

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE
Vibrio cholerae O1 EN UN
AMBIENTE DE BAJOS NUTRIENTES”**

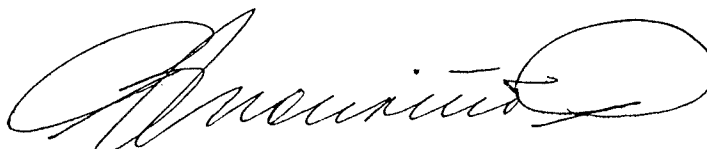
**Tesis para obtener el título
de oceanólogo presenta:
Olga Lingard González**

Ensenada, Baja California, Junio del 2001

**“CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE
Vibrio cholerae O1 EN UN AMBIENTE DE
BAJOS NUTRIENTES”**

T E S I S
que presenta:
Olga Lingard González

Aprobada por:



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director



M.C. Amelia Portillo López
Sinodal titular



Dr. Ramón Cajal Medrano
Sinodal Titular

Resumen

El germen causal del cólera es *Vibrio cholerae* O1 ocupa un lugar importante en la ecología de ambientes estuarinos y marinos ya que estos microorganismos son capaces de sobrevivir a varios cambios físico-químicos, incluyendo variaciones en la concentración de nutrientes. Los cambios más evidentes ante situaciones de falta de nutrientes son variaciones fenotípicas que se manifiestan en el cambio de tamaño y la forma del microorganismo. La bacteria presenta cambios morfológicos en su ciclo de vida y es diferente en las distintas fases de desarrollo. En el presente trabajo la morfología de *Vibrio cholerae* O1 fue estudiada en un microcosmos con una baja concentración de nutrientes y por medio del microscopio electrónico de barrido se tomaron 2,789 imágenes individuales para medir el tamaño (largo y ancho) y observar los cambios de forma durante 92 días. Se registraron bacterias con una forma inicial de bastón curvo hasta la transformación de formas totalmente esféricas y la paulatina reducción de su tamaño con organismos de $0.1\mu\text{m}$ a $6.01\mu\text{m}$, dejando de multiplicarse en el día 22. Las formas de bastón y esférica se presentan durante todo el seguimiento aunque la proporción cambia con el tiempo antes de perder la culturabilidad los bastones predominaron y después las formas cocoides.

A MIS PADRES;
OLGA GONZALEZ Y WALTER LINGARD†
Y A MI HERMANO WALTER

Agradecimientos

A mi directora de tesis Rosa Reyna Mouriño Pérez por haber aceptado dirigir esta tesis. Por su confianza. Paciencia y sobre todo por su amistad.

A Amelia Portillo López por sus observaciones y comentarios.

A Ramón Cajal Medrano porque con sus cuestionamientos enriqueció este trabajo.

A Israel Gradilla por su gran apoyo con las innumerables muestras en el microscopio electrónico de Barrido.

A Eripac S.A por su apoyo económico y la oportunidad de trabajar con ellos.

A Atenas Fish Market por su apoyo económico para poder continuar con mis estudios.

A la familia Morales González por hacerme parte de su vida.

Al Dr. Leonardo Morales por involucrarse en este trabajo y dedicarle su valioso tiempo, por su paciencia y patrocinio durante la carrera y lo más importante por ser el tío.

A Tonatiuh Mendoza por su apoyo incondicional en cualquier circunstancia, por sus sabios consejos y por ser un gran compañero.

A Mauricio Siles por su apoyo.

A Leonardo Inclan por su amistad incondicional.

A Judith Morales por ser la mejor compañera de casa y su ejemplo de ser una buena estudiante.

A Zac Kain por todos esos días playeros en San Miguel.

Y a todos los amigos.

INDICE

LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Importancia del colera	4
II.2 <i>Vibrio cholerae</i> O1	7
II.3 Ambiente natural y <i>Vibrio cholerae</i> O1	8
II.4 Tamaño y forma	12
II.5 Mecanismos de sobrevivencia en la falta de nutrientes	12
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	14
V. MATERIAL Y METODOS	14
V.1 Preparación del método de cultivo	14
V.2 Desarrollo de estadios del <i>Vibrio cholerae</i> O1	15
V.2.1 Inoculación del microcosmo y procesamiento de muestras	15
V.3 Preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido	15
V.4 Análisis Estadístico	16
VI. RESULTADOS	17
VI.1 Análisis del tamaño del <i>Vibrio cholerae</i> O1	17
VI.2 Análisis de las variaciones morfológicas	25

DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Pandemias mundiales (Pollitzer)	5
Tabla II. Distribución de la longitud (μm) del <i>Vibrio cholerae</i> O1	18
Tabla III. Distribución del ancho (μm) en de <i>Vibrio cholerae</i> O1	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principales corrientes superficiales marinas	11
Figura 2.	Distribución de la longitud en μm del <i>Vibrio cholerae</i> O1, considerando los valores mínimo, máximo y cuartiles, durante los 92 días de seguimiento	20
Figura 3.	Distribución de la longitud en μm del <i>Vibrio cholerae</i> O1, considerando los valores el intervalo de confianza al 95%, durante los 92 días de seguimiento	20
Figura 4.	Distribución del ancho en μm del <i>Vibrio cholerae</i> O1, considerando los valores mínimo, máximo y cuartiles, durante los 92 días de seguimiento	22
Figura 5.	Distribución del ancho en μm del <i>Vibrio cholerae</i> O1, considerando los valores el intervalo de confianza al 95%, durante los 92 días de seguimiento	22
Figura 6.	Dendrograma de las variaciones del tamaño del <i>Vibrio cholerae</i> O1 durante los 92 días de seguimiento	23
Figura 7.	Similitud de tamaño del <i>Vibrio cholerae</i> O1 día por día del seguimiento	24
Figura 8.	Proporción de células de <i>Vibrio cholerae</i> O1 de acuerdo a las variaciones morfológicas más frecuentes	26
Figura 9.	Variación morfológica de <i>Vibrio cholerae</i> O1 tipo serpentina	26
Figuras 10.	Variaciones morfológicas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 tipo bastón	27
Figuras 11.	Variaciones morfológicas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en división	28
Figuras 12.	Variaciones morfológicas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 pequeños bastones	28
Figuras 13.	Variaciones morfológicas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 de tipo esfera	29

Introducción

El cólera es una enfermedad diarreica responsable de una gran mortalidad en todo el mundo, particularmente en el Sur de Asia y la India de donde es un problema endémico (Fernández de Castro, 1991).

Durante mucho tiempo se pensó que el reservorio principal de *Vibrio cholerae* O1 era el aparato digestivo del ser humano, en la actualidad se ha podido documentar el origen estuarino y marino de esta bacteria (Colwell y Kaper, 1977; Blake *et al.*, 1980). El ciclo de transmisión hombre–ambiente–hombre ha mostrado que el agua y los alimentos contaminados son los principales vectores de la enfermedad (Colwell y Huq, 1994b).

En la actualidad se conocen dos biotipos de *Vibrio cholerae* O1 responsables del cólera: el clásico y El Tor, y tres serotipos los cuales son Inaba, Ogawa e Hikojima. Pertenecen al grupo “O” y son toxigénicos, así como *Vibrio cholerae* O139 que también produce esta enfermedad (Fernández de Castro, 1991).

En los últimos 25 a 30 años se ha descrito la existencia de ciertos reservorios acuáticos en los que *Vibrio cholerae* se reproduce degradando a algunas especies planctónicas marinas (Morris y Black, 1985).

Vibrio cholerae ocupa un lugar importante en la ecología de ambientes estuarinos y marinos ya que estos organismos son capaces de sobrevivir a varios cambios físico-químicos, incluyendo variaciones en la concentración de nutrientes, temperatura, pH, oxígeno disuelto, entre otros (Rozak y Colwell, 1987).

Marshall (1979), Novitsky y Morita (1978) han propuesto que *Vibrio cholerae* en condiciones limitadas de nutrientes experimenta cambios morfológicos y fisiológicos, demostraron que la disminución de nutrientes en agua de mar natural y artificial, en un *Vibrio* sp. ANT-300 psicrófilico incrementó el número de células y disminuyó su volumen, y cambio su forma típica de bacilo a la forma cocoidal (Novitsky y Morita, 1976). En el 99% de las células cocoides ellos observaron una disminución en la respiración endógena y el DNA celular se redujo en un 40%. Reichardt y Morita (1982) mostraron que las cepas acuáticas de *Cytophaga johnsonae* fueron capaces, en condición de desnutrición, de incrementar en número, producir pequeños bastones, células cocoides, y células alargadas.

Los cambios en la morfología del *Vibrio* spp. fueron estudiados por Felter *et al.*, (1969) y Baker y Park (1975). En los dos casos estos cambios parecen ser parte del ciclo de vida de la bacteria. Aunque en otras bacterias en condiciones controladas de nutrición (Ensign y Wolfe, 1964) no se observaron cambios en el tamaño y la forma del organismo.

Los factores que proporcionan los cambios morfológicos en la familia Vibronacea son: temperatura, concentración de nutrientes, salinidad, presión osmótica y pH (Colwell y Huq, 1994a). De cualquier modo, las células bacterianas tienen una adaptación para los cambios de condiciones de su entorno mediante una variedad de mecanismos metabólicos. La bacteria puede adaptarse a una cantidad de nutrientes limitantes para su crecimiento y ajustarse o tomar otras rutas metabólicas para evitar daños moleculares y/o estructurales causados por la limitación de algún nutriente.

La importancia de este estudio fue evaluar e identificar los cambios morfológicos y de tamaño así como la duración en la disminución de la bacteria *Vibrio cholerae* O1 bajo condiciones de escasez de nutrientes, para observar los cambios fenotípicos de la bacteria en un medio adverso.

Antecedentes

Importancia del cólera

El cólera es una infección intestinal diarreica producida por la enterotoxina del *Vibrio cholerae* O1. Este padecimiento de aparición súbita puede llevar al ser humano susceptible a la deshidratación severa, a alteraciones vasculares e incluso a la muerte en menos de 24 horas de no ser tratado adecuadamente. (Fernández de Castro, 1991; Giono-Cerezo *et al.*, 1991; Sánchez y Taylor, 1997).

Hasta ahora, las únicas cepas conocidas de la bacteria del cólera capaces de producir la enterotoxina responsable de la enfermedad son el *Vibrio cholerae* O1 biotipo clásico y El Tor y *Vibrio cholerae* O139 (Krieg y Holt, 1984).

Esta enfermedad representa para la humanidad uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad, no solo por sus repercusiones a nivel individual, sino también por el gran número de personas que afecta alrededor del mundo (Colwell, 1996).

La información del cólera como enfermedad viene desde los tiempos de Hipócrates y de Buda y es probable que antes, sin embargo, es hasta 1883 cuando Robert Koch muestra que la enfermedad es causada por una bacteria (Fernández de Castro, 1991).

El bacilo del cólera es endémico del delta del Río Ganges y desde esta área se difundió extensivamente por todo el mundo abarcando los cinco continentes, esto ha sucedido por varias ocasiones durante los siglos XIX y XX (Fernández de Castro, 1991; Blake, 1994).

Las fechas propuestas por Pollitzer para las siete pandemias que ha habido a partir de 1817 se observan en la Tabla I:

Tabla I. Pandemias mundiales (Pollitzer)

Pandemia	Año de inicio	Año de finalización
1	1817	1823
2	1829	1851
3	1852	1859
4	1863	1879
5	1881	1896
6	1899	1923
7	1961	¿?

La enfermedad se expandió siguiendo las rutas comerciales, turísticas o religiosas. Al continente americano llegó en 1832, iniciándose en Canadá. A México entró en 1833 por el puerto de Veracruz, seguido por Acapulco y Salina Cruz de donde se extendió a todo el país (Malvido y Cuenya, 1991). La principal ruta de distribución fue, y probablemente sigue siendo, la vía marítima, medio a través del cual, en esos años se distribuyó también a Centroamérica y América del Sur. A fines del siglo XIX y principios del siglo XX los conocimientos sobre la causa y la transmisión del cólera, propiciaron medidas drásticas de sanidad en puertos y fronteras, en consecuencia de lo cual la enfermedad se redujo notablemente. En 1962 se inicia la séptima epidemia mundial, originándose en el sureste de Asia, la cual se manifiesta en América hasta 1991 (Fernández de Castro, 1991; Malvido y Cuenya, 1991)

Esta epidemia mundial, a diferencia de las anteriores fue ocasionada por una variante de *Vibrio cholerae*, el clásico, denominado *Vibrio cholerae* biotipo El Tor, no

conocido antes de 1905. *Vibrio* El Tor se diferencia del clásico por la producción de hemolisina (Kaper *et al.*, 1979; Olarte, 1991).

Un brote importante, revelador del papel del pescado y los mariscos como fuente de infección, ocurrió en España entre el 16 julio y 7 noviembre de 1979, cuando se notificaron 267 casos de ocho provincias españolas (Fernández de Castro,1991).

En 1992, se aisló una nueva cepa de *Vibrio cholerae* capaz de producir la enfermedad del cólera. En muchos casos se comprobó que era causada por la presencia de la toxina producida por *Vibrio cholerae* O1 pero el organismo no pudo ser reconocido. Ese organismo causal es un nuevo serotipo perteneciente a los no O1 que se ha designado como O139. El descubrimiento de que la bacteria del cólera con el antígeno de pared O1 no es la única que puede producir la enfermedad, abre la posibilidad de que existan más bacilos con serogrupos O que pueden causar las epidemias (Fernández de Castro, 1991).

En México se tiene antecedentes de la existencia del cólera desde el siglo XIX ya que provocó muchas muertes. Sin embargo, desapareció espontáneamente a finales del mismo; los últimos casos fueron publicados en 1982 (Olarte, 1991), donde un turista norteamericano contrajo el cólera durante su estancia en Cancún. Estos hallazgos indican la existencia del cólera por un periodo cercano a dos décadas en esta región del continente, sin que llegara a propagarse en forma epidémica importante. Esta situación cambia dramáticamente en 1991 cuando se anuncia la aparición de una epidemia de cólera que avanza con rapidez en el Perú, y en unos cuantos meses se extendería a varios países de América del Sur. En mayo de 1991, se informó de su presencia en México, se

reconocen por lo menos cinco focos, sobresaliendo el estado de Chiapas (Fernández de Castro, 1991)..

Vibrio cholerae O1

El germen causal del cólera es *Vibrio cholerae* O1. Es una bacteria del género *Vibrio*, de la familia *Vibronaceae*, descubierta por Pacini en 1854 y descrito posteriormente por Robert Koch en 1883 (Blake, 1994). Son bacilos curvos Gram-negativo, con una dimensión de 1.4 a 2.6µm de largo y 0.5 a 0.8 de ancho, tiene motilidad por flagelo polar, es anaerobio facultativo y posee ambos metabolismos respiratorio y fermentativo (Giono-Cerezo *et al.*, 1991; Olarte, 1991; Kay *et al.*, 1994).

Es una bacteria heterótrofa, que requiere para su óptimo crecimiento concentraciones de cloruro de sodio de 5 a 15 mMNa⁺, además puede crecer en medios complejos sin sal, sin embargo, su crecimiento se reduce de un 50 a 80%. Necesita de un pH alcalino (pH óptimo de 7.0 a 9.0) para sobrevivir (pH máximo de 10.0), su multiplicación se inhibe con valores de pH por debajo de 6.0 y es oxidasa positivo. La temperatura idónea a la que crece es entre 20 a 37°C. Es susceptible a la desecación, la ebullición, y otros desinfectantes (Krieg y Holt, 1984; Giono-Cerezo *et al.*, 1991; Olarte, 1991; Kay *et al.*, 1994).

Por su estructura antigénica somática "O" (polisacárido de la superficie celular) se ha dividido en 144 serogrupos. El serogrupo O1 tiene la habilidad de producir enterotoxina que es determinante esencial de su virulencia. El resto de serogrupos se han denominado No O1 o no coléricos y se han visto asociados a otro tipo de infecciones como heridas y septicemia e incluso diarreas leves (Giono-Cerezo *et al.*, 1991).

La toxina que produce *Vibrio cholerae* O1 actúa en las células de la mucosa del intestino y es la responsable de la diarrea en la enfermedad. La toxina es una proteína *oligomérica* compuesta de una subunidad A₁ y subunidad A₂ y cinco subunidades B. La subunidad B es la responsable de bloquear a los receptores gangliosidos G_{m1} en la membrana celular y la subunidad A₁ activa la adenilciclase que incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico y la hipersecreción de sal y agua (Kaper *et al.*, 1979)

Ambiente natural y *Vibrio cholerae* O1

Los cambios climáticos globales que modifican los factores ambientales permiten un mejor entendimiento de la desaparición y aparición del cólera. El comportamiento de esta enfermedad es un excelente ejemplo, de cómo los fenómenos climáticos pueden ayudarnos a explicar la virulencia del agente causal, así como las características de la transmisión del padecimiento y su epidemiología (Colwell y Patz, 1991).

A partir de los 70's se documentó el origen estuarino del *Vibrio cholerae* O1 y se vinculó con diversos organismos marinos, en este sentido se ha propuesto que el conocimiento de la ecología de la bacteria en el océano y en las zonas costeras orientaría el conocimiento sobre la aparición, diseminación y manejo de las pandemias de cólera que azotan a la humanidad (Blake *et al.*, 1980; Colwell y Huq, 1994a).

La ciclicidad de las pandemias de cólera y los patrones de ocurrencia de enfermedad sugieren una estrecha relación con el océano y todo lo que en él ocurre (Colwell, 1996; Mouriño -Perez, 1998). Las causas de esta ciclicidad no han sido bien establecidas pero se han planteado algunas hipótesis sobre la relación de *Vibrio cholerae* O1 con especies planctónicas y la determinación de sus características de acuerdo a los

factores físicos que son los que rigen todos los cambios en el mar (Tamplin *et al.*, 1990; Colwell y Huq, 1994a, 1994b; Epstein, *et al* 1993). La aparición y desaparición del *Vibrio cholerae* O1 de aguas costeras esta relacionada con la abundancia de organismos planctónicos, los cuales a su vez están relacionados con la física y química del océano (Colwell, 1996).

Las investigaciones realizadas apoyan la idea que la bacteria puede sobrevivir en el medio acuático marino ya sea en un estado donde puede ser recuperada y cultivable manteniendo su virulencia o en una fase de aletargamiento o latencia como un mecanismo de supervivencia, cuando la cantidad de nutrientes, pH, temperatura y salinidad no son favorables, en espera de condiciones ambientales que le resulten adecuadas para su crecimiento y producción de enterotoxinas (Baker *et al.*, 1983; Singleton *et al.*, 1982a, 1982b ; Xu *et al.*, 1982; Tamplin y Colwell, 1986; Colwell y Huq, 1994a, 1994b).

La capacidad de vivir y crecer depende principalmente de nutrientes y temperatura, pero para mantener la osmolaridad depende de la salinidad. Aunque a bajas temperaturas (6°C) puede sobrevivir a salinidades bajas (McCarthy, 1995).

Es reconocido por microbiólogos ecólogos que una de las mayores limitaciones para la investigación de *Vibrio cholerae* en ambientes naturales es la dificultad para aislar la bacteria en cultivo, en parte porque esta en una baja concentración en el ambiente, así como porque el bacilo del cólera puede vivir en un medio adverso en un estado de latencia y no ser cultivable. Este estado del *Vibrio cholerae* se ha denominado como “viable pero no cultivable”, representa el estado de letargo, supervivencia y

persistencia en el medio natural y ha podido ser reproducido tanto en estudios en el laboratorio como en el ambiente por diferentes investigadores. (Xu *et al.*, 1982; Roszak *et al.*, 1984; Colwell *et al.*, 1995; Brayton *et al.*, 1987; Huq *et al.*, 1990).

Aunque *Vibrio cholerae* se adapta a medios adversos anulando su virulencia, ésta puede ser recuperada si las características ambientales cambian (Colwell *et al.*, 1995). Esta reversibilidad explica como el microorganismo sobrevive en los períodos interepidémicos y puede producir brotes en lugares donde aparentemente no se encuentra el bacilo (Colwell y Huq, 1994a, 1994b, Colwell *et al.*, 1995).

Se ha hipotetizado que la presencia del *Vibrio cholerae* en la columna de agua en el mar no se da en forma libre, esta bacteria se adhiere a varias especies de plancton, en particular a copépodos. La relación que tiene el bacilo con el zooplancton no ha sido bien estudiada. Se ha encontrado que debido a la producción bacteriana de dos enzimas; la mucinasa y la quitinasa, las cuales les confieren la posibilidad de adherirse y alimentarse al estar degradando la quitina de estos organismos sin embargo aún se tienen dudas acerca de su ecología. Las condiciones de las bacterias fluctúan en el océano de acuerdo a los cambios planctónicos, cuando las condiciones son favorables se producen florecimientos de microalgas, posteriormente ocurre el aumento de las poblaciones de zooplancton que, a su vez, serán el sustrato al cual se asocia una mayor concentración de bacterias entre ellas esta *Vibrio cholerae* (Huq *et al.*, 1983; Colwell y Spira, 1992; Epstein *et al.*, 1993).

La historia del cólera revela una fuerte asociación con el mar, los puntos de inicio de todas las epidemias siempre han sido comunidades portuarias. Ya sea por el acarreo

de la bacteria en forma indirecta por los barcos o directamente por el océano se puede explicar el origen y diseminación de la enfermedad (Colwell, 1996; Mouriño-Pérez, 1998).

Es posible que la bacteria viaje de un lugar a otro a través de las corrientes marinas (Figura 1). Si observamos el trayecto de las corrientes marinas en el Pacífico Sur, se observa claramente la ruta que la bacteria pudo haber tomado para transportarse desde el origen de la pandemia en el Océano Indico y el punto final en las costas de Perú (Mouriño- Pérez, 1998).

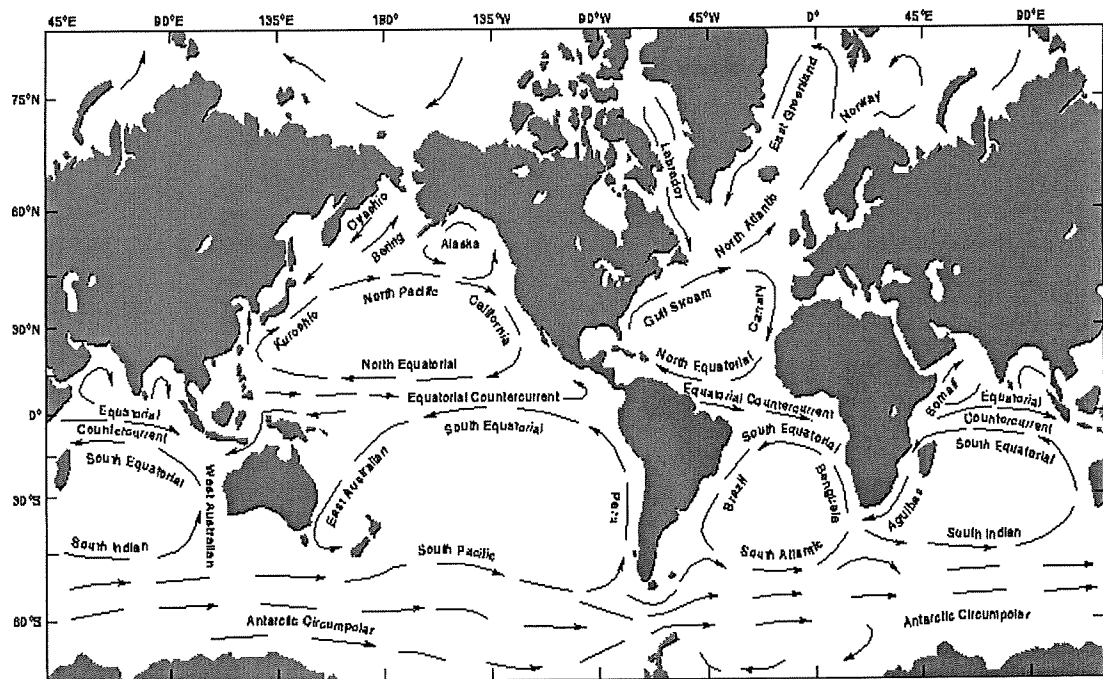


Figura 1. Principales corrientes superficiales marinas

Tamaño y forma

Morfológicamente la familia *Vibrionacea* ha recibido mucha atención a partir de la descripción clásica de *Vibrio cholerae* en 1884 por Koch, quién notó la forma curva y a veces recta de estos organismos.

Se ha reportado que los cambios morfológicos son parte del ciclo de la vida del *Vibrio* y otras bacterias (Felter *et al.*, 1969; Baker y Park, 1975).

Baker y Park (1975) encontraron que la morfología de los organismos es diferente en las distintas fases de desarrollo. Los organismos en la fase de crecimiento son bastones robustos, en la fase estacionaria esbeltas, curvas y en forma de “S”, y en la fase de declinamiento hay un incremento en el porcentaje de formas cocoides donde los organismos son esféricos, presentando el fenómeno de redondeo.

Cuando las células adoptan la forma cocoidal disminuyen su volumen hasta el 90% en 30 días (Hood *et al.*, 1986). Las células pequeñas de *Vibrio cholerae* en un medio óptimo comienzan a crecer inmediatamente y cambian su tamaño y su forma, regresando a ser bastones después de 48 horas, aunque a las 60 horas todavía se pueden observar formas cocoides (Novitsky y Morita, 1976).

Mecanismo de sobrevivencia cuando hay baja concentración de nutrientes

Los cambios más evidentes en las bacterias ante situaciones de escasez de nutrientes son variaciones fenotípicas que se manifiestan en cambios en el tamaño y la forma del microorganismo, y que corresponden a cambios genéticos asociados con la virulencia. (Kjellerberg *et al.*, 1987).

La formación de células pequeñas es importante como mecanismo de sobrevivencia en el medio, ya que se transporta con facilidad y se protege contra la depredación (Colwell y Huq, 1994b).

Durante un periodo de baja concentración de nutrientes en el ambiente, el costo energético del mantenimiento del organismo es muy alto por lo cual la bacteria disminuye sus funciones metabólicas, reduce la respiración endógena al 1% y decrece el DNA al 40 % para mantener las reservas de energía, y poder hacer cambios en las rutas metabólicas (Baker *et al.*, 1983).

Balakrish *et al.*, (1988), al reportar la presencia de *Vibrio cholerae* cultivable en aguas de Calcuta, una de las principales regiones endémicas, encontraron que *V.cholerae* O1 era poco abundante, mientras que *Vibrio cholerae* no O1 registró una abundancia mucho mayor. Con base en lo anterior consideran la posibilidad del revertimiento de un estado no toxigénico al productor de la toxina, cuando se dan las epidemias en el área, posteriormente Huq *et al* (1990) al realizar un estudio similar en otra área endémica (Matlab, Bangladesh), encuentran una abundancia notable de *Vibrio cholerae* O1. Esto comprueba la existencia de la forma latente del *Vibrio cholerae* O1 en el ambiente y explica la estacionalidad de la enfermedad cuando *Vibrio cholerae* O1 se revierte a un estado toxigénico al cambiar las condiciones ambientales.

Hipótesis de trabajo:

Los bacilos de *Vibrio cholerae* O1 en condiciones de baja concentración de nutrientes (0.5% de peptona) modifican su tamaño y forma, transformándose de un bastón curvo o recto a una forma esférica o cocoide disminuyendo su tamaño.

Objetivos:

- Identificar los cambios de tamaño y forma de *Vibrio cholerae* O1 en un microcosmo bajo en nutrientes.
- Evaluar la variedad morfológica de *Vibrio cholerae* O1 en el proceso de inanición.
- Estimar la velocidad de decremento de tamaño de las células de *Vibrio cholerae*
- Comparar características de tamaño y forma en los estadios cultivables y no cultivable

Material y métodos:**Preparación del medio de cultivo**

Dos frascos (Pyrex) de 250 ml fueron lavados y enjuagados seis veces consecutivas con agua libre de partículas, bidestilada y deionizada (Destilador Corning mega-Pure™ System MP-IIA y Deionizador Barnstead Mod. D0604). Los frascos se llenaron con 160 ml de agua de mar sintética con 20% de salinidad, preparada con 13.7 g de NaCl, 2.3 g de Na₂SO₄, 0.38g de KCl, 0.112g de NaHCO₃, 0.015g de H₃BO₃, 0.0016g de NaF, 0.023g de MgCl₂·6H₂O, 0.5g extracto de bilis en 1000 ml de agua bidestilada y deionizada y 0.5% de peptona con un pH de 7.4 y esterilizado por autoclave a 121°C por 20 minutos.

Desarrollo de estado de *Vibrio cholerae* O1

Inoculación del microcosmos y procesamiento de muestras

Fueron cultivadas dos cepas de *Vibrio cholerae* O1 de la Facultad de Medicina de la UNAM, Inaba Eltor FMV087145 en Triptona 1% Cloruro de Sodio 1% (T₁N₁) y agar 1.4% por 24 horas.

Cada microcosmos fue inoculado con una colonia de cada cepa, esta se incubó a 25°C durante 92 días, la concentración inicial de la bacteria se determinó por el método de dilución (Lizárraga y Vargas, 1997), y fue de 69,000 UFC por ml.

. Diariamente se recolectó un ml del contenido de cada uno de los frascos y se sembró una asada en T₁N₁ para corroborar el cambio al estado no cultivable. A partir de la fecha en que dejó de observarse el crecimiento poblacional de las bacterias, se tomó una muestra cada 15 días hasta durante 92 días.

Las muestras tomadas se fijaron con 3 % de formaldehído para su conservación.

Cada muestra se procesó para ser observada por microscopía electrónica de barrido. Se tomaron imágenes para la vigilancia de los cambios morfológicos en cada uno de los estados de *Vibrio cholerae* O1

Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Se prepararon todas las muestras para vigilar los cambios morfológicos con imágenes del microscopio electrónico de barrido: para cada día de muestreo se diluyeron 10µl del cultivo inoculado con *Vibrio cholerae* O1 en 90µl de agua destilada y deionizada junto con 42µl de etanol al 30%. Se colocó una gota de 10µl en el portaobjetos horadado de 10 mm de diámetro, dejándose secar a 37°C y se deshidrató

por inmersión gradual en alcohol al 50,70 y 100%, secando la muestra después de cada aplicación. Finalmente se añadió una capa de aluminio sobre la muestra para incrementar el contraste.

Un total de 24 muestras fueron observados en un microscopio electrónico de barrido (JSM- 5300 Scanning Microscope) y las imágenes fueron digitalizadas y almacenadas, las cuales se procesaron con la técnica de metalización para ser observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido y se almacenaron digitalmente en formato bitmap.

De las 24 muestras se procesaron 2789 imágenes individuales de *Vibrio cholerae* O1, se midió el tamaño (largo y ancho) y forma con el programa Scion image .

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis multivariado de agrupación (Cluster Análisis) que ubica a los organismos en grupos de acuerdo a su similitud y diferencia, calculando la distancia de unión entre cada cambio morfológico. La distancia de unión utilizadas en la euclidiana que se define de la siguiente manera:

$$D_{HK} = 0.5D_{HI} + 0.5D_{HJ} - 0.5 |D_{H,I} - D_{H,J}|$$

Donde D es la distancia existente entre dos agrupaciones, H y K son los dos grupos de datos y J e I son los datos. Los dendogramas de las distancias euclidianas se realizaron mediante la técnica del vecino más cercano, que es la distancia más pequeña entre dos elementos de grupos diferentes. El análisis se llevo a cabo con el programa STATISTICA.

Además se realizó la prueba de ANOVA para comparar los promedios de la longitud y ancho de la bacteria y una regresión lineal para establecer la tendencia de la reducción de tamaño.

Resultados

Después de inocular el microcosmos con 0.5% de peptona y 20 ‰ de salinidad con las dos cepas de *Vibrio cholerae* O1 (Inaba) tomadas de especímenes clínicos de la colección de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., se encontró que *Vibrio cholerae* O1 creció en T₁N₁ hasta el día 22 posteriormente se obtuvieron muestras cada 12 días. Se obtuvieron 24 muestras las cuales se procesaron con la técnica de metalización para ser observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido y se almacenaron digitalmente en formato bitmap. Se procesaron 2 789 imágenes individuales de *Vibrio cholerae* O1 para medir las variables en estudio.

Análisis del tamaño del *Vibrio cholerae* O1

De todas las imágenes se midió la longitud y ancho de cada una por día de seguimiento. La tabla II muestra los resultados de la longitud de *Vibrio cholerae* O1 obtenidos durante los 92 días del experimento.

Tabla II. Distribución de la longitud (μm) del *Vibrio cholerae* O1

Día	n	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza 95%
1	125	1.52	0.32	1.46 - 1.57
2	124	1.44	0.32	1.38 - 1.50
3	89	1.78	0.36	1.71 - 1.86
4	114	1.63	0.48	1.54 - 1.72
5	120	1.56	0.47	1.47 - 1.65
6	30	1.07	0.24	0.98 - 1.16
7	125	1.45	0.28	1.40 - 1.50
8	123	1.38	0.33	1.33 - 1.44
9	123	1.24	0.41	1.17 - 1.32
10	122	1.32	0.39	1.25 - 1.39
11	128	1.31	0.32	1.26 - 1.37
12	123	1.38	0.45	1.30 - 1.46
14	114	1.35	0.54	1.25 - 1.44
16	121	1.47	0.80	1.32 - 1.61
18	105	1.03	0.53	0.89 - 1.17
20	123	0.95	0.39	0.88 - 1.02
21	120	0.84	0.44	0.76 - 0.92
22	121	0.83	0.37	0.77 - 0.90
24	125	0.72	0.53	0.63 - 0.81
36	128	0.77	0.61	0.67 - 0.88
50	120	0.70	0.26	0.65 - 0.74
64	118	0.55	0.40	0.48 - 0.62
78	120	0.49	0.40	0.42 - 0.56
92	128	0.24	0.14	0.21 - 0.26
Total	2789	1.12	0.60	1.10 - 1.14

Las figuras 2 y 3 muestran gráficos de cajas de la distribución de la longitud del *Vibrio cholerae* O1 medido en μm , comparando los valores máximos, mínimos y los cuartiles con la distribución de la media y el intervalo de confianza al 95%. Se Observó una variación uniforme hasta el día 18, donde el intervalo fue muy amplio debido a que la dispersión fue mayor. Esto coincide con la fecha en que la bacteria pierde la

capacidad de ser recuperada por cultivo en placa, y posteriormente la desviación estándar se vuelve uniforme (Tabla II). El promedio y la mediana van disminuyendo a lo largo del seguimiento con una $p < 0.001$ de acuerdo a la ANOVA.

La longitud mínima de la bacteria fue de $0.1 \mu\text{m}$ y la máxima de $6.01 \mu\text{m}$ con una media de $1.12 \pm 0.6 \mu\text{m}$.

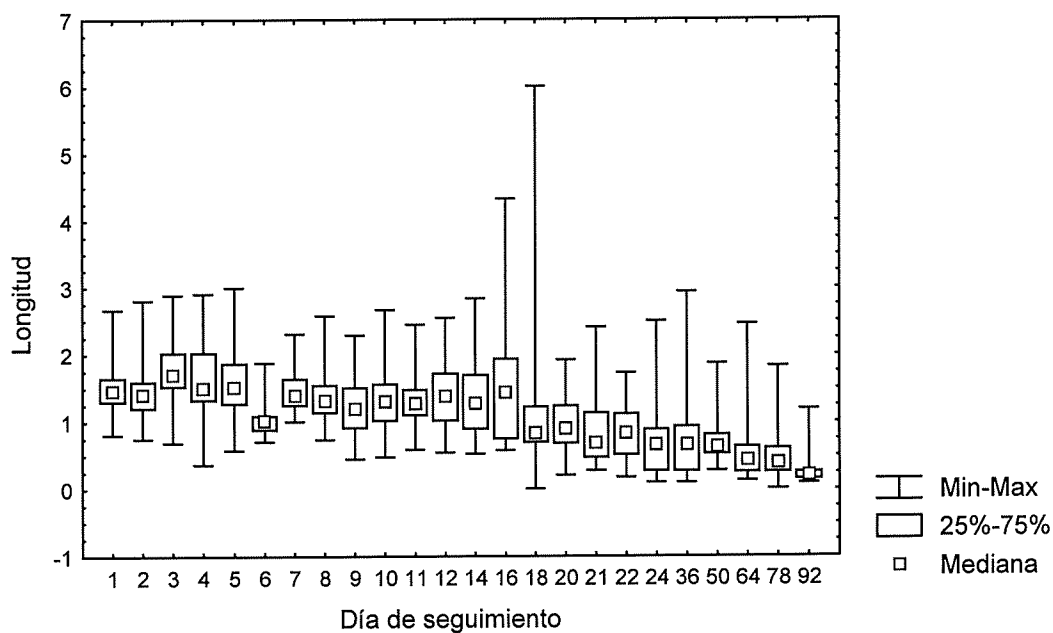


Figura 2. Distribución de la longitud en μm del *Vibrio cholerae* O1, considerando los valores mínimo, máximo y cuartiles, durante los 92 días de seguimiento

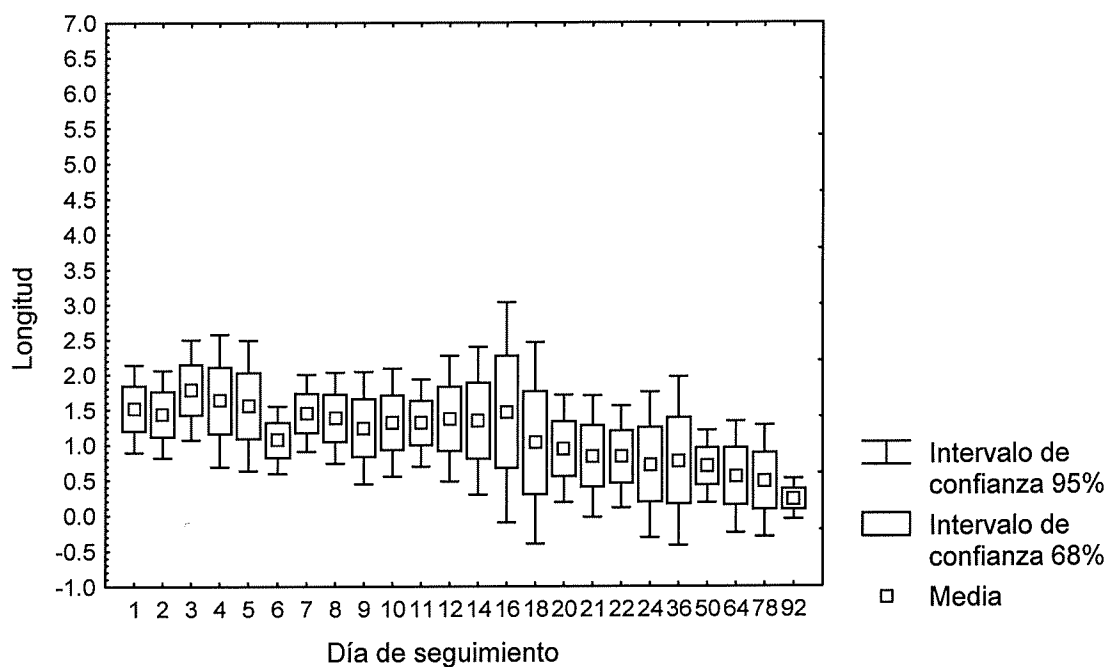


Figura 3. Distribución de la longitud en μm del *Vibrio cholerae* O1, considerando los valores el intervalo de confianza al 95%, durante los 92 días de seguimiento

En lo referente al ancho del *Vibrio cholerae* O1 (Tabla III) se observó una situación similar a la de la longitud con tendencia a disminuir su talla, aunque las variaciones no son tan marcadas. Sin embargo las diferencias de las medias a lo largo del seguimiento fueron estadísticamente diferentes con una $p < 0.001$ (ANOVA) (Figuras 4 y 5).

Tabla III. Distribución del ancho (μm) en de *Vibrio cholerae* O1

Día	n	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza 95%
1	125	0.71	0.08	0.69 – 0.73
2	124	0.80	0.37	0.73 – 0.87
3	89	0.68	0.09	0.66 – 0.70
4	114	0.63	0.10	0.61 – 0.65
5	120	0.62	0.08	0.61 – 0.64
6	30	0.54	0.13	0.49 – 0.59
7	125	0.66	0.08	0.64 – 0.67
8	123	0.65	0.08	0.63 – 0.66
9	123	0.54	0.08	0.53 – 0.55
10	122	0.60	0.10	0.59 – 0.62
11	128	0.65	0.11	0.63 – 0.66
12	123	0.59	0.09	0.57 – 0.60
14	114	0.60	0.12	0.58 – 0.63
16	121	0.66	0.08	0.64 – 0.67
18	105	0.55	0.14	0.52 – 0.58
20	123	0.44	0.11	0.43 – 0.47
21	120	0.52	0.14	0.49 – 0.54
22	121	0.43	0.11	0.41 – 0.45
24	125	0.45	0.22	0.41 – 0.49
36	128	0.45	0.23	0.41 – 0.49
50	120	0.54	0.16	0.51 – 0.57
64	118	0.33	0.17	0.30 – 0.37
78	120	0.32	0.18	0.29 – 0.35
92	128	0.19	0.11	0.17 – 0.21
Total	2789	0.55	0.20	0.54 – 0.55

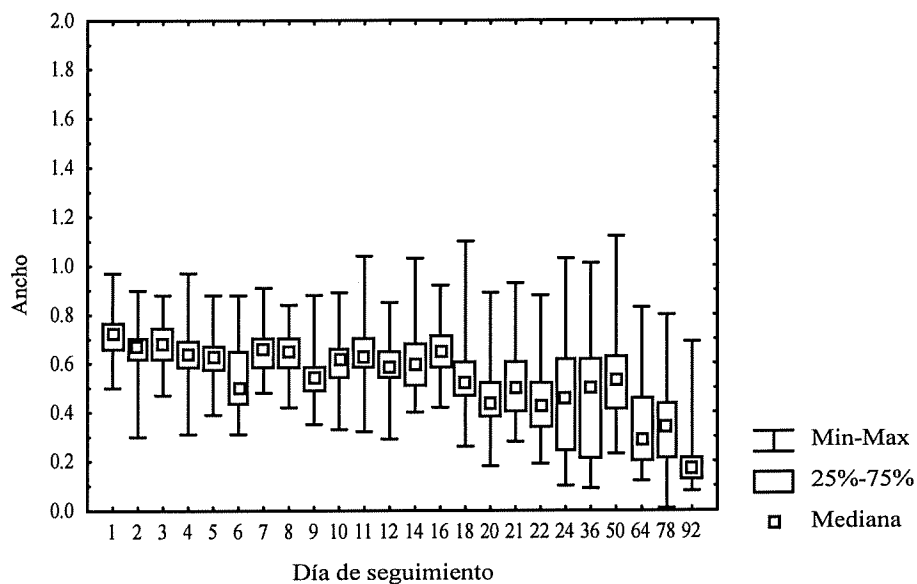


Figura 4. Distribución del ancho en μm del *Vibrio cholerae* O1, considerando los valores mínimo, máximo y cuartiles, durante los 92 días de seguimiento

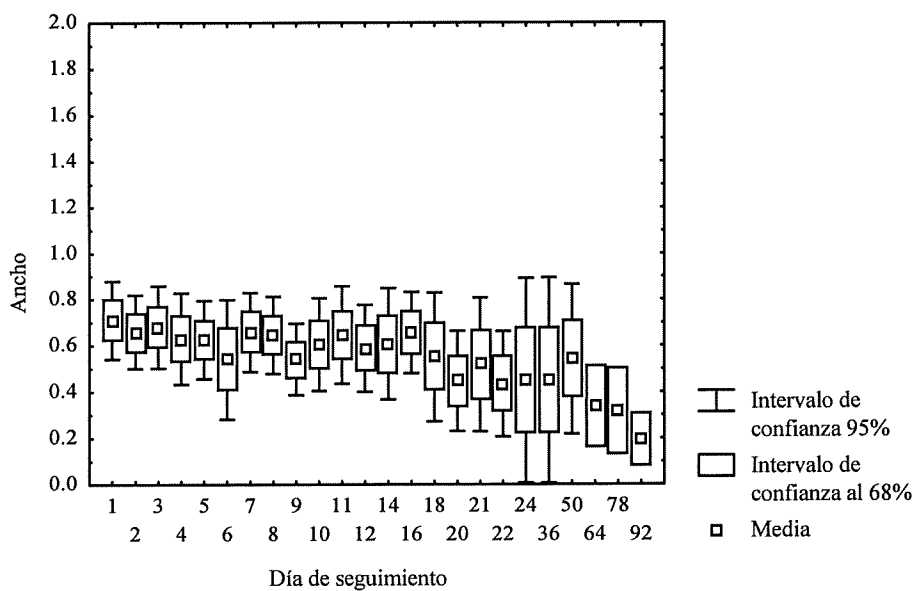


Figura 5. Distribución del ancho en μm del *Vibrio cholerae* O1, considerando los valores el intervalo de confianza al 95%, durante los 92 días de seguimiento

La figura 6 muestra el dendrograma con las distancias euclidianas entre cada día de seguimiento, donde se observan dos grupos, el primero que agrupa los primeros días hasta el día 16 donde predominan las formas de bastón y el segundo que contiene al resto del día 18 al 92 con bacterias en su mayoría esféricas.

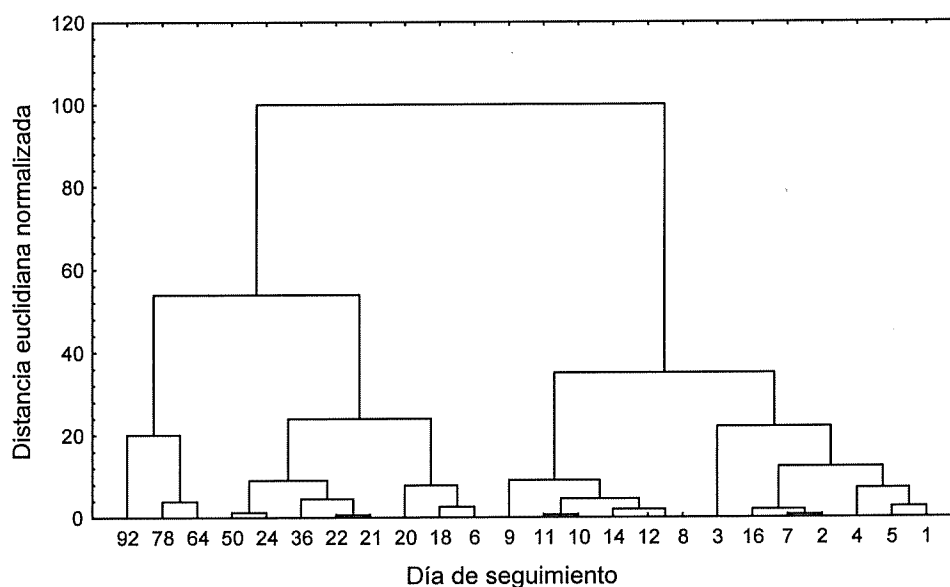


Figura 6. Dendrograma de las variaciones del tamaño del *Vibrio cholerae* O1 durante los 92 días de seguimiento

Además se obtuvo la similitud día por día, encontrando que la distancia de unión era cercano a cero hasta el día 14, y entre los días 16 y 18 empezó a incrementarse este índice (Figura 7).

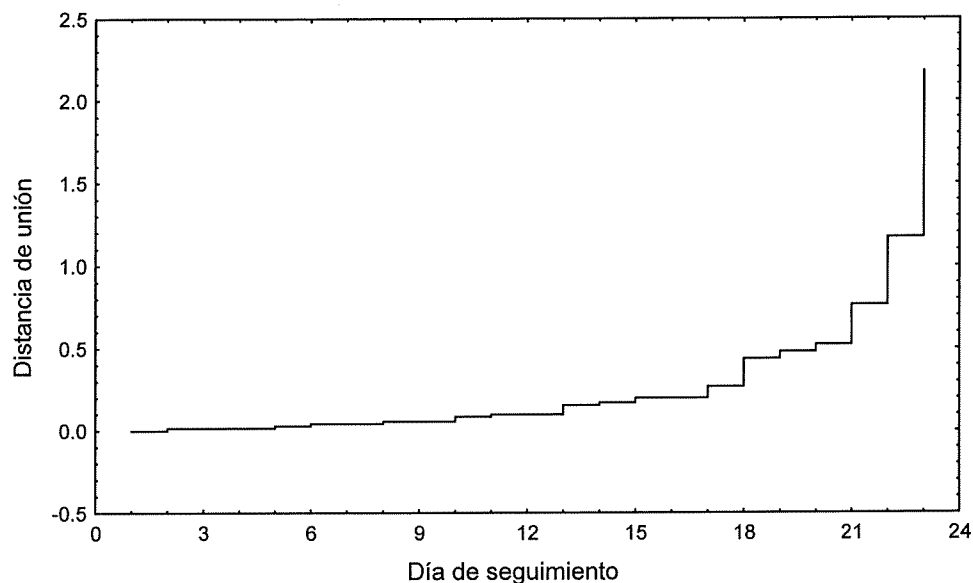


Figura 7. Similitud de tamaño del *Vibrio cholerae* O1 día por día del seguimiento

La figura 7 muestra la similitud entre el tamaño de las bacterias durante el experimento, las bacterias se pudieron agrupar en 3 grupos, el primero del día 1 al 14 en donde la diferencia en tamaño es casi nula, el segundo grupo del día 16 al 21 comienza a incrementarse la distancia de unión, esto es que existe mayor disimilitud entre las bacterias, a partir del día 21 se observa un tercer grupo, el cambio del tamaño de un muestreo a otro es evidente.

Análisis de las variaciones morfológicas

La figura 8 muestra las tres formas predominantes que tuvo la bacteria durante el seguimiento.

La proporción en la que se presentaron la formas de bastón (figura 10), esfera (figura 13) y célula en división (figura 11), se muestra en la figura 8, donde se puede observar que la forma normal de bastón se fue perdiendo cuando la bacteria estuvo en un ambiente bajo de nutrientes y se incrementó la proporción de formas esféricas presentando a lo largo de esta transición bacterias alargadas (figura 9) y pequeños bastones (figura 12). La proporción de células en división fue diferente a lo largo de las observaciones.

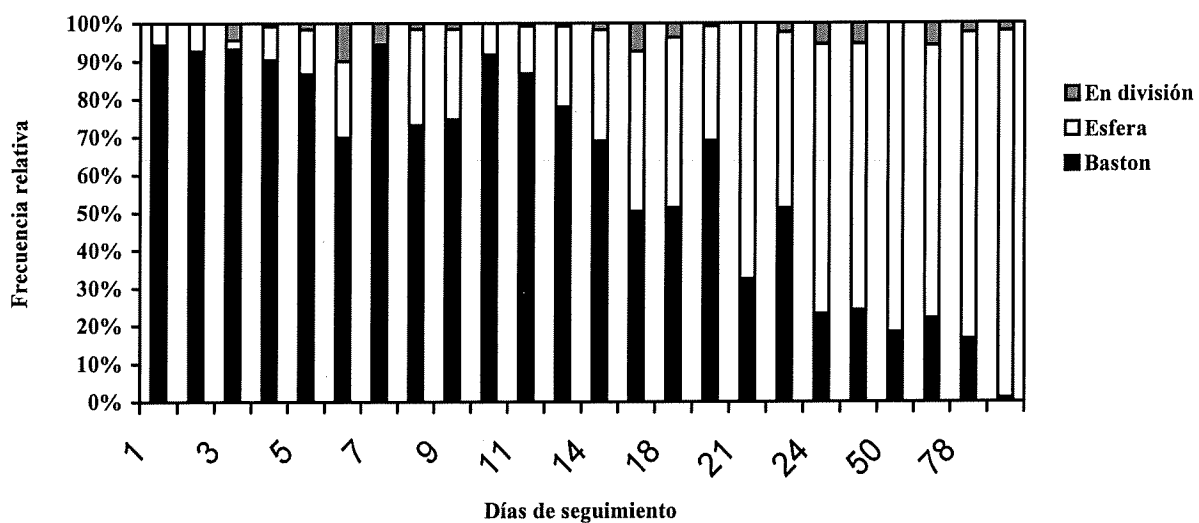


Figura 8. Proporción de células de *Vibrio cholerae* O1 de acuerdo a las variaciones morfológicas más frecuentes

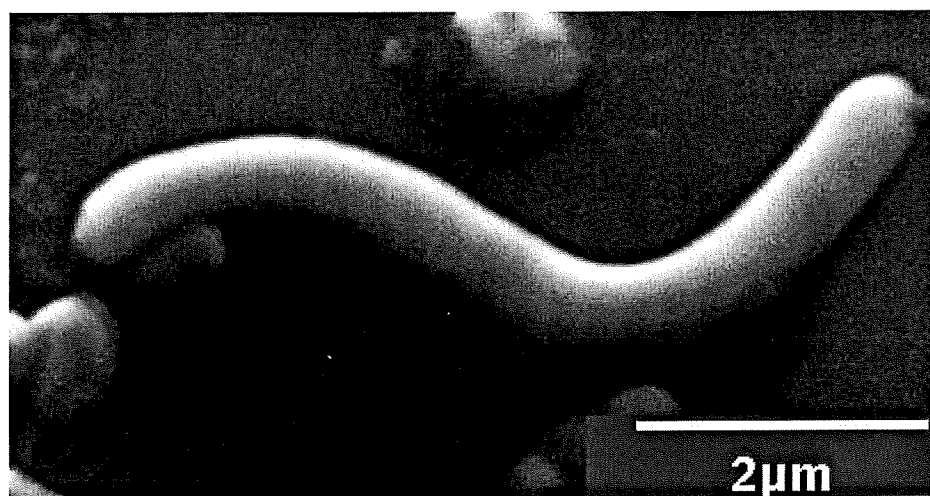
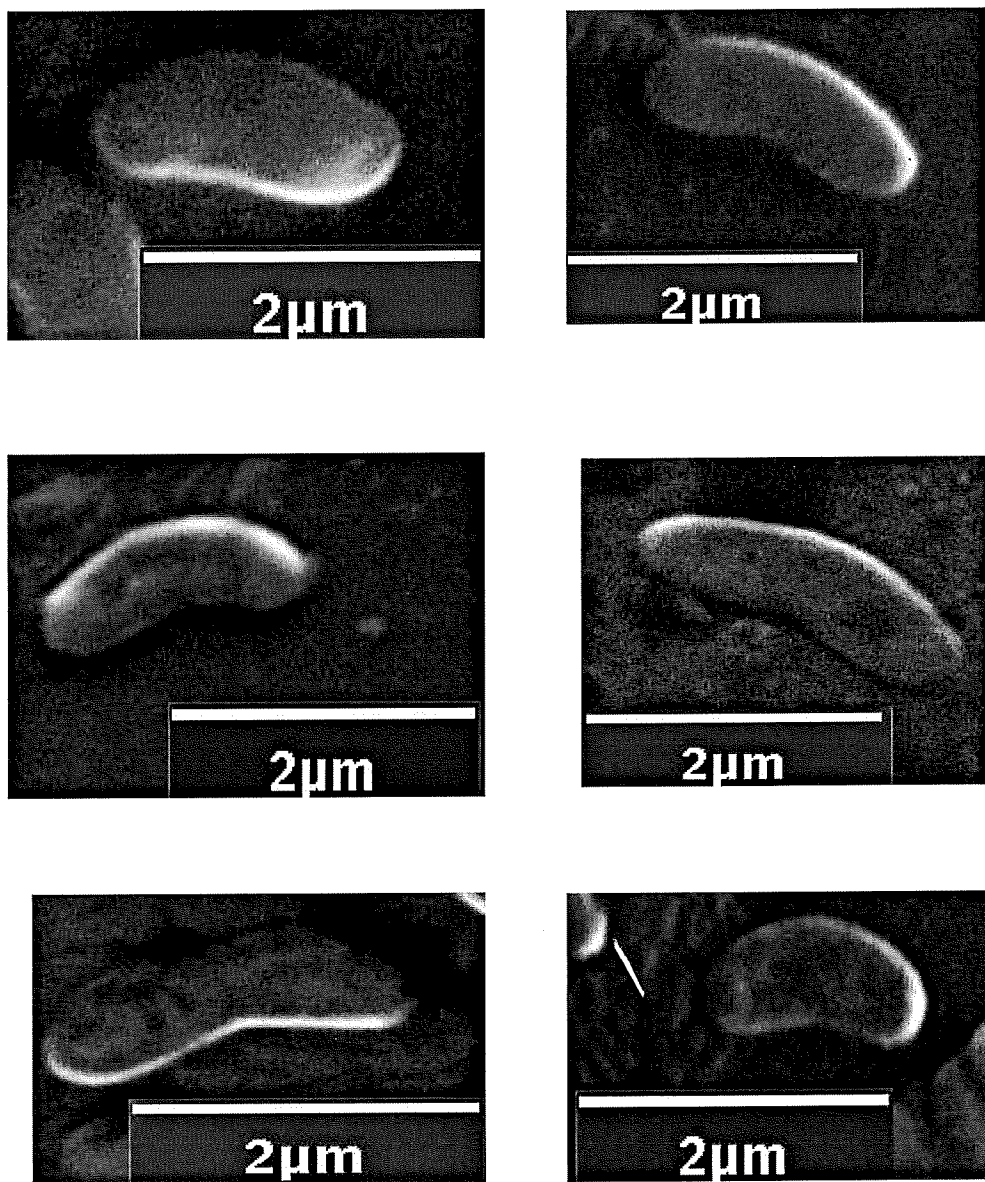
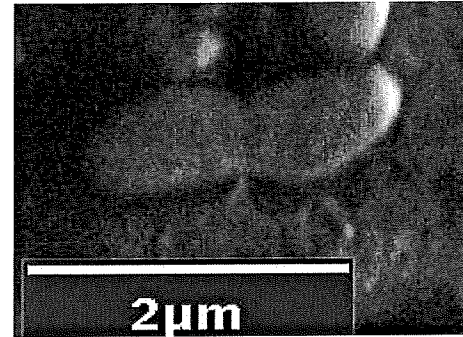
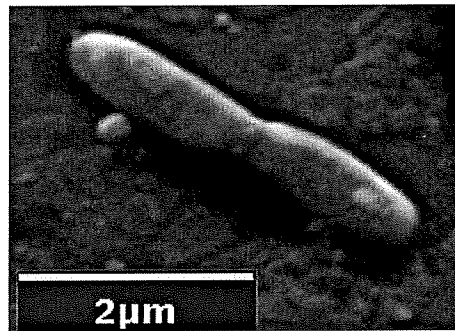


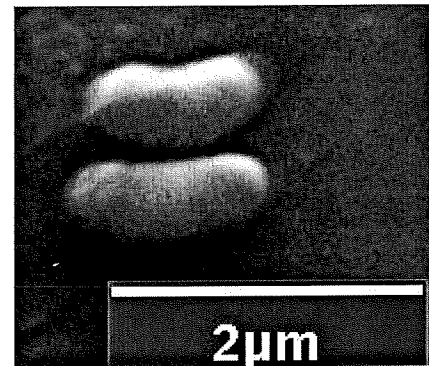
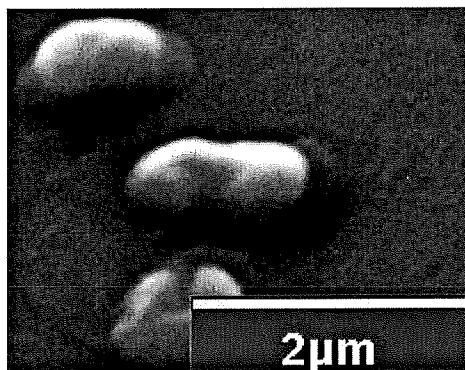
Figura 9. Variación morfológica de *Vibrio cholerae* O1 tipo serpentina



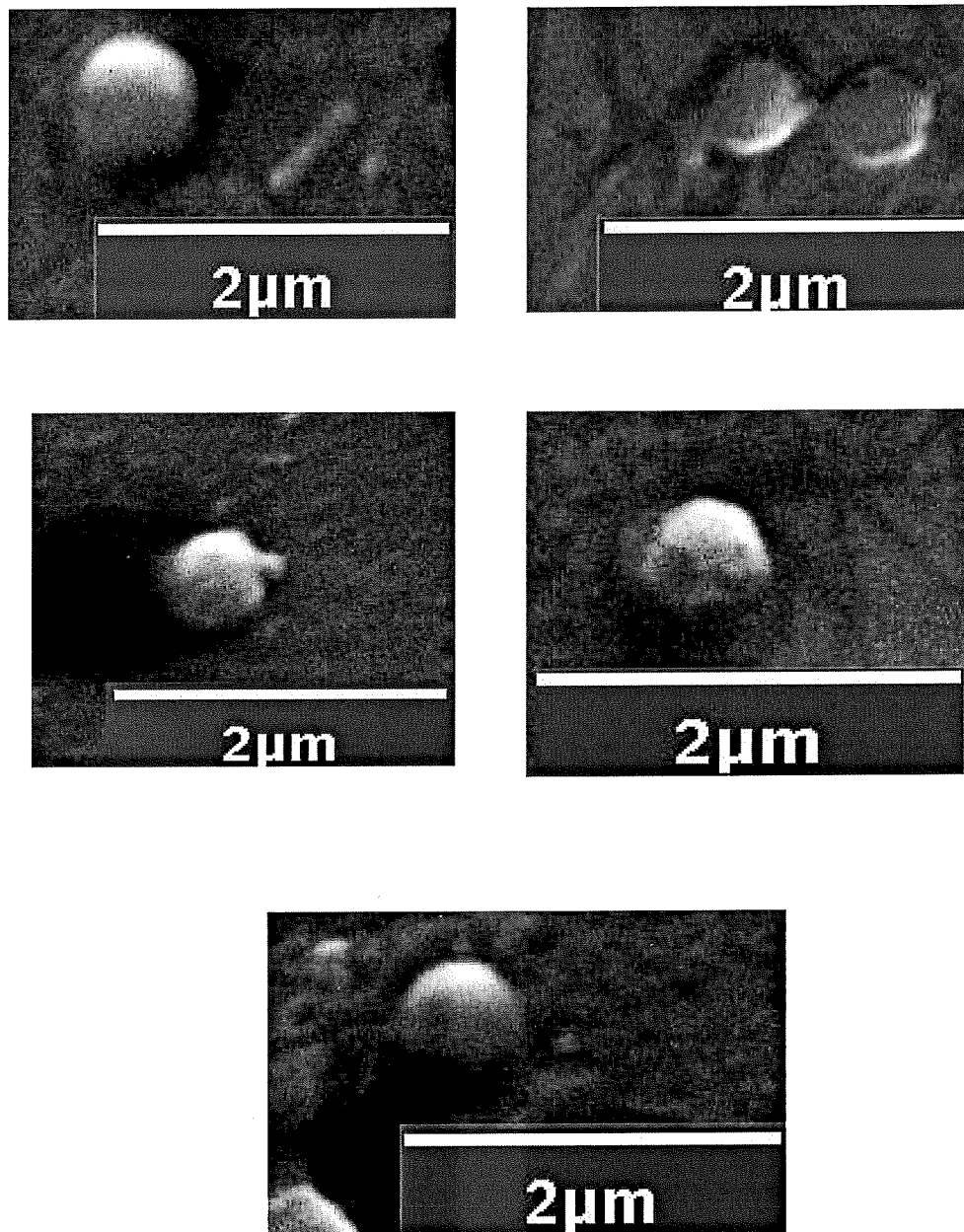
Figuras 10. Variaciones morfológicas de *Vibrio cholerae* O1 tipo bastón



Figuras 11. Variaciones morfológicas de *Vibrio cholerae* O1 en división



Figuras 12. Variaciones morfológicas de *Vibrio cholerae* O1 bastones pequeños



Figuras 13. Variaciones morfológicas de *Vibrio cholerae* O1 de tipo esfera

Discusión

En el ambiente natural las condiciones de aporte de nutrientes y las características físicas y químicas son muy variables, lo cual influye en la presencia y ausencia de *Vibrio cholerae* (Colwell *et al.*, 1995). La variación de estas condiciones puede llevar a los microorganismos a estados de desnutrición, los cuales para sobrevivir en el ambiente acuático desarrollan mecanismos de sobrevivencia. Uno ellos son la rápida división y la involución de su tamaño y su virulencia (Baker *et al.*, 1983).

En este estudio, y como evidencia de lo anterior se observó el crecimiento bacteriano así como el cambio morfológico que sucede al irse agotando los nutrientes en el microcosmos.

Las bacterias presentaron un comportamiento general a disminuir de longitud sin embargo, se encontraron que durante los días 3 y 4 presentan un aumento de la longitud, debido a que la células no están sufriendo el cambio morfológico a la misma velocidad (Stanier, *et al.*, 1996).

Del día 7 al 15 no hay cambios significativos en la longitud. En el día 16 se encontró la mayor desviación estándar 0.80 en la longitud, esto puede tener una relación con la curva de crecimiento poblacional de un cultivo de bacterias, que presenta una fase exponencial y una estacionaria esta última implica un período de crecimiento desequilibrado (Stanier, *et al.*, 1996).

A partir del día 16 hasta el 25 se observó una alta variabilidad en el tamaño de las muestras es claro que la bacteria presenta cambios internos y hay un desajuste en el crecimiento de la bacteria, pero no se ha comprobado exactamente que es lo que está

sucediendo se dice que cuando las bacterias se presentan en la fase de transición a la estacionaria el incremento de masa se ha detenido el material citoplasmático y nuclear sigue reduciendo (Brock y Madigan, 1974), de esta forma se adelgaza la bacteria tomando formas alargadas teniendo bacterias mas largas.

Una hipótesis sobre esta variabilidad en los datos obtenidos podría ser que al faltar los nutrientes las bacterias se adhieran a otras bacterias ya muertas buscando alimento y alterando los datos al medir a los organismos.

Es de interés seguir realizando estudios sobre la fisiología de la bacteria mediante un microscopio de transmisión y saber que cambios presenta la estructura interna cuando se encuentra en la etapa de transición de crecer y no crecer para poder el crecimiento desequilibrado que se presentó durante estos días.

El decremento registrado en las bacterias a partir del día 24 fue más acentuado debido a que la secuencia de observaciones se hizo cada 14 días registrándose cambios más significativos.

Casida (1971) observó células aproximadamente de 0.5 μm a 0.8 μm de diámetro y Bae *et al.* (1972) reportó que el 72% de los organismos examinados eran menores de 0.3 μm en diámetro. En este estudio los cambios que presentó *Vibrio cholerae* O1 en su tamaño fueron de 1.52 μm a 0.24 μm promedio en las medidas de longitud y 0.77 μm a 0.19 μm en el ancho, disminuyendo a la quinta parte de su tamaño original.

El ancho del *Vibrio cholerae* O1 presentó la misma tendencia en la disminución del tamaño, sin embargo, este cambio es menor si lo comparamos con los resultados de la longitud debido a la paulatina formación de bacterias esféricas o cocoides.

El dendrograma de la variación del tamaño de las bacterias presentó dos grupos principales, uno del día 1 al 16 donde podemos decir, apoyandonos en la figura 8 que predominan las bacterias en formas de bastón y *Vibrio cholerae* O1 presentó crecimiento poblacional, en cambio el otro grupo del día 18 al 92 las formas esféricas eran predominantes y la población dejó de crecer. En este último grupo encontramos el día 6 ya que el número de muestra que tuvimos fue solamente de 30 datos.

Es importante mencionar que 114 bacterias observadas fueron de menores de $0.2\mu\text{m}$ podemos pensar que el método que usamos en este trabajo pudo influir en el tamaño de las células ya que Fuhrman (1981) reporta que la bacteria encoge al realizar la metodología para preparar las muestras del microscopio electrónico de barrido, Bae *et al* (1972) observaron bacterias de hasta $.08\mu\text{m}$ con este mismo método comparado con otros artículos como Novitsky y Morita (1978), que por medio de filtración reportó *Vibrio* sp menores de $0.2\mu\text{m}$ y Baker *et al.*, (1983) observaron bacterias de $0.33\mu\text{m}$ con el microscopio de transmisión.

El porcentaje que se encontró en bacterias menores de $0.2\mu\text{m}$ fue de 4.1 % este es un dato significativo e importante ya que en estos momentos hay una gran controversia acerca del tamaño mínimo para la existencia de vida. En el taller realizado por la Academia Nacional de la Ciencia de los Estados Unidos "Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganism" el panel constituido de biólogos celulares argumenta que una esfera capaz de contener proteínas junto con los genes y los ribosomas necesarios para su síntesis sería de 0.25 a $0.3\mu\text{m}$ en diámetro, incluyendo su membrana exterior. Estimaron que $0.25 \pm 0.05\mu\text{m}$ constituye un límite

mínimo para que exista la vida como la conocemos. Por otro lado las nanobacterias reportadas de sangre humana y de vaca están en el límite inferior sugerido por biólogos celulares; sin embargo los cuerpos de menor tamaño de $0.5\ \mu\text{m}$ encontrados en asociación con estas células no eran por si solos organismos viables. El bioquímico y físico Olaqvi Kajander de la Universidad de Kuopio en Islandia argumenta que tiene organismos que prueban que la teoría anterior esta mal. Presenta nanobacterias cultivadas de sangre y orina, las cuales están entre 0.2 y $0.5\ \mu\text{m}$ de los cuales puede obtener cultivos viables después de pasarlos a través de un filtro de $0.1\ \mu\text{m}$, sin embargo los mismos científicos del taller se mostraron escépticos. (Vogel, 1998.)

Nelson, (1997) dice que la mayoría de las bacterias conocidas por los biólogos están en un intervalo de tamaño de 0.2 a $2\ \mu\text{m}$ de diámetro pero Folk (1993) argumenta que existen partículas virales que tienen $1/100$ del volumen de la mayoría de las nanobacterias, no entran en la clasificación de formaciones minerales orgánicas y aún así funcionan virulentamente como cuasibiontes

Existen dos problemas en la discusión del tamaño mínimo. Los métodos comunes tienen una ambigüedad inherente o posibilidades de error y tal vez el más importante, la mayoría de las células encontradas en la naturaleza no pueden ser cultivadas (Vogel, 1998.)

Baker y Park (1974) encontraron que la morfología de las bacterias es diferente en cada fase de crecimiento, En la fase exponencial ellos obtuvieron bastones robustos, en la etapa estacionaria organismos más delgados curvos y en forma de S y en la fase de muerte se observaron el incremento de organismos esféricos. Los cambios observados

de tamaño y forma son parte del ciclo de vida de la bacteria como lo señalaron también Ensign y Wolfe (1964). Esto pudo observarse en este estudio ya que a pesar de que no se obtuvo la curva de crecimiento podemos darnos cuenta a partir de las variaciones morfológicas y de tamaño.

Las células redondas se observaron ocasionalmente en todas las preparaciones, sin embargo, fueron más comunes en las muestras con más tiempo. Las muestras del día 1 al 7 en su mayoría fueron bacterias en forma de bastón, con presencia de muy pocos cuerpos redondos, paulatinamente en los días 16 y 18 las bacterias en forma de esferas se vuelven más comunes, aproximadamente el 50% de la población son bastones, el 40% en forma esférica y el 10% restante se observa la presencia de individuos en división, después del día 21 la gran mayoría de los organismos presentan forma de esfera hasta ser el tipo dominante en la población al final del estudio. El decremento en células viables ocurre después de que las formas esféricas son predominantes.

Al observar la figura 8 pudimos ver que en casi todos los días se observaron células en división por lo que la célula siempre se está reproduciendo aunque no se observó un comportamiento representativo. Baker *et al.*, (1983) reporta que en las primeras 48 horas se presenta un incremento en el número de células, es difícil comprobar esta información en este trabajo ya que no se cuantificó el número de bacterias por día y no se sabe con certeza si la concentración de individuos aumentó.

Conclusiones

- ◆ *Vibrio cholerae* pierde la capacidad de ser recuperada por cultivo en placa a partir del día 22 del experimento en un ambiente bajo en nutrientes.
- ◆ En condiciones limitadas de nutrientes, los organismos tienen la capacidad de cambiar de forma y tamaño.
- ◆ Los cambios que presentó *Vibrio cholerae* O1 en su tamaño fue de 0.24 μm a 1.52 μm en longitud y 0.19 μm a 0.77 μm en el ancho, disminuyendo la quinta parte de su tamaño original.
- ◆ Las formas de bastón y esférica se presentaron durante todo el seguimiento. Sin embargo, la proporción en la que se ocurren cambió con el tiempo, antes de perder la culturabilidad predominaron los bastones y después las formas cocoides.
- ◆ El 4.1 % de la bacterias observadas fueron menores de 0.2 μm .
- ◆ Se obtuvieron formas de serpentinadas, bastones grandes, bastones pequeños, células en división y formas esféricas de muy diferentes tamaños.
- ◆ A pesar de la reducción de nutrientes se encontraron células en división a los 92 días de seguimiento a pesar de ya no ser recuperadas por cultivo en placa.

Literatura citada

- Bae, H.C., E.H. Costa-Robles, y L.E. Casida. 1972. Microflora of soil as viewed by transmisión electrón microscopy. Appl. Microbiol. 23: 637-648.
- Baker, D.A. and Park, R.W.A. 1974, Changes in Morphology and Cell Wall Structure that Occur during Growth of *Vibrio* sp. NTCTC4716 in Batch Culture.
- Baker, R.M., Singleton, F.L., and Hood, M.A., 1983, Effects of Nutrient Deprivation on *Vibrio cholerae*., Appl. Environ. Microb., 46: 930-94.
- Baker, D.A., y. Park, R.W.A. 1975. Changes in morphology and cell wall structure that occur during growth of *Vibrio* sp. NCTC4716 in batch culture. J. Gen. Microbiol. 86: 12-28.
- Balakrish, N.G., Oku, Y., Takeda, Y., Ghosh, A., Ghosh, R.J., Chattopadhyay, S., Pal, S.C., Kaper, J.B. and Takeda, T. 1988. Toxin Profiles of *Vibrio cholerae* non O-1 from environmental sources in Calcutta, India. Appl. Environ. Microbiol. 45: 3180-3182
- Blake, P.A., Allegra, D.T., Snyder J.D., Barrett T.J., McFarland L, Caraway C.T., Feeley J.C., Craig J.P., Lee J.V., Puhr N.D., y Feldman R.A. 1980. Cholerae a possible endemic focus in the Unites States. N Eng. J. Med. 302: 305-309.

- Blake, P.A. 1994. Historical perspectives on pandemic cholerae. En : *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. American Society for Microbiology. Washington D.C. 293-295.
- Brayton, P.R., Tamplin, M.L., Huq, A., Colwell, R.R. 1987. Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct count. Appl Environ Microbiol. 53(12): 2862-2865
- Brock, T. D. 1974. Growth, macromolecular synthesis, and differentiation, en: Biology of microorganism, Eds. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 851pp.
- Casida, L.E. 1971. Microorganism in unamended soil as observed by various forms of microscopy and staining. Appl. Microbiol. 21: 1040-1045.
- Colwell, R.R., Kaper, J.S.W. 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios occurrence and distribution in Chesapeake bay. Science 198: 394-396.
- Colwell, R.R., Patz, J.A. 1991, Climate, infectious Disease and Health., Amer. Acad. Microb., 23pp.
- Colwell, R.R. and Spira, W.. 1992. Cholerae. Barua, D. and W.B. Greenough III (Eds), Plenum Medical Book Company, New York. Pp 107-127.

- Colwell R.R y Huq A. 1994a. Vibrios in the enviromental: Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* , *Vibrio cholerae* and *cholerae*: Molecular to global perspectives, Amer. Soc. Microbiol., 117-131pp.
- Colwell, R.R y Huq, A. 1994b. Enviromental reservoir of *Vibrio cholerae*. Annals New York Academy of Sciences ,44-54pp.
- Colwell, R.R., Huq, A.,Chowdhury, M.A.R., Brayton, P.R., Xu, B. 1995. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. Can J Microbiology. 41: 946-950.
- Colwell, R.R., 1996. Global Climate and infectious disease: the cholera paradigm. Science. 274:2025-2031.
- Ensign, J.C., y Wolfe, R.S. 1964. Nutritional control of morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. J Bacteriol. 87: 924-932.
- Epstein, P.R., Ford, T.E. y Colwell, R.R. 1993. Marine ecosystems. The Lancet. 342: 1216-1219.
- Felter, R.A., Colwell, R.R. y Chapman G.B. 1969, Morphology and Round Body Formation in *Vibrio Marinus* , J. Bacteriology, 99: 326-335
- Fernández de Castro J. 1991. El cólera. Un problema no resuelto. Ciencias 24:33-44.
- Folk, R.L. 1993. J. Sediment. Petrol. 63, 990

- Fuhrman, J.A. 1981. Influence on the Apparent Size Distribution of Bacterioplankton Cells: Epifluorescence Microscopy Compared to Scanning Electron Microscopy. Mar. Ecol. Prog. Ser., 5: 103-106.
- Giono Cerezo, S., Gutiérrez Cogco, L., Hinojosa Ahumada, A.M. 1991. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización del *Vibrio cholerae* O1. Publicación técnica del INDRE No. 10 México
- Hood, M.A, Guckert, J.B, White, D.C, and Deck, F., 1986, Effect of Nutrient Deprivation on Lipid, Carbohydrate, DNA, RNA, and Protein Levels in *Vibrio cholerae* ., Appl. Environ. Microbil., 52: 788- 793
- Huq, A., Colwell, R.R., Rahman, R., Ali, A., Chowdhury, M.A.R., Parveen, S., Sack, D.A., Russek-Cohen, R. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent –monoclonal antibody and culture methods. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2370- 2373.
- Huq, A., Small E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman R. y Colwell R.R. 1983. Ecological relationship between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl Environ. Microbiol. 45: 275-283
- Kaper, J., Lockman, H., Colwell, R.R., Joseph, S.W. 1979. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chasapeake Bay. Appl environ Microbiol 37:91-103.

- Kay, B. A., Bopp, C.A., Wells, J. G. 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En *Vibrio cholerae and cholerae molecular to global perspectives.*, ASM Press, pp. 3-21.
- Kjelleberg, Hermansson, M. and Marden, P. 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment, *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 25-49
- Krieg, N.R., Holt, J.G. 1984, Family II Vibrionacea. Veron, 1965, 5245^{AL} En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1* 964 p.p
- Lizárraga partida, M.L. y Vargas Cárdenas. 1997. Manual de practicas de laboratorio del curso bacteriología marina. 1era edición. 1999pp
- Malvido, E. y Cuenya, M.A. 1991. El colera en Puebla en el siglo XIX. *Ciencias*, 24: 51-56.
- Marshall, K.C. 1979. Growth at interfaces, p. 281-290. en M. Shilo (ed.), *Strategies of microbial life in extreme environments*. Verlag Chemie, Berlin.
- McCarthy, S.A. 1995, Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic *Vibrio Cholerae* O1 in Seawater., *Microb. Ecol* , 31:167- 175
- Morris, J.G. y Black, R.G. 1985. Cholera and other vibriosis in the Unates States, N. Engl. J. Med. 312:343-350

- Mouriño-Pérez, R.R. 1998. Oceanography and the seventh cholera pandemic. *Epidemiology*. 9(3):355-358
- Nelson, K.H. 1997. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 25, 403.
- Novitsky, J.A and Morita, R.Y. 1976, Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio., *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 617-622
- Novitsky, J.A and Morita, R.Y. 1978. Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions., *Mar. Biol.*, 48: 289-295
- Olarte, J., 1991. El germen del cólera. *Ciencias* 24: 43-50
- Reichardt, W. y Morita, R.Y. 1982. Survival stages of a psychrotrophic *Cytophaga johnsonae* strain. *Can. J. Microbiol.* 28: 841-850
- Roszak, D.B., y Colwell, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Review.* 51: 365-379.
- Roszak, D.B., Grimes, Colwell, R.R. 1984 Viable but non- recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic system. *Can J Microbiol.* 30: 334-338.
- Sánchez, J.L., Taylor D.N. 1997. Cholera. *The Lancet*, 349: 1825-1830.

- Singleton F.L., Attwell, R.W., Jangi, M.S., and Colwell, R.R. 1982a. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. Appl. Environ. Microb. 44: 1047-1058
- Singleton, F.L., Attwell, R.W., Jangi, M.S., and Colwell, R.R., 1982b. Influence of salinity and Organic Nutrient Concentration on Survival and Growth of *Vibrio cholerae* in Aquatic Microcosm., Appl. Environ. Microb. 43: 1080-1085
- Space Studies Board. 1999. size limit of very small microorganism. National Academy Press. Washigton, D.C. 131p.p
- Stanier, R.Y., Ingraham, L.J., Wheelis, M.L., Painter, P.R., 1996. Crecimiento microbiano, en: Microbiología, Editorial Reverté, S.A (2da edición), 750pp.
- Tamplin, M.L. y Colwell, R.R 1986. Effect of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin. Appl Environ Microbiol 52:297-301
- Tamplin, M.L., Gauzens A.L, Huq A., Sack D.A ym Colwell R.R. 1990. Attachment of *Vibrio cholera* serogrup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. Appl Environ. Microbiol. 56: 1977-1980.
- Vogel, G., 1998. Finding life's limits. Science 282:1399

- Xu H, S., Roberts, N., Attwell, R.W., Grimes, D.J. y Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment., Microbiol Ecol 8:313-323.