



Bacterias en estado viable pero no cultivable en agua desinfectada

Bacteria in Viable but Non-Cultivable State in disinfected water

Por *María del Carmen Moleón y Joshua Ariel Solano Gómez*

Resumen: Algunas infecciones gastrointestinales pueden estar relacionadas con las bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en inglés), las cuales no pueden ser detectadas a través de métodos de cultivo y constituyen un obstáculo para la desinfección del agua. En este artículo, se informa sobre las bacterias de importancia médica que han sido reportadas en estado VBNC y que han sobrevivido a procesos de purificación como la exposición a la luz UV y la cloración, pues ello representa un peligro para la salud pública.

Palabras clave: bacterias patógenas, desinfección de agua, salud pública, seguridad microbiológica, agua potable, agua residual.

Abstract: Some gastrointestinal infections may be related to viable but nonculturable bacteria (VBNC), which cannot be detected through culture methods and are an obstacle to water disinfection. In this article, we report on medically important bacteria that have been reported in the VBNC state and have survived purification processes such as exposure to UV light and chlorination, as they pose a public health hazard.

Keywords: pathogenic bacteria, water disinfection, public health, microbiological safety, drinking water, wastewater.



Fotos: freepik.es

El agua es un recurso indispensable para la humanidad y es un derecho tener acceso a ella de forma segura y libre de contaminantes, debido a que es una necesidad fisiológica básica; sin embargo, la escasez de esta es un problema severo en la actualidad. En 2020, la Organización Mundial de la Salud reportó que solo 74% de la población contaba con un suministro de agua seguro y que alrededor de 800,000 personas mueren al año a causa de enfermedades diarreicas provocadas por la insalubridad del agua, saneamiento deficiente y mala higiene de manos.

La misma organización expuso que apenas 34% de la población contaba con instalaciones de saneamiento conectadas al alcantarillado, y que 45% de las aguas residuales domésticas fueron vertidas al drenaje sin un tratamiento previo. En

México, con la adopción del programa Agua Limpia en 1991, la Comisión Nacional del Agua logró, en 2015, una cobertura de agua potable de 95.3% y 92.8% de alcantarillado, y disminuyó la tasa de mortalidad en niños menores de 5 años de 122.7 a 7.3 por cada 100,000 habitantes (CONAGUA, 2019).

Cada país regula la calidad del agua y le da seguimiento por medio de leyes, normas y programas regulatorios, con el fin de proteger a su población. No obstante, es indispensable revisar constantemente los estándares de calidad para el seguimiento de contaminantes conocidos y regulados, pero también para los que hace poco han sido identificados, también llamados contaminantes emergentes (Levallois y Villanueva, 2019). Aquí cabe hacer mención de que un contaminante microbiológico relativamente nuevo (no considerado en ninguna de estas clasificaciones), como las bacterias en estado viable pero no cultivable (o VBNC, por sus siglas en inglés: *Viable but Non-Culturable*), muestran un mecanismo de supervivencia que evita que sean eliminadas a través de procesos de desinfección en agua potable y agua residual, además de que eluden los métodos de identificación y cuantificación de bacterias basados en medios de cultivo, lo cual conduce a su subestimación y trae consigo un gran riesgo para la salud pública.

Un claro ejemplo del peligro que suponen estas bacterias son los brotes de enfermedades con los cuales se han asociado debido al consumo de productos alimenticios contaminados, como ocurrió en 1999, en Japón,

ALREDEDOR DE 800,000 PERSONAS MUEREN AL AÑO A CAUSA DE ENFERMEDADES DIARREICAS PROVOCADAS POR LA INSALUBRIDAD DEL AGUA O SANEAMIENTO DEFICIENTE

con 62 casos a causa de la bacteria VBNC *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157 (Makino et al., 2000); un año después hubo más de 1,500 casos de septicemia y gastroenteritis por infecciones de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Oranienburg* VBNC (Asakura et al., 2002), y, en 2011, en Alemania se identificó un brote con más de 3,000 casos de diarrea sanguinolenta y del síndrome urémico hemolítico por infecciones con *E. coli* O104:H4 enterohemorrágica (EHEC) y enteroagregativa (EAEC) en estado VBNC (Auras et al., 2011).

El estado VBNC fue definido por primera vez en *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, por Xu et al. (1982) como una táctica de supervivencia que presentan las bacterias ante factores ambientales adversos, entre estos la exposición a temperaturas o niveles de pH extremos, entornos con bajos niveles de nutrientes, estrés oxidativo, presencia de antibióticos (Ramamurthy et al., 2014) o agentes desinfectantes como cloro y/o cloramina (Ye et al., 2020).

Actualmente, se ha identificado que este estado (VBNC) lo presentan mayormente las bacterias Gram-negativas y en menor medida las Gram-positivas. Este se caracteriza porque los microorganismos se encuentran metabólicamente activos, pero pierden la habilidad de formar colonias en los medios de cultivo estándar, evadiendo así su detección mediante el recuento en placa (Zhang et al., 2021).

Las células bacterianas experimentan una serie de cambios en estado VBNC, por ejemplo, al ver afectada su morfología reducen su tamaño y modifican la forma de bacilo con forma de bastón a un bastón corto o parecido a un coco (Wei y Zhao, 2018). También sufren alteraciones bioquímicas en la pared celular que les otorga una mayor resistencia mecánica (Signoretto et al., 2000). Sus propiedades de adhesión y virulencia también se alteran, pero mantienen intactas sus membranas, conservan activo el metabolismo y la respiración celular, además de que aún pueden sintetizar ARNm (Li et al., 2014).

Aun cuando las bacterias VBNC eluden la cuantificación convencional, existen métodos para su identificación, como la tinción Live/Death BacLight, que utiliza colorantes de unión a ácidos nucleicos, SYTO 9 y yoduro de propidio (PI) en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO), que tiñe las células viables de verde y las células no viables de rojo. Las observaciones de estas bacterias se pueden realizar con microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo (Wideman et al., 2021).



Otro método es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR), que amplifica las secuencias de ADN a niveles detectables. Cuando se complementa con la tinción con monoazida de etidio (EMA) y monoazida de propidio (PMA), evita la amplificación del ADN de células muertas, brindando un recuento de las células viables (Ramamurthy *et al.*, 2014).

También se emplea el recuento viable directo (DVC), en el que incuban las bacterias por 7 horas a 37 °C en agua con extracto de levadura y otros nutrientes, así como antibióticos para inhibir la replicación de ADN; para las bacterias Gram-negativas se usa ácido nalidíxico y para las Gram-positivas, ciprofloxacina. Las bacterias se tiñen con un tono fluorescente y se realiza un conteo directo con un microscopio de epifluorescencia (Wideman *et al.*, 2021). Existen otros métodos como la técnica de recuento viable directo de anticuerpos fluorescentes modificados (DFA- DVC), la tinción doble de cloruro de 5- ciano- 2, 3- ditolil tetrazolio (CTC) y 4, 6- diamino- 2 fenilindol (DAPI) (Ramamurthy *et al.*, 2014).

Cuando las células dejan de estar en contacto con el factor estresante que indujo el estado VBNC y se encuentran en un ambiente con condiciones favorables y/o factores estimulantes, como un incremento de temperatura al ser sometidas a un entorno con bajas temperaturas o la adición de nutrientes por inanición, pueden recuperar su metabolismo, la virulencia total y la habilidad de cultivo en un proceso llamado resucitación (Kan *et al.*, 2019).



La resucitación de las bacterias VBNC en alimentos y agua supone un riesgo para la población, puesto que ha sido relacionada con brotes de enfermedades, como el mencionado en Japón en 1999 (Asakura *et al.*, 2002). Durante este evento, se identificó que *S. enterica* serovar *Oranienburg* sobrevivió a las altas concentraciones de NaCl que requiere el proceso, y que lo hacían calificar como “microbiológicamente seguro”.

BACTERIAS VBNC EN LA DESINFECCIÓN DEL AGUA POTABLE

La desinfección del agua debe seguir un proceso en el que se indiquen los límites máximos de contaminantes. En México, contamos con la Norma Oficial NOM-127-SSA1-2021 para uso y consumo humano de agua, que describe los límites permisibles, en las especificaciones microbiológicas indica como límite permisible <1.1 NMP 100 mL-1 o no detectable de *E. coli* y coliformes termotolerantes (DOF, 2021). Mientras que la Norma Oficial Mexicana NOM- 179-SSA1-2020 detalla el control de la calidad del agua distribuida por los sistemas de abastecimiento, la frecuencia de monitoreo de *E. coli*, coliformes fecales y microorganismos termotolerantes (DOF, 2020). Sin embargo, al hacer la evaluación usando métodos basados en medios de cultivo, posterior a la desinfección, pueden salir datos en los que exista una subestimación en el número de bacterias reportadas, pues han ingresado al estado VBNC (Tabla 1).

UN PELIGRO PARA LA SALUD PÚBLICA SON LAS BACTERIAS EN ESTADO VBNC QUE NO SE ELIMINAN CON LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN MÁS USADOS (LUZ UV Y CLORACIÓN)

Tabla 1. Condiciones reportadas que han inducido el estado VBNC en bacterias patógenas analizadas en agua

Bacteria patógena en estado VBNC	Dosis de desinfectante	Fuente
<i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	300 ml cm ⁻² de Luz UV	Zhang et al. 2015
<i>Escherichia coli</i>	De 0 a 172.2 ml cm ⁻² de Luz UV	Zhang et al. 2018
<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	≥ 5 ml cm ⁻² de Luz UV	Guo et al., 2019
<i>Legionella pneumophila</i>	De 0 a 40 ml cm ⁻² de Luz UV	Grossi et al., 2018
<i>Helicobacter pylori</i>	4 mg O ₃ min L ⁻¹	Orta de Velásquez et al., 2017
<i>Helicobacter pylori</i>	0.05 a 6.00 mg/L Cl	Santiago et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	0.5 mg L ⁻¹ de Cl	Ye et al., 2020
<i>Escherichia coli</i>	2 ppm de cloro	Kibbee y Örmeci, 2017
<i>Escherichia coli</i>	1000 ml cm ⁻² de luz UV y 12 mg L ⁻¹ por 2.5 h de cloro	Zhu et al., 2022

Un método de desinfección de agua potable es la exposición a luz ultravioleta (UV), sobre todo en casa puesto que no requiere la adición de productos químicos; se considera práctico y elimina microorganismos resistentes al cloro y con tiempos de contacto más cortos en comparación con el tratamiento con cloro (Fitzhenry et al., 2021); cuando la luz es absorbida causa daños en el ADN que logra interferir con la transcripción y la replicación (Goosen y Moolenaar, 2008).

A pesar de las ventajas que representa el uso de luz UV, se ha identifi-

cado que puede actuar como factor estresante para los microorganismos e inducir el estado VBNC en bacterias patógenas. En la investigación de Zhang et al. (2015), se observó que las células de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* pueden mantener intacta la membrana celular, incluso ante dosis UV de 300 ml cm⁻², y aun encontrándose en ese estado, las bacterias pueden retener la virulencia y causar enfermedades. Asimismo, se identificó que tienen la capacidad de resucitar al estar en un ambiente con condiciones de temperatura y nutrien-

tes apropiados para su crecimiento, aunque *E. coli* muestra una mayor facilidad que *P. aeruginosa*.

Zhang et al. (2018) también observaron que durante la irradiación de luz ultravioleta de flujo continuo con dosis de 0 y 172.2 ml cm⁻² ocurre el ingreso al estado VBNC en *E. coli*; determinaron que al incrementar las dosis de luz UV también aumentaba la proporción de bacterias VBNC. Con este proceso, las bacterias mantuvieron la integridad de sus membranas, la respiración celular y del nivel de transcripción, evidencia de su viabilidad, e incluso pudieron ser resucitadas. Se trata del método de cultivo de células individuales.

En otras investigaciones, como la de Guo et al. (2019), se indujo el estado VBNC por irradiación UV con dosis ≥ 5 ml cm⁻² en bacterias de importancia que pueden encontrarse en agua potable (*Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*). Se reportó que, ante la exposición a altas dosis de luz UV (200 ml cm⁻²), las bacterias retuvieron la actividad respiratoria. Los investigadores probaron la eficiencia de dos métodos para detectar la viabilidad: la citometría de flujo de combinación de cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTM-FMC) y la espectroscopia Raman marcada con D2O. Sus resultados indicaron que el método CTC-FCM sirve para detectar la viabilidad esencial y que el método Raman es adecuado para identificar la actividad metabólica global.

En la investigación de Grossi et al. (2018), la exposición a dosis de 0 a 40 ml cm⁻² de luz UV en *Legionella*



pneumophila (patógeno responsable de la fiebre de Pontiac y la enfermedad del legionario) causa el ingreso al estado VBNC. Durante el co-cultivo de esta bacteria con *Acanthamoeba polyphaga* permanece infecciosa y es capaz de resucitar, lo cual supone un gran riesgo, ya que se encuentran comúnmente en las estructuras de plomería y pueden infectar a las personas a través de la formación de aerosoles en el momento de su abastecimiento y utilización.

Otro método de desinfección es la ozonización, que se caracteriza por ser eficiente, rápida y prometedora, pues actualmente se reporta que un gran número de bacterias son resistentes al cloro. El ozono es un oxidante que realiza dos acciones: una directa, con ozono molecular, y otra indirecta, a partir de la descomposición del ozono con el

radical OH, lo cual daña las estructuras celulares y los fragmentos de genes de los microorganismos (Ding et al., 2019).

Sin embargo, el ozono también ha mostrado que las células VBNC que hayan ingresado a ese estado previamente, durante un proceso de desinfección, pueden ser reducidas mediante una ozonización o cloración posterior. Así, Orta de Velásquez et al. (2017) indujeron el estado VBNC en *Helicobacter pylori* al suspenderla en una solución salina isotónica estéril y la expusieron a cloro y ozono. Sus resultados mostraron que cuando se expuso a 4 mg O₃ min L⁻¹ disminuyó 5 log. Para obtener este mismo resultado con cloro se necesitó un mayor tiempo de contacto.

A la fecha, la cloración es el proceso más empleado para la eliminación de microorganismos en agua potable. El cloro es una sustancia antimicrobiana con gran capacidad oxidante y afecta los procesos metabólicos. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes, pues cuando se usa en concentraciones altas existe el riesgo de que se formen subproductos peligrosos, malos sabores y olores. Además, existen microorganismos que son resistentes (Virto et al., 2005). Aunque el cloro residual tiene mayor permanencia en los suministros de agua y asegura la calidad del abastecimiento, también provoca el ingreso al estado VBNC, por ejemplo, bacterias de importancia médica, como *Helicobacter pylori* (relacionada con la gastritis crónica, úlcera péptica y carcinoma gástrico), han sido monitoreadas en muestras de agua potable en España, donde identificaron que 6 de 24 muestras conservaban células viables, lo cual

sugiere que pueden sobrevivir a concentraciones de cloro de 0.05 a 6.00 mg/L (Santiago *et al.*, 2015).

Es más, se ha demostrado que *E. coli* vBNC inducida por cloración de bajo nivel (0.5 mg L⁻¹) tiene el potencial para resucitar bajo condiciones apropiadas, pero que al entrar al estado vBNC adquiere una mayor resistencia a antibióticos y metales, al mejorar la regulación de los genes del sistema de salida de metales y fármacos de la célula (Ye *et al.*, 2020).

La cloramina es un desinfectante secundario ampliamente usado y, por ser más estable que el cloro, persiste más tiempo en el agua y se introduce en biopelículas (Pfaller *et al.*, 2021). Debido a la preocupación que han causado estas bacterias que entran al estado vBNC, se han desarrollado modelos matemáticos que describen la dinámica de la inducción del estado vBNC para cuantificar el efecto de la desinfección con cloro y cloramina en *E. coli*. Sus hallazgos demostraron que la tasa de desinfección del cloro fue mayor al presentar valores de 2.59-29.89 células cultivables h⁻¹ y 19.52-26.74 células viables h⁻¹; mientras que la cloramina exhibió valores de 0.5446-10.81 células cultivables h⁻¹ y de 0.3398- 14.57 células viables h⁻¹, al agregar la misma dosis de desinfectante (Chen *et al.*, 2020).

BACTERIAS vBNC EN LA DISTRIBUCIÓN DEL AGUA POTABLE

Aparte de lo anterior, existen otros factores que influyen en la inducción a ese estado, como los materiales de los sistemas de plomería, principalmente

el cobre, que tiene propiedades antimicrobianas. Cuando las bacterias se exponen a los iones del cobre en una superficie son afectadas: muerte por contacto; sus membranas celulares se dañan y el ADN se degrada. Aun cuando los efectos varían según la especie, su toxicidad se ha relacionado con la capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mathews *et al.*, 2013) que son parte de una familia de moléculas formadas como subproducto del metabolismo aeróbico y son altamente reactivas: cuando se producen en exceso, provocan daño por estrés oxidativo (Andrés *et al.*, 2021). Sin embargo, también se ha reportado que cuando ocurre este contacto entre las bacterias y una superficie de cobre en los suministros de agua potable se puede promover el ingreso al estado vBNC. Esto ha sido reportado por Dwidjosiswojo *et al.* (2011) para *P. aeruginosa*, que, además, mostró su habilidad de resucitar al perder el estrés por cobre recuperando su habilidad de cultivo y citotoxicidad.

DESINFECCIÓN EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

La desinfección y monitoreo de las aguas residuales previenen la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, antes de que a estas se les dé un segundo uso en el que puedan entrar en contacto con la población.

La cuantificación de las bacterias viables evita que los microorganismos, como *E. coli*, permanezcan en el efluente de una planta de tratamien-

LA CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS VIABLES EVITA QUE LOS MICROORGANISMOS, COMO *E. COLI*, PERMANEZCAN EN EL EFLUENTE DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO

to, posterior a la desinfección con 2 ppm de cloro, donde se detectaron 2.32 Log₁₀ vBNC 10 mL⁻¹ (Kibbee y Örmeci, 2017).

Los microorganismos patógenos pueden sobrevivir incluso a métodos de desinfección combinados, según lo han reportado Zhu *et al.* (2022), al exponer *E. coli* vBNC, aislada de aguas residuales hospitalarias, a los tratamientos con luz UV (dosis de 1000 mJ cm⁻²) y cloración alta (12 mg L⁻¹ por 2.5 h), donde permanecieron persistentes y mantuvieron activos los genes de virulencia, reteniendo su patogenicidad y con riesgo de resucitación.

Cabe mencionar que se están realizando diversas investigaciones sobre la eficiencia de la desinfección de aguas residuales de hospitales, que representan un interés particular por razones obvias. Así, Jiang *et al.* (2023) obtuvieron que los niveles de contaminación con *E. coli* y *Enterococcus* vBNC de las aguas hospitalarias pueden reducirse por cloración pero que, durante este proceso, se liberan genes de resistencia a antibióticos



(ARG) y elementos genéticos móviles (MGE), los cuales permiten a las bacterias viables aumentar su resistencia a antibióticos como la ceftazidima, ciprofloxacina y vancomicina.

La desinfección de agua, tanto potable como residual, tiene un rol muy importante en la supervivencia del ser humano y en la prevención y control de las enfermedades transmitidas por este medio, ya que, como menciona la OMS, se estima que alrededor de 800,000 personas mueren al año a causa de diarrea relacionada con la mala calidad del agua, saneamiento inapropiado y malas prácticas de higiene de manos. La organización calcula que, en caso de atender los puntos anteriores, podría prevenirse la muerte de aproximadamente 297,000 niños menores de cinco años y que en el grupo más vulnerable (2022).

En conclusión, los métodos de detección de microorganismos para establecer la calidad del agua están basados en medios de cultivo y no son apropiados para asegurar la ausencia de bacterias patógenas VBNC, por lo que se sugiere emplear o complementar la cuantificación microbiológica convencional con métodos de detección basados en la viabilidad. Para estos microorganismos, la exposición a desinfectantes representa un ambiente hostil en el que luchan por sobrevivir empleando estrategias que les permiten escapar a su detección.

Las bacterias de importancia médica en aguas residuales y potables implican un riesgo para la salud pública, pues, como se ha reportado en investigaciones recientes, pueden resistir estos procesos, es el caso de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, *H. pylori*, *Enterococos* y otras.

Por tanto, durante los análisis de calidad de agua se deben tener precauciones y considerar métodos eficientes para el conteo de microorganismos viables, especialmente en bacterias VBNC provenientes de hospitales; se pueden dispersar genes de resistencia a antibióticos, e incluso se deben incluir algunas especies patógenas que son capaces de resucitar al encontrarse en un ambiente favorable o que pueden retener la capacidad para provocar enfermedades durante el estado VBNC. 

Referencias

- Andrés Juan, Cecilia et al. (2021). "The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies", en *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, núm. 9, 4642. <<https://doi.org/10.3390/ijms22094642>>.
- Asakura, Hiroshi et al. (2002). "Viable but nonculturable Salmonella species recovery and systemic infection in morphine-treated mice", en *The Journal of infectious diseases*, vol.186, núm.10, 1526-1529. <<https://doi.org/10.1086/344353>>.
- Aurass, Phillip, Rita Prager y Antje Flieger (2011). "EHEC/EAEC O104: H4 strain linked with the 2011 German

outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief", en *Environmental microbiology*, vol.13, núm.12, 3139-3148. <<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02604.x>>.

- Chen, Sheng et al. (2020). "Modelling the effect of chlorination/chloramination on induction of viable but non-culturable (VBNC) *Escherichia coli*", en *Environmental Technology*, vol. 41, núm. 26, 3443-3455. <<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1611939>>.
- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua (2019). *Estadísticas del Agua en México 2019*. <https://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2019.pdf>.
- Dietersdorfer, Elisabeth et al. (2018). "Starved viable but non-culturable (VBNC) Legionella strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages", en *Water Research*, vol. 141, 428-438. <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.058>>.
- Ding, Wanding et al. (2019). "Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water", en *Water research*, vol.160, 339-349. <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.014>>.
- DOF, Diario Oficial de la Federación (2020). Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-2020, Agua para uso y consumo humano. Control de la calidad del agua distribuida por los sistemas de abastecimiento de agua. <https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5603318&fecha=22/10/2020#gsc.tab=0>.
- _____ (2021). Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. <https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0>.
- Dwidjosiswojo, Zenyta et al. (2011). "Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments", en *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 214, núm. 6, 485-492. <<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.06.004>>.
- Fitzhenry, Kelly et al. (2021). "Bacterial inactivation, photoreactivation and dark repair post flow-through pulsed UV disinfection", en *Journal of Water Process Engineering*, vol. 41, 102070. <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102070>>.
- Fleischmann, Susanne et al. (2021). "How to evaluate non-growing cells—current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria", en *Antibiotics*, vol. 10, núm. 2, 115. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics10020115>>.
- Goosen, Nora y Geri F. Moonlenaar (2008). "Repair of UV damage in bacteria", en *DNA repair*, vol. 7, núm. 3, 353-379. <<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002>>.
- Grossi, Michael, Rafish Dey y Nicolas J. Ashbolt (2018). "Searching for activity markers that approximate (VBNC) Legionella pneumophila

- infectivity in amoeba after ultraviolet (UV) irradiation", en *Water*, vol.10, núm. 9, 1219. <<https://doi.org/10.3390/w10091219>>.
- Guo, Lizheng et al. (2019). "Population and single cell metabolic activity of UV-induced VBNC bacteria determined by CTC-FCM and D2O-labeled Raman spectroscopy", en *Environment International*, vol. 130, 104883. <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.077>>.
- Jiang, Qo et al. (2023). "Quantification and antibiotic resistance risk assessment of chlorination-residual viable/VBNC *Escherichia coli* and *Enterococcus* in on-site hospital wastewater treatment system", en *Science of The Total Environment*, vol. 872, 162139. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162139>>.
- Kan, Yumin et al. (2019). "Induction and resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state in *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops", en *Frontiers in microbiology*, vol. 10, 1081. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01081>>.
- Kibbee, Richard J. y Banu Örmeci (2017). "Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent", en *Journal of microbiological methods*, vol. 132, 139-147. <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.004>>.
- Levallois, Patrick y Cristina Villanueva (2019). "Drinking Water and Human Health: An Editorial", en *International Journal of Environmental Research Public Health*, vol. 16, núm. 4, 631. <<https://doi.org/10.3390/ijerph16040631>>.
- Li, Laam et al. (2014). "The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens", en *Frontiers in microbiology*, vol. 5, 258. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>>.
- Makino, Souch-Ichi et al. (2000). "Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe?", en *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, núm.12, 5536-5539. <<https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5536-5539.2000>>.
- Mao, Guannan et al. (2018). "Long-term effects of residual chlorine on *Pseudomonas aeruginosa* in simulated drinking water fed with low AOC medium", en *Frontiers in microbiology*, vol. 9, 879. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00879>>.
- Mathews, Salima et al. (2013). "Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions", en *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, núm. 8, 2605-2611. <<https://doi.org/10.1128/AEM.03608-12>>.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2022). *Agua para consumo humano*. <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>>.
- (2022). *Saneamiento*. <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sanitation>>.
- Orta de Velasquez, María Teresa et al. (2017). "Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images", en *Environmental technology*, vol. 38, núm. 6, 744-753. <<https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1210680>>.
- Pfaller, Stacy et al. (2021). "Chloramine concentrations within distribution systems and their effect on heterotrophic bacteria, mycobacterial species, and disinfection byproducts", en *Water research*, vol. 205, 117689. <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117689>>.
- Ramamurthy, Thandavarayan et al. (2014). "Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria", en *Frontiers in public health*, vol. 2, núm. 103. <<https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>>.
- Santiago, Paula, Yolanda Moreno y M. Antonio Ferrús (2015). "Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques", en *Helicobacter*, vol. 20, núm. 4, 252-259. <<https://doi.org/10.1111/hel.12205>>.
- Signoretto, Caterina et al. (2000). "Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state", en *Applied and environmental microbiology*, vol. 66, núm. 5, 1953-1959. <<https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000>>.
- Van Dyke, M. I. et al. (2010). "The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada", en *Journal of applied microbiology*, vol. 109, núm. 3, 1053-1066. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x>>.
- Virto, R. et al. (2005). "Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate", en *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, núm. 9, 5022-5028. <<https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005>>.
- Wei, Caijiao y Xihong Zhao (2018). "Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by low temperature and its resuscitation", en *Frontiers in microbiology*, vol. 9, 2728. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02728>>.
- Wideman, Nathan E. et al. (2021). "Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: a review", en *Microorganisms*, vol. 9, núm.1, 194. <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010194>>.
- Xu, Huai-Shu et al. (1982). "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment", en *Microbial ecology*, vol. 8, 313-323. <<https://doi.org/10.1007/BF02010671>>.
- Ye, Chengsong, et al. (2020). "Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC *Escherichia coli* induced by low level chlorination", en *Scientific reports*, vol. 10, núm.1, 1957. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58106-3>>.
- Zhang, Shenghua et al. (2015). "UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*", en *Environmental science & technology*, vol. 49, núm. 3, 1721-1728. <<https://doi.org/10.1021/es505211e>>.
- Zhang, Shenghua et al. (2018). "Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state by continuous-flow UVC and subsequent changes in metabolic activity at the single-cell level", en *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2243. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02243>>.
- Zhang, Xiao-Hua et al. (2021). "Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms", en *Marine Life Science & Technology*, vol. 3, 189-203. <<https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>>.



María del Carmen Jiménez Moleón es licenciada y doctora en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada, España, con un Máster en Gestión Medioambiental. Profesora de Tiempo Completo de la Facultad de Ingeniería de la UAEMéx y está adscrita al Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua (IITCA). Desde hace 19 años es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).



Joshua Ariel Solano Gómez es egresada de la Licenciatura en Biología de la UAEMéx y de la Maestría en Ciencias del Agua del Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua (IITCA). Actualmente, es profesora de preparatoria y estudiante, becada por el CONACYT, del doctorado en Ciencias del Agua del IITCA.