of water and wastewater microbiology*, Elsevier 8, 114-136.
- Khadre, M. A.; Yousef, A. E.; Kim, J. G. (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, **66** (9), 1242–1252; Wiley Online Library.
- Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO (1991) Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* (337) 1503-1506.

- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandenbroucke- Grauls (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* (65),3672–3679.
- Kusters, J. G.; van Vliet, A. H. M.; Kuipers, E. J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **19** (3), 449–490.
- Langlais, B. Reckhow, D.A. Brink, D.R (2000), Ozone in water treatment; application and engineering. *American water works association*, Lewis publishers,54-61.
- Linke, S.; Lenz, J.; Gemein, S.; Exner, M.; Gebel, J. (2010) Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **213** (3), 176–182.
- Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K (2002) Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Env. Microbiology* (68), 1436-1439
- Marshall, B.J. & Goodwin, C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis* int. *J syst. Bacteriology*, (37), 68-70.
- Marshall, B. (2002) *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians*, **2** (2), 147–152; Royal College of Physicians.
- Marshall, B. J.; Windsor, H. M. (2005) The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *Medical Clinics of North America*, **89** (2), 313–344.
- Mazari-Hiriart, M.; López-Vidal, Y.; Castillo-Rojas, G.; de León, S. P.; Cravioto, A. (2001) *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Archives of medical research*, **32** (5), 458–467; Elsevier.
- McKee and McKee, *Biochemistry*, 5th Ed, 2011 Oxford University Press,USA.
- Moreno, ferrus MA, Alonso JL, Jiménez A, Hernández J (2003) use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in wáter water researh (37), 2251-2256
- Moreno, Y.; Piqueres, P.; Alonso, J. L.; Jiménez, A.; González, A.; Ferrús, M. A. (2007) Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research*, **41** (15), 3490–3496.
- Mustafa, M. G. (1990) Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, **9** (3), 245–265; Elsevier.
- Oliver, J. D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*, **43** (1), 93–100.
- Owen 1998 *Helicobacter* species classification and identification Br, *Med Bull* (**54**), 17-30.
- Pel, P.K. (1899) *Ziekten van de Maag* (Diseases of the stomach) amsterdam, De Erven, F. Bohn.
- Perez RR, Nunez SA, Baluja C, Otero ML. (1995). Ozonation kinetics of glucosamine and N-acetyl glucosamine in aqueous medium. *Ozone Sci Eng* **17**(4):463-467.
- Rowan N.J., (2011). Defining Established and Emerging Microbial Risks in the Aquatic Environment: Current Knowledge, Implications, and Outlooks, *International Journal of*

Microbiology.

- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L. (2005) Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* (71)1018-1024.
- Selected major risk factors and global and regional burden of disease. (2002) Selected major risk factors and global and regional burden of disease. Retrieved from [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140-6736\(02\)11403-6](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140-6736(02)11403-6)
- Sen, K (2011), *Environmental Microbiology; Current Technology and Water applications*, 1^a ed, Caister academic press, Cincinnati, OH, USA, 316pp.
- She, F. F.; Lin, J. Y.; Liu, J. Y.; Huang, C.; Su, D. H. (2003) Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 9 (3), 516–520.
- Skirrow, M.b. (1977) *Campylobacter* enteritis a “new” disease. *Br. Med. J.*, (2),9-11.
- Solnick, J. V.; Hansen, L. M.; Canfield, D. R.; Parsonnet, J. (2001) Determination of the Infectious Dose of *Helicobacter pylori* during Primary and Secondary Infection in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Infection and Immunity*, 69 (11), 6887–6892.
- Stingl, K., K. Altendorf, and E.P. Bakker (2002) Acid Survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiology*, (10), 70-74.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G. (1998) A community-based seroepi- demologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis*, 178:1089.
- Vale, F. F.; Vítor, J. M. B. (2010) Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*, 138 (1-2), 1–12; Elsevier B.V.
- Van Vliet, A. H. M., J. Stoof, S.W. Poppelaar, S. Bereswill, G. Homuth, M. Kiest, E.J. Kuipers, J.G. Kusters. (2003) Differential regulation of amidase and formation mediated ammonia production by *Helicobacter pylori* fur repressor. *J. Biol. Chem.*, (278), 9052-9057.
- Yáñez, M. A.; Barberá, V. M.; Soria, E.; Catalán, V. (2009) Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. *J Appl Microbiol*, 107 (2), 416–424.