

Modelación in vitro del comportamiento ambiental de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139

✉ Talena Ledón, Daneylis D Hernández, Karen Marrero, Rafael Fando

Departamento de Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas,
Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC
Ave. 25 y 158, CP 10600, Playa, La Habana, Cuba
✉ talena.ledon@cnic.edu.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

El cólera es una enfermedad diarreica producida por la infección con la bacteria *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139. Muchas de las investigaciones para el desarrollo de vacunas orales contra esta enfermedad se dedican a la producción de cepas vivas atenuadas. TLP01 y TLP05 son cepas atenuadas del serogrupo O139, que carecen de los genes del profago CTX ϕ ; además, no producen la hemaglutinina proteasa, importante factor de la patogénesis; ni la fimbria hemaglutinina sensible a manosa, la cual pudiera ser importante en el comportamiento de las cepas vacunales en el ambiente. En este artículo se describe el posible comportamiento ambiental de estas cepas, a partir del estudio *in vitro* de sus propiedades para producir varios tipos de biopelículas, de adquirir el fenotipo rugoso y de resistir varias condiciones de estrés ambiental, como la presencia de hipoclorito de sodio, de detergentes o altas concentraciones salinas. Los resultados evidencian que las cepas TLP01 y TLP05 poseen características que limitan su supervivencia *in vitro* frente a distintas condiciones de estrés, con respecto a cepas controles y salvajes. En el entorno ambiental, estas características pudieran limitar su supervivencia y actuar como elementos de contención del agente biológico que se use como ingrediente farmacéutico activo del candidato vacunal.

Palabras clave: vacuna de cólera, *Vibrio cholerae* O139, cepas atenuadas, persistencia ambiental

Biotecnología Aplicada 2014;31:121-128

ABSTRACT

In vitro modeling of the environmental performance of attenuated strains of *Vibrio cholerae* O139. *Vibrio cholerae*, serogroups O1 and O139, is the causative agent of cholera diarrheal disease. Much of the research aimed to develop oral cholera vaccines is directed to the production of live attenuated strains, such as the *V. cholerae* O139 TLP01 and TLP05 strains. These two strains lack CTX ϕ prophage genes and do not produce the hemagglutinin protease, a relevant pathogenesis factor, and the mannose-sensitive hemagglutinin fimbria, which could play an important role in the environmental behavior. In this work, different *in vitro* models were used to study the potential environmental performance of these two strains. Their ability to produce different types of biofilms, to acquire rugose phenotype and to resist different environmental stress conditions such as the presence of chlorine, detergents or high salt concentrations, were assessed. Significantly, the TLP01 and TLP05 strains displayed characteristics that limit their *in vitro* survival under different stress conditions, with respect to controls and wild type strains. Such behavior under harsh environmental settings may limit their survival and act for their containment while using them as active ingredients for the development of a cholera vaccine candidate.

Keywords: cholera vaccine, *Vibrio cholerae* O139, attenuated strains, environmental persistence

Introducción

El cólera es una enfermedad diarreica producida por la infección con *Vibrio cholerae*. Los síntomas característicos se deben a la actividad de la toxina producida por la bacteria en el intestino delgado, conocida como toxina del cólera (CT). Solo los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* pueden ser potencialmente epidémicos, y por las diferencias de sus componentes somáticos, no hay protección cruzada entre ambos serogrupos [1].

Es una enfermedad de rápida aparición y propagación, por lo que cuando ocurre un brote, los sistemas de salud pública suelen colapsar, sobre todo en los países más pobres. Se recomiendan algunas medidas para su prevención, como garantizar fuentes de agua potable y su saneamiento constante, pero son verdaderos desafíos para los países en desarrollo [2]. Por tanto, se considera que la vacunación exitosa pudiera evitarla. Muchas de las investigaciones para el desarrollo de vacunas, se dedican a la producción de una cepa viva atenuada, que se pueda administrar por vía

oral y que estimule el sistema mucosal de forma muy similar a la infección natural. Estas estrategias podrían contribuir al desarrollo de candidatos promisorios que mimeticen los eventos que ocurren durante la infección natural [3].

Una preocupación sobre el empleo de estas variantes es la posibilidad de que las cepas vacunales readquieran genes tóxicos. Los genes que codifican la toxina del cólera residen en el genoma del profago filamentoso CTX ϕ [4]. En tal sentido, las probabilidades de reversión a la virulencia por infección con este fago quedarían limitadas, fundamentalmente a aquellas condiciones en las que se expresa su receptor: el entorno intestinal, en este caso. Existen otros vibriofagos como VGJ ϕ , VEJ ϕ , KSF- ϕ , VSK, VSKK y fs2 que podrían tener ventajas sobre CTX ϕ para transmitir los genes que codifican la toxina del cólera bajo condiciones como las encontradas en el medioambiente [5-7]. Estos fagos emplean como receptor la fimbria hemaglutinina sensible a manosa (MSHA), la cual se

1. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Ahmad QS, Faruque AS, Salam MA, et al. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1116-22.

2. Bishop AL, Camilli A. *Vibrio cholerae*: lessons for mucosal vaccine design. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(1):79-94.

3. Lopez AL, Clemens JD, Deen J, Jodar L. Cholera vaccines for the developing world. *Hum Vaccin.* 2008;4(2):165-9.

4. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996;272(5270):1910-4.

5. Campos J, Martinez E, Marrero K, Silva Y, Rodriguez BL, Suzarte E, et al. Novel type of specialized transduction for CTX ϕ or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ ϕ in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2003;185(24):7231-40.

expresa en el entorno acuático, y pudiera participar en la transmisión de genes tóxicos por un mecanismo consistente en la transducción especializada, mediante fagos híbridos con CTXφ.

En el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, de Cuba, se han desarrollado dos cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* del serogrupo O139 denominadas TLP01 y TLP05, con fines vacunales. Se obtuvieron por supresión de los genes del profago CTXφ y de la toxina del cólera *ctxAB*, seguido del remplazo del gen *hapA*, codificante de la hemaglutinina proteasa, por un gen inactivado mediante la inserción de un fragmento de ADN de la bacteria *Clostridium thermocellum*, que codifica para la endoglucanasa A, lo cual garantiza su fácil distinción. A su vez, se sustituyó el gen *mshA* por un alelo mutado, que impide la producción de la fimbria MSHA. Esta mutación previene la infección con fagos híbridos, portadores de genes tóxicos, que utilizan esta fimbria como receptor y reducen la probabilidad de readquisición de esos genes por este mecanismo [8].

La incidencia de los brotes de cólera está muy vinculada con factores ambientales y ecológicos, que a su vez se controlan por la variabilidad del clima a gran escala [9, 10]. La persistencia del microorganismo depende mucho de su capacidad para adaptarse y desarrollar estrategias de supervivencia. Entre ellas, la formación de biopelículas, la adquisición de fenotipo rugoso o alcanzar el estado viable no cultivable [11]. De hecho, *V. cholerae* habitualmente crece formando biopelículas sobre superficies abióticas o bióticas [12]. Tales biopelículas proporcionan un microentorno que, probablemente, favorece la supervivencia y persistencia del microorganismo durante períodos interepidémicos, debido a que le permiten establecer transacciones metabólicas favorables con otros miembros de esta estructura. Además, le confieren protección frente a varios agentes estresantes y predadores del ambiente [13].

La formación de biopelículas de *V. cholerae* depende de la síntesis de un exopolisacárido (EPS) codificado por un grupo de genes contenidos en el operón de polisacárido *vps*. Las cepas O1 El Tor y O139 dependen, además, de la motilidad flagelar y, las primeras dependen de la producción de la fimbria MSHA [14, 15]. La adquisición del fenotipo rugoso también se asocia con los atributos para producir EPS [16].

Igualmente se ha reportado la formación de otros tipos de biopelículas en *V. cholerae*, independientes de los genes *vps*, en un modelo de agua de mar. Estos requieren del ión Ca^{2+} , a diferencia de las dependientes de *vps*, que necesitan monosacáridos [17].

De emplearse las cepas TLP01 o TLP05 como ingrediente farmacéutico activo de determinada vacuna, se espera que los individuos vacunados durante campañas masivas, excreten las cepas atenuadas en las heces fecales. Luego sería necesario evaluar el impacto de este tipo de vacunas para el medioambiente.

En este trabajo se modeló experimentalmente el posible comportamiento ambiental de las cepas TLP01 y TLP05 de *V. cholerae*. Para ello se estudió *in vitro* su propiedad para producir varios tipos de biopelículas, de adquirir el fenotipo rugoso y de resistir condiciones de estrés ambiental, como la presencia de hipoclorito de sodio, de detergentes o altas concentraciones salinas.

Materiales y métodos

Materiales

Cepas

Las cepas de *V. cholerae* ensayadas en este estudio fueron las C7258 (tipo salvaje), y las cepas mutantes *mshA* de interés vacunal TLP01 y TLP05. También se incluyó a la cepa isogénica TLP03 y el parental atoxigénico TLP13 (controles del ensayo) (Tabla).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron TSB (triptona 17 g/L, peptona 3 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L, NaCl 5 g/L) suplementados con glucosa al 0.4 %; agua de mar simulada (NaCl 27.3 g/L, Mg_2SO_4 13.6 g/L, $CaCl_2$ 1.5 g/L, KCl 0.8 g/L, $NaHCO_3$ 0.3 g/L, $Na_2B_4O_7$ 0.005 g/L, LiCl 0.001 g/L), ajustada a pH 7 y suplementados con hidrolizado de caseína al 1 %; agua peptona alcalina (peptona 10 g/L, NaCl 10 g/L), ajustada a pH 8.5.

Métodos

Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

La propiedad de producción de biopelículas se determinó en dos medios: TSB suplementado con glucosa y agua de mar simulada [17]. El ensayo se realizó en placas de cultivo de 96 pozos de poliestireno. Se partió de una dilución 1:100 de cultivos frescos con DO_{630nm} similares, en fase exponencial. Ello evitó la presencia de autoinductores en el inóculo, que pudieran influir negativamente en la producción de biopelículas. Como blanco se emplearon pozos que contenían el medio de cultivo sin inocular [18]. Las cepas ensayadas fueron TLP01, TLP03, TLP05 y TLP13. El experimento se efectuó por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24, 48 y 72 h. En cada tiempo se leyó la DO_{630nm} para verificar la homogeneidad en el crecimiento de las cepas, en un lector de placas (Multiscan, Finlandia). Después de tres lavados sucesivos con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 9.58 mM, KCl 2.68 mM, KH_2PO_4 1.47 mM; pH 7.2), se procedió a la tinción con safranina al 0.1 %. Para la disolución del colorante se empleó ácido acético al 33 %. La cuantificación de las biopelículas se realizó en el mismo lector de placas, pero a una DO_{490nm} .

Inducción del fenotipo rugoso

Se emplearon 5 µL de un cultivo fresco de las cepas TLP01, TLP05 y TLP13, para inocular tubos de

Tabla. Cepas de *Vibrio cholerae* utilizadas en este trabajo*

Cepas	Características
C7258	Tipo salvaje; serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa
TLP01	Mutante $\Delta CTX\phi$, <i>hapA::celA</i> , $\Delta mshA$ derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> O139 TLP13, mótil
TLP03	Mutante $\Delta CTX\phi$, <i>hapA::celA</i> , $\Delta mshA$ derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> O139 TLP13, mótil
TLP05	Mutante $\Delta CTX\phi$, <i>hapA::celA</i> , $\Delta mshA$ derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> O139 TLP13, no mótil
TLP13	Mutante $\Delta CTX\phi$ derivado de la cepa salvaje de <i>V. cholerae</i> O139 CRC266

* La cepa C7258 se aisló en Perú en 1991. Las demás cepas se describen en la referencia 8.

6. Campos J, Martinez E, Izquierdo Y, Fando R. VElphi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. Microbiology. 2010; 156(Pt 1):108-15.

7. Das B, Bischerour J, Barre FX. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. Indian J Med Res. 2011;133: 195-200.

8. Ledon T, Ferran B, Perez C, Suzarte E, Vichi J, Marrero K, et al. TLP01, an *mshA* mutant of *Vibrio cholerae* O139 as vaccine candidate against cholera. Microbes Infect. 2012;14(11):968-78.

9. Lipp EK, Huq A, Colwell RR. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(4):757-70.

10. Huq A, Sack RB, Nizam A, Longini IM, Nair GB, Ali A, et al. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4645-54.

11. Kamruzzaman M, Udden SM, Cameron DE, Calderwood SB, Nair GB, Mekalanos JJ, et al. Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(4):1588-93.

12. Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. Appl Environ Microbiol. 2001;67(7):3220-5.

13. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev. 2002;26(2):125-39.

14. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol Microbiol. 1999;34(3):586-95.

15. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol Microbiol. 2001;39(2):223-35.

16. Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(7):4028-33.

17. Kierek K, Watnick PI. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca^{2+} -dependent biofilm development in sea water. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(24):14357-62.

precultivo con 5 mL de agua peptona alcalina y se incubaron a 37 °C durante 30 días. En los tiempos establecidos se realizaron diluciones seriadas de las cepas y se sembraron en placas de medio LB-agar (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, (pH 7.0) y Bacto agar 15 g/L). Se observó la morfología de las cepas y se documentó la cantidad de colonias con morfología rugosa y morfología lisa, así como cualquier otra variación [19].

Evaluación de la susceptibilidad de las cepas frente a agentes estresantes

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas TLP01, TLP05 y TLP13, en condiciones ambientales de estrés, que incluyeron los agentes hipoclorito de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS) y alta salinidad.

Susceptibilidad al hipoclorito de sodio

Para evaluar la supervivencia de las cepas TLP01 y TLP13 al hipoclorito de sodio, se crearon condiciones que permitieran o no la formación de biopelículas [19]. Para lo primero, las cepas se crecieron en frascos de borosilicato con tapa, que contenían 3 mL de TSB-glucosa al 0.4 %, y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Posteriormente se verificó la homogeneidad en el crecimiento de las cepas, mediante lecturas en un espectrofotómetro de la DO_{630nm} de la fase planctónica. Se desechó el contenido planctónico, y se procedió a la resuspensión de las células adheridas en 5 mL de PBS. Para despegar las biopelículas adheridas en el interior de cada tubo, se adicionó 1 g de perlas de vidrio, y se separaron empleando el vórtex. Mediante diluciones seriadas, se tomaron muestras para microconteo antes de añadir el agente. Seguidamente se añadió el NaOCl hasta una concentración de 2 ppm y se contaron los viables luego de 1; 5; 10; 20 y 30 min de añadido el agente. En cada tiempo se usó el tiosulfato de sodio a una concentración final de 0.015 % para inactivar al agente estresante. En placas LB se sembraron cantidades apropiadas de cada dilución, que se incubaron durante 20-22 h a 37 °C.

En la condición de zaranda, en que no se forman biopelículas, se cultivaron las células en tubos de precultivo que contenían TSB-glucosa al 0.4 %, durante 4 h a 37 °C. Se expusieron alrededor de 10⁷ unidades formadoras de colonia (u.f.c.), crecidas en estas condiciones, a la misma concentración de NaOCl, y se evaluó la susceptibilidad a este agente, como se describió.

Susceptibilidad de *V. cholerae* a SDS

En un medio TSB-glucosa al 0.4 % se crecieron las cepas TLP01, TLP05 y TLP13, se realizó una dilución 1:100 de cada cultivo para inocular. Se emplearon placas de 24 pozos de poliestireno. En el experimento se incluyó un blanco que solo contenía medio sin inocular. Las concentraciones ensayadas de SDS fueron 0.05 %, 0.1 %, 0.25 %, 0.5 % y 1 % [20]. Además se evaluó el crecimiento de cada cepa en ausencia del agente. Cada 2 h se realizó la lectura de la placa a 630 nm. Se realizaron dos experimentos independientes.

Susceptibilidad de cepas de *V. cholerae* a NaCl

Se obtuvieron colonias aisladas de las cepas C7258, TLP01, TLP05 y TLP13, y se crecieron con agitación durante 6 h. Posteriormente se centrifugó 1 mL

de cada cultivo bacteriano y se procedió a la resuspensión en 1 mL del medio TSB, que contenía NaCl 2.5 M. Se tomaron 100 µL de cada muestra para su microconteo a los 0; 15; 30 y 60 min. Se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas LB y se incubaron durante 20-22 h a 37 °C. Para el análisis de los resultados, se ajustaron las fracciones de bacterias sobrevivientes al estrés salino a una curva según el modelo de Weibull (modelo estadístico de distribución de los tiempos de inactivación) [21]:

$$\text{Log } S = \alpha \frac{1}{2.3} \times \left(\frac{t}{\alpha} \right)^{\beta}$$

Donde:

S: fracción de bacterias viable en cada punto temporal, con respecto a la cantidad al inicio del experimento; calculado según la expresión:

$$S = \frac{\text{u.f.c. (t)}}{\text{u.f.c. (t}_0\text{)}}$$

t: intervalo de tiempo en el que el sistema está bajo el efecto evaluado (estrés salino);

α: parámetro de escala; que depende del componente que se evalúa (osmolaridad);

β: parámetro de forma, relacionado con la forma de la curva y con la capacidad de resistencia (a la salinidad).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico Prisma sobre Windows, versión 4.0. El nivel de significación estadística fue de 0.05 % para todas las comparaciones. Las comparaciones de las medias se realizaron mediante la prueba t de Student o un Anova de clasificación simple, según se indica en cada caso en el acápite de resultados y discusión.

Resultados y discusión

Propiedad de producción de biopelículas

Se evaluó la propiedad de producción de biopelículas en las cepas TLP ensayadas. Se crearon condiciones que promueven la formación de biopelículas que dependen de la producción del exopolisacárido de *V. cholerae* (biopelículas dependientes de *vps*), y las que favorecen la producción de las biopelículas que no dependen de la expresión de los genes incluidos en el operón *vps* (independientes de *vps*). Estos estudios se hicieron en un medio rico y en un modelo de agua de mar, respectivamente. La propiedad para generar biopelículas se infirió a partir de la cuantificación de los exopolisacáridos producidos por las cepas, debido a la asociación estrecha entre estos procesos [14, 15]. En ausencia del exopolisacárido, las bacterias solo forman una monocapa sobre la superficie [14]. Igualmente, cuando por alguna otra mutación la cepa no puede formar la biopelícula, se producen cantidades de EPS no detectables por el método empleado en este estudio.

Cuantificación de biopelículas dependientes de *vps*

En medios de cultivo como el LB o el TSB *V. cholerae* forma biopelículas densas que contienen columnas

18. Yildiz FH, Dolganov NA, Schoolnik GK. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ET)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol.* 2001;183(5):1716-26.

19. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata SI, Yoshida SI. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(10):3648-55.

20. Provenzano D, Klose KE. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(18):10220-4.

21. Van Boekel MAJS. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *J Food Microbiol.* 2002;74(1-2):139-59.

de bacterias rodeadas de canales de agua [15]. Estos medios proveen las condiciones ideales *in vitro* para promover la producción de biopelículas dependientes de *vps*.

Al emplear un medio TSB suplementado con glucosa, solo las cepas TLP03 y TLP13 produjeron cantidades detectables de exopolisacárido, en las primeras 24 horas, por lo que se presume que producen biopelículas. Fue evidente la formación de un halo en la interfase aire-líquido, que caracteriza estas estructuras tridimensionales. Sin embargo, las cepas TLP01 y TLP05 no produjeron cantidades detectables de exopolisacárido (Figura 1). Tales evidencias apuntan a que, aunque las cepas TLP03 y TLP13 producen biopelículas en estas condiciones, la producción de la primera, que también es un mutante *mshA*, se reduce significativamente en relación con el parental atoxigénico TLP13, al menos a las 24 y 48 h (prueba t de Student, $p = 0.018$ y $p = 0.0134$, respectivamente). La imposibilidad de la cepa TLP05 para formar las biopelículas en las condiciones de este estudio pudiera estar relacionada con el fenotipo no móvil que la caracteriza. Esta cepa presenta una mutación aleatoria, que ocurrió accidentalmente durante su proceso de obtención, y le impide la motilidad, aunque por microscopía electrónica se comprobó la presencia del flagelo [8]. El movimiento del flagelo influye en la producción de ese tipo de biopelículas en *V. cholerae* O139, según reportaron Watnick *et al.* [15]. Este proceso es especialmente importante en el momento inicial de establecimiento de la monocapa. Los resultados indican que en el mutante TLP01 debió ocurrir alguna mutación espontánea, que impidió la producción de estas estructuras. La causa no está relacionada con la mutación *mshA*, ya que las evidencias sugieren que el mutante isogénico TLP03 puede establecer la estructura polisacáridica tridimensional.

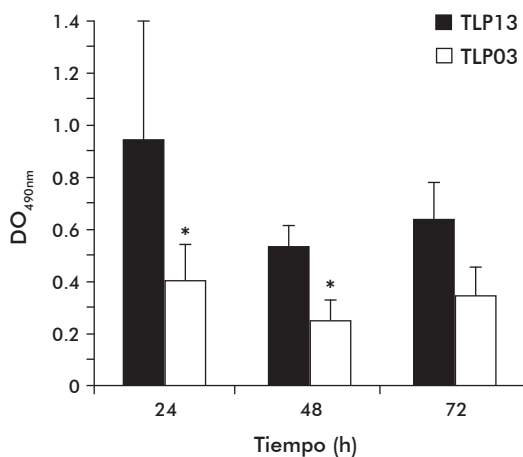


Figura 1. Cuantificación de biopelículas *Vibrio cholerae* dependientes de *vps*. El ensayo se realizó en caldo TSB con glucosa 0.4 %. La cuantificación de biopelículas se efectuó a partir del promedio del valor de la densidad óptica medida a 490 nm (DO_{490nm}) de tres experimentos independientes. El valor de corte del experimento (DO_{490nm} 0.1), se calculó como dos veces el valor de densidad óptica correspondiente al cultivo sin inocular. Las cepas TLP01 y TLP05 no cumplieron con ese valor (no mostradas). Las barras de error indican la desviación estándar. El asterisco significa diferencias significativas respecto al parental TLP13 (Prueba t de Student, $p < 0.05$). No se muestran los valores de las cepas TLP01 ni TLP05, por ser inferiores al valor de corte del ensayo.

Cuantificación de biopelículas no dependientes de *vps*

En agua de mar, *V. cholerae* puede formar biopelículas que no dependen de los genes *vps*, sino del calcio. Este elemento constituye un mediador directo de las interacciones célula-célula o célula-superficie en estas biopelículas [17]. La determinación de la propiedad de producción de estas biopelículas se realizó en un modelo de agua de mar obtenida en el laboratorio [17]. Al realizar la lectura a 600 nm se comprobó que las cepas TLP01, TLP03, TLP05 y TLP13 no diferían con respecto al crecimiento en las condiciones de cultivo estudiadas. Los resultados de la cuantificación de las biopelículas formadas se muestran en la figura 2.

A diferencia de los resultados en el medio TSB, todas las cepas evaluadas produjeron biopelículas en el agua de mar. Se ha descrito que se requiere la MSHA para la formación de biopelículas dependientes de calcio, pero que no es indispensable. Y que las relaciones intercelulares son más débiles y las biopelículas, menos densas, en los mutantes *mshA* [17]. Los resultados de nuestro estudio se corresponden con lo reportado, ya que en los mutantes *mshA* se apreció una reducción de las biopelículas producidas, con respecto al parental TLP13 (Figura 2).

Con respecto a la relevancia de la motilidad, en condiciones de déficit de azúcares y en presencia de calcio, pudiera ser que la presencia de flagelo sea una señal inductora para la formación de las biopelículas. Según Kierek y Watnick [17], para la formación de las estructuras dependientes de calcio se necesita también la presencia del flagelo; aunque el efecto es menos notable que el que tiene igual mutación en la formación de biopelículas dependientes de *vps*. Los resultados con la cepa TLP05 también confirman este precedente. Durante el experimento, esta cepa produjo niveles inferiores a los de la cepa TLP13. La cepa TLP05 produjo niveles incluso menores que los de los

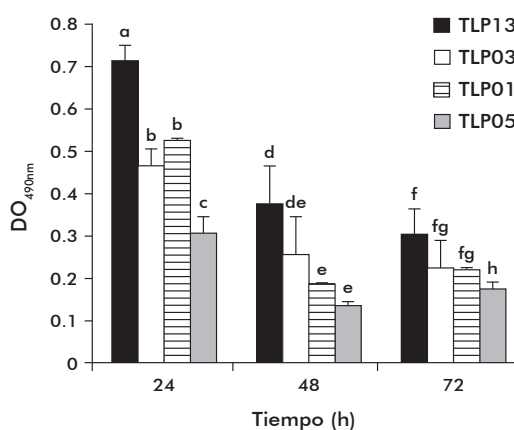


Figura 2. Cuantificación de biopelículas *Vibrio cholerae* no dependientes de *vps*. El ensayo se realizó en agua de mar simulada. La cuantificación de biopelículas se efectuó a partir del promedio del valor de la densidad óptica medida a 490 nm (DO_{490nm}) de tres experimentos independientes. El valor de corte del experimento (DO_{490nm} 0.1), se calculó como dos veces el valor de densidad óptica correspondiente al cultivo sin inocular. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes en un mismo tiempo significan diferencias significativas, según Anova de clasificación simple (Prueba de Tuckey *a posteriori*, $p < 0.05$).

mutantes TLP01 y TLP03, al menos a las 24 h (Anova de clasificación simple, $p < 0.05$; prueba de Tuckey *a posteriori*, $p < 0.05$). La cepa TLP05 podría estar más desfavorecida para formar biopelículas que el resto de los mutantes, debido a la mutación en el gen de la hemaglutinina sensible a manosa, junto con la expresión de un fenotipo no mótil.

Estos resultados indican que las cepas TLP01 y TLP05 producen biopelículas independientes de *vps*; sin embargo, los niveles de biopelículas son inferiores a los que produce la cepa parental. De acuerdo con ello, en las condiciones estudiadas, las cepas TLP01 y TLP05 no poseen ninguna ventaja competitiva asociada con este fenotipo, para persistir en el medioambiente. Este tipo de biopelículas requiere cantidades de Ca^{2+} en el orden de los milimoles, que no existen en ambientes fluviales, sino en el mar [22]. La dependencia del calcio determina que las biopelículas independientes de *vps* sean más relevantes en el ambiente marino, mientras que en ambientes lacustres y salobres, su relevancia podría ser menor.

La formación de biopelículas es indispensable para alcanzar el estado viable no cultivable [11]. En esa dirección, la discapacidad de los mutantes TLP01 y TLP05 para producir biopelículas pudiera redundar en una disminución de la supervivencia de estas cepas, y colocarlas en desventaja en el ambiente natural. Ese entorno posee condiciones más complejas que las establecidas en este estudio, por lo que no se puede descartar un comportamiento diferente. No obstante, de manifestarse este fenotipo en el medioambiente, sería un elemento de contención que contribuiría a la bioseguridad de las vacunas vivas atenuadas que contengan estas cepas como ingrediente activo. Luego se deberán realizar otros experimentos, incluyendo ensayos de competencia con cepas salvajes presentes en el ambiente, que permitan evaluar otras posibilidades de interacción, en un escenario más cercano al natural.

Inducción del fenotipo rugoso

El fenotipo rugoso de *V. cholerae* es un mecanismo de supervivencia y persistencia ambiental. Esta morfología le confiere una alta resistencia a agentes como el cloro, el peróxido de hidrógeno y otras condiciones de estrés oxidativo y osmótico [19]. Estudios previos han demostrado que el fenotipo rugoso observado en *V. cholerae* está relacionado con la producción del exopolisacárido, el cual promueve la formación de biopelículas [16]. Teniendo en cuenta esto, se procedió a evaluar la aparición de colonias con fenotipo rugoso en los mutantes TLP01 y TLP05, con respecto al parental TLP13, durante 30 días, tras ser incubados en agua peptona alcalina a 37 °C. Tales condiciones favorecen el cambio de colonias lisas a rugosas. El objetivo de este experimento fue comprobar si la incapacidad para producir biopelículas implicaba alguna discapacidad de los mutantes TLP01 y TLP05 para adquirir el fenotipo rugoso, considerando la relación entre este fenotipo y la producción del exopolisacárido. Se encontró que la cepa parental atoxigénica *V. cholerae* TLP13 muestra colonias con morfología rugosa a partir del octavo día de incubación. A partir del día 13 de incubación, la cepa TLP01 presentó colonias opacas con una corola en el centro, pero no se llegó a identificar el fenotipo rugoso típico de *V. cholerae*

durante el tiempo que duró el experimento. El mutante TLP05 mantuvo un fenotipo liso hasta el día 30 del experimento.

Estos resultados evidenciaron que las cepas TLP01 y TLP05 no adquieren el fenotipo rugoso y no forman biopelículas *in vitro*, condiciones en las que su parental sí las produce. Ambos fenotipos dependen de la producción de exopolisacárido, por lo que es posible suponer que en estas cepas podría existir alguna afectación en la producción de exopolisacáridos dependientes de *vps*, no relacionada con las modificaciones genéticas durante su construcción. Esta disfunción explicaría tanto la incapacidad para adquirir el fenotipo rugoso como para establecer la estructura tridimensional de las biopelículas.

Que los mutantes TLP01 y TLP05 no adquieran el fenotipo rugoso, pudiera hacerlos más vulnerables a los cambios ambientales que incluyen situaciones de estrés y, consecuentemente, pudiera afectar su persistencia en el ambiente acuático, en que la concentración de nutrientes es más restringida, y estos mecanismos de resistencia adquieren más relevancia. No obstante, la importancia del EPS para la protección en el medioambiente se desconoce, y existen muy pocos reportes de aislamiento de variantes rugosas a partir de fuentes ambientales.

Evaluación de la susceptibilidad de las cepas en presencia de agentes estresantes

Susceptibilidad de *V. cholerae* al cloro

Se realizó el ensayo de susceptibilidad de las cepas de *Vibrio cholerae* a varias condiciones de estrés ambiental. El hipoclorito de sodio es un desinfectante de primera línea que se emplea en la potabilización de las aguas. Aunque es inestable, puede alcanzar una concentración de 2-5 ppm en el agua potable. La adquisición de morfología rugosa se ha asociado con la resistencia a diversos agentes; entre ellos, el cloro. Por ello, las cepas TLP01 y TLP05 están en desventaja con respecto a otras cepas de *V. cholerae* residentes en el medioambiente. Otro mecanismo de resistencia a estos agentes son las biopelículas. El contacto del agente con las estructuras polisacarídicas lleva a su inactivación. Por ello se estudió la susceptibilidad al cloro, de una cepa que no produce biopelículas como TLP01 y de otra que sí lo hace, la cepa TLP13. El experimento se hizo en condiciones en que se producen las biopelículas y en las que no se producen (fase planctónica, por crecimiento en agitación). El estudio se hizo a partir de la exposición de entre 10^6 y 10^7 u.f.c./mL de las cepas TLP13 y TLP01 a hipoclorito de sodio (2 ppm), durante 1; 5; 10; 20 y 30 min, y se contaron las u.f.c. que sobrevivieron tras la adición del agente en cuestión.

En condiciones de zaranda, las cepas mostraron una elevada susceptibilidad al cloro (Figura 3A): a los 5 min no se contaron células viables. Se ha descrito que el cloro es un agente estresante para *V. cholerae* [19]. En la condición planctónica, que se corresponde con la de las células libres en el medio de cultivo, no existe protección contra el agente, lo cual se evidenció en este experimento.

Sin embargo, cuando se ensayó la susceptibilidad al cloro, de las cepas en presencia de biopelículas, la cepa parental atoxigénica TLP13 mostró una alta resistencia al cloro, y se mantuvo prácticamente

22. Lizarraga-Partida ML, Méndez-Gómez E, Rivas-Montano AM, Vargas-Hernández E, Portillo-López A, González-Ramírez AR, *et al.* Association of *Vibrio cholerae* with plankton in coastal areas of Mexico. *Environ Microbiol.* 2009;11(1):201-8.

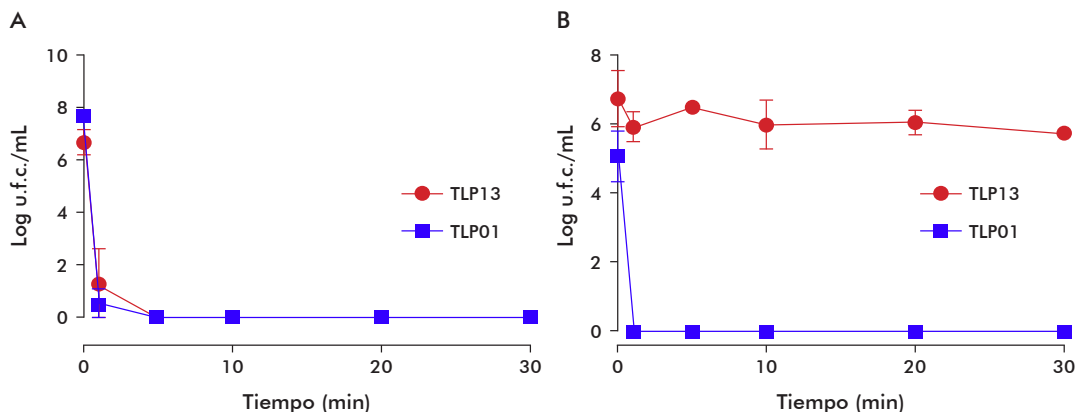


Figura 3. Evaluación de la susceptibilidad de cepas de *Vibrio cholerae* O139 al cloro. A) Experimento en condiciones de zaranda. Las cepas se crecieron durante 4 horas. B) Experimento realizado en condiciones permisivas para la producción de biopelículas. Las cepas crecieron durante 24 horas. En ambos casos se expusieron al agente entre 10^6 y 10^7 u.f.c./mL de las cepas TLP13 y TLP01, se tomaron muestras para microcuento a los tiempos 0; 1; 5; 10; 20 y 30 min. Para inactivar el cloro se empleó tiosulfato de sodio 0.015 %. La evaluación de la susceptibilidad se realizó a través del promedio del número de u.f.c. resultante de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

constante la cantidad de células viables en el tiempo (Figura 3B). A los 30 min del tratamiento se contaron alrededor de 10^5 u.f.c./mL. Por el contrario, una vez tratada la cepa TLP01 con cloro, no se detectaron colonias viables a los tiempos ensayados (Figura 3B). Los resultados se correspondieron con los de los experimentos en condiciones de zaranda.

Estos resultados confirman la relevancia de las biopelículas producidas por TLP13 en la inactivación del cloro, y permiten prever la importancia que pudieran tener estas estructuras en la supervivencia y persistencia de *V. cholerae*. En este sentido, en las cepas TLP01 y TLP05, la incapacidad de producir biopelículas pudiera afectar su comportamiento ambiental. La coexistencia en el medioambiente con otras cepas que produzcan biopelículas pudiera reducir en alguna medida el impacto de esta discapacidad.

Susceptibilidad de *V. cholerae* a SDS

La susceptibilidad de *V. cholerae* al detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) se evaluó usando concentraciones crecientes del agente estresante desde 0.05 %

hasta 1 %. En la figura 4A se observa el comportamiento típico de las cepas TLP01, TLP05 y TLP13, en un medio TSB suplementado con glucosa al 0.4 %, en ausencia de SDS, como condición de referencia del experimento. La lectura a 630 nm evidenció que no hay diferencias entre las cepas en relación con el nivel de crecimiento en las condiciones de cultivo estudiadas.

Cuando se empleó el SDS al 0.05 %, las cepas mantuvieron un nivel de crecimiento similar, de modo que la afectación no es significativa. Al emplear el detergente al 0.1 %, se evidenció el efecto estresante del SDS, aunque el crecimiento de las cepas en estudio no se inhibió completamente.

Al añadir el SDS a una mayor concentración (0.25 %), se detectó una inhibición completa del crecimiento en las cepas TLP01 y TLP05, mientras que la cepa TLP13 creció en esas condiciones (Figura 4B). Solo al emplear el SDS al 1 % se inhibió completamente el crecimiento de la cepa TLP13. Estos resultados indican que la concentración mínima inhibitoria

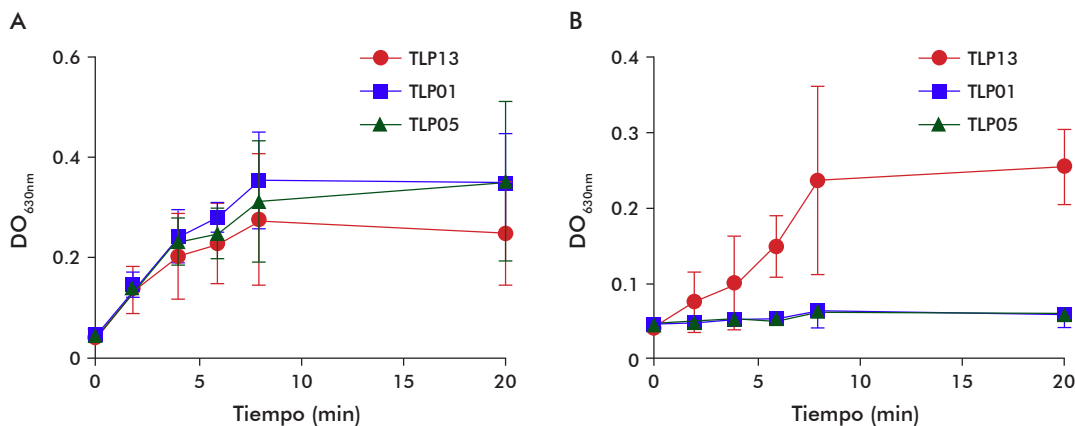


Figura 4. Evaluación de la susceptibilidad al SDS de cepas de *Vibrio cholerae* O139. A) Las cepas que se indican se crecieron en un medio TSB glucosa 0.4 % en ausencia del agente SDS (control del experimento). B) Crecimiento de las cepas en presencia de SDS 0.25 %. El ensayo se realizó en placas de poliestireno, de 24 pozos. La evaluación de la susceptibilidad se efectuó a través de la lectura de las muestras a una densidad óptica de 630 nm (DO_{630nm}) cada 2 horas, durante las primeras 10 horas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

(CMI) de SDS para las cepas TLP01 y TLP05 es cuatro veces menor que la de su parental TLP13.

Como la mayoría de las bacterias gramnegativas, *V. cholerae* regula la tasa de difusión de moléculas pequeñas a través de su membrana externa por la modulación de la producción de las porinas de membrana externa, específicamente OmpT y OmpU [23]. Como respuesta a las sales biliares, el regulador transcripcional ToxR induce positivamente la expresión de ompU, mientras que se reprime la expresión de ompT. La producción de OmpT se asocia con el aumento de la sensibilidad a la bilis [20, 24], mientras que la producción de OmpU se ha implicado en la resistencia a péptidos antimicrobianos, ácidos orgánicos y detergentes aniónicos de la bilis y el SDS [25]. Los resultados de este trabajo permiten predecir el comportamiento de estas cepas frente a otras sustancias de naturaleza parecida, como antibióticos y otros detergentes.

Al analizar por electroforesis de tipo SDS-PAGE, el patrón de proteínas de membrana externa de la cepa TLP13 se ha demostrado que se caracteriza por la presencia de una banda mayoritaria correspondiente a OmpU [26]. Las cepas que poseen el alelo salvaje de *toxR* desarrollan ese patrón. Los mutantes *toxR*, en cambio, solo producen OmpT. Sin embargo, las cepas TLP01 y TLP05 muestran niveles detectables de ambas proteínas, probablemente porque poseen alguna mutación que lleva al desarrollo de un fenotipo intermedio [26]. De acuerdo con los resultados presentados por Provenzano y Klose [24], la reducción de la resistencia a detergentes como el SDS de estas dos cepas con respecto a su parental, pudiera estar relacionada con la reducción de la expresión de la porina OmpU. Aunque no se puede descartar que otras mutaciones contribuyan de alguna manera al fenotipo encontrado en las cepas vacunales.

Osmotolerancia de las cepas de *V. cholerae*

Entre las condiciones físico-químicas que pudieran afectar el comportamiento mediambiental de *V. cholerae* se encuentra la alta salinidad [27]. Por ello se efectuó un ensayo con elevadas concentraciones de NaCl para evaluar la propiedad de las cepas TLP01, TLP05 y TLP13, de tolerar el estrés salino. Como control se empleó la cepa salvaje C7258. Al agente estresante se expusieron alrededor de 10^7 u.f.c./mL de cada cepa. Para el análisis de los resultados, las fracciones de bacterias sobrevivientes al cabo de los 15, 30 y 60 min de estrés salino, se ajustaron a una curva según el Modelo de Weibull. Este modelo se ha empleado con éxito en la evaluación de la tolerancia de las cepas de *V. cholerae* y otros microorganismos, frente a distintas situaciones de estrés [21]. Los resultados se resumen en la figura 5. En todos los casos se detectó una reducción de las células viables en el tiempo; pero al finalizar el experimento, la cantidad de u.f.c. de las cepas TLP01 y TLP05 fue dos órdenes menor que la de la cepa salvaje, lo cual resulta significativo para el estudio correspondiente.

Se compararon las constantes β de las curvas de cada cepa, mediante la prueba de Fisher. Cuando se contrastaron los resultados con la cepa salvaje C7258 y el resto de las cepas, la cepa control mostró una mayor resistencia frente a condiciones de estrés salino ($p < 0.05$). El comportamiento cóncavo de esta curva,

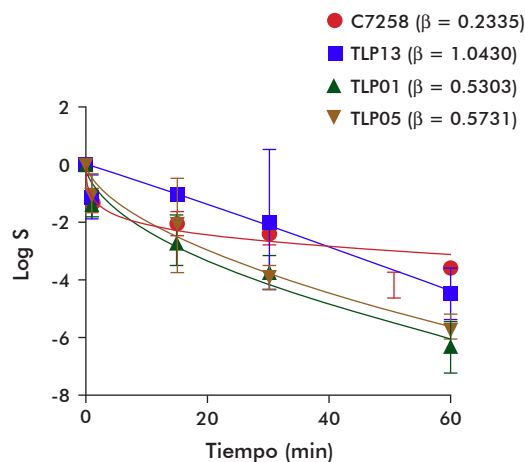


Figura 5. Evaluación de la osmotolerancia de cepas de *V. cholerae* O139. Alrededor de 10^7 u.f.c./mL de las cepas C7258, TLP01, TLP05 y TLP13 se expusieron a NaCl 2.5 M y se tomaron muestras para microcuento a los tiempos 0; 15; 30 y 60 min. La evaluación de la susceptibilidad a altas concentraciones salinas se realizó a través de un ajuste al Modelo Weibull del número de unidades formadoras de colonias por mL (u.f.c./mL) detectables a cada tiempo con respecto al número inicial de colonias ($\text{Log } S = (-1/2.3) \times (t/\alpha)^\beta$; $S = \text{u.f.c.}(t)/\text{u.f.c.}(t_0)$). Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes.

influido por el valor de β , pudiera interpretarse como una propiedad de las células de C7258 de adaptarse a condiciones de estrés salino, lo cual no es evidente en el resto de las cepas estudiadas. No hubo diferencias significativas en el comportamiento de las cepas atoxigénicas evaluadas en el experimento: TLP01, TLP05 y TLP13.

Estos resultados muestran la propiedad de osmoadaptación de las cepas candidatas a vacunas, con respecto a una cepa que no se ha manipulado en el laboratorio. En ese sentido, las evidencias indican que las cepas TLP01 y TLP05 son menos tolerantes al estrés salino que la cepa salvaje C7258. Ello es relevante teniendo en cuenta que al ser liberadas al ambiente estarían en desventaja con las cepas toxigénicas que habitan en el medio. Luego, la menor osmotolerancia contribuye igualmente a la bioseguridad de las vacunas vivas atenuadas, que pudieran contener a las cepas TLP01 o TLP05, como componente activo.

Considerando que no hubo diferencias en el comportamiento de las cepas TLP01 y TLP05 en estas condiciones, con respecto a TLP13, ello pudiera responder a una propiedad intrínseca de estas cepas o estar relacionado con alguna mutación colateral en la mutagénesis inicial, que permitió la delección de los genes de CTX ϕ . No obstante, aunque no planificada en la ingeniería de la cepa, es una característica positiva que pudiera contribuir a limitar la supervivencia de las cepas en el ambiente.

Pese a que la salinidad óptima para el crecimiento oscila entre 5 y 25 g/L, *V. cholerae* es una de las pocas especies de *Vibrio* que puede soportar una salinidad muy baja, siempre en presencia de sodio. En presencia de materia orgánica disuelta, *V. cholerae* también puede crecer en salinidades cercanas a 45 g/L. Debido a ello, esta bacteria se adapta bien a las condiciones de agua dulce y salobre de las zonas

23. Sperandio V, Bailey C, Giron JA, DiRita VJ, Silveira WD, Vettore AL, et al. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 1996;64(12):5406-9.

24. Provenzano D, Lauriano CM, Klose KE. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. J Bacteriol. 2001;183(12):3652-62.

25. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. Infect Immun. 2008;76(8):3595-605.

26. Ledón T, Ferran B, Fando R. Estudio de la funcionalidad de ToxR en cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. Rev CENIC Cienc Biol. 2011;42(1):25-28.

27. Castaneda Chavez MdL R, Pardo Sedas V, Orrantia Borunda E, Lango Reynoso F. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. Mar Pollut Bull. 2005;50(12):1641-8.

endémicas. La intrusión periódica de agua salada parece mejorar la supervivencia en esos ambientes; sin embargo, en determinadas zonas y períodos, el incremento de la salinidad lleva a reducir el número de viables [9]. En tal sentido, se debe considerar también la posibilidad de que las cepas adquieran el estado viable no cultivable. Este es un aspecto que deberá evaluarse también para las cepas vacunales.

Conclusiones

En este estudio queda demostrado que las cepas TLP01 y TLP05 poseen afectaciones en los mecanismos que regulan la producción *in vitro* de EPS y biopelículas, la osmotolerancia y la susceptibilidad a detergentes. Aun cuando se espera que estos mecanismos tengan alguna influencia en el desempeño de los vibriones en el ambiente, el impacto de estas características en esas condiciones deberá estudiarse con otros modelos experimentales. Tales resultados indican que

estas cepas poseen propiedades que limitan su comportamiento *in vitro*. En condiciones ambientales, estas características pudieran actuar como elementos de contención del agente biológico que constituya el ingrediente farmacéutico activo del candidato vacunal.

La mutación en el gen *mshA* reduce la posibilidad de readquisición de genes tóxicos en el entorno acuático. Las potenciales limitaciones en la persistencia en el ambiente, que se derivan de los resultados presentados en este trabajo, tributarán también a la bioseguridad de la vacuna. En este sentido, un pobre desempeño ambiental puede reducir el impacto que pudiera tener la readquisición de genes tóxicos en el entorno intestinal o en el propio ambiente. Es que sería poco probable que en un ambiente competitivo, estas cepas pudieran alcanzar niveles tales como para contribuir de manera significativa a la diseminación de los genes de *ctxAB* o provocar cólera en un individuo.

Recibido en septiembre de 2013.

Aprobado en abril de 2014.

In vitro modeling of the environmental performance of attenuated strains of *Vibrio cholerae* O139

✉ Talena Ledón, Daneylis D Hernández, Karen Marrero, Rafael Fando

Departamento de Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas,
Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC
Ave. 25 y 158, CP 10600, Playa, La Habana, Cuba
✉ talena.ledon@cnic.edu.cu

ABSTRACT

Vibrio cholerae, serogroups O1 and O139, is the causative agent of cholera diarrheal disease. Much of the research aimed to develop oral cholera vaccines is directed to the production of live attenuated strains, such as the *V. cholerae* O139 TLP01 and TLP05 strains. These two strains lack CTX ϕ prophage genes and do not produce the hemagglutinin protease, a relevant pathogenesis factor, and the mannose-sensitive hemagglutinin fimbria, which could play an important role in the environmental behavior. In this work, different *in vitro* models were used to study the potential environmental performance of these two strains. Their ability to produce different types of biofilms, to acquire rugose phenotype and to resist different environmental stress conditions such as the presence of chlorine, detergents or high salt concentrations, were assessed. Significantly, the TLP01 and TLP05 strains displayed characteristics that limit their *in vitro* survival under different stress conditions, with respect to controls and wild-type strains. Such behavior under harsh environmental settings may limit their survival and act for their containment while using them as active ingredients for the development of a cholera vaccine candidate.

Keywords: cholera vaccine, *Vibrio cholerae* O139, attenuated strains, environmental persistence

Biotecnología Aplicada 2014;31:129-135

RESUMEN

Modelación *in vitro* del comportamiento ambiental de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. El cólera es una enfermedad diarreica producida por la infección con la bacteria *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139. Muchas de las investigaciones para el desarrollo de vacunas orales contra esta enfermedad se dedican a la producción de cepas vivas atenuadas. TLP01 y TLP05 son cepas atenuadas del serogrupo O139, que carecen de los genes del profago CTX ϕ ; además, no producen la hemaglutinina proteasa, importante factor de la patogénesis; ni la fimbria hemaglutinina sensible a manosa, la cual pudiera ser importante en el comportamiento de las cepas vacunales en el ambiente. En este artículo se describe el posible comportamiento ambiental de estas cepas, a partir del estudio *in vitro* de sus propiedades para producir varios tipos de biopelículas, de adquirir el fenotipo rugoso y de resistir varias condiciones de estrés ambiental, como la presencia de hipoclorito de sodio, de detergentes o altas concentraciones salinas. Los resultados evidencian que las cepas TLP01 y TLP05 poseen características que limitan su supervivencia *in vitro* frente a distintas condiciones de estrés, con respecto a cepas controles y salvajes. En el entorno ambiental, estas características pudieran limitar su supervivencia y actuar como elementos de contención del agente biológico que se use como ingrediente farmacéutico activo del candidato vacunal.

Palabras clave: vacuna de cólera, *Vibrio cholerae* O139, cepas atenuadas, persistencia ambiental

Introduction

Cholera is a diarrheic disease caused by the infection of the *Vibrio cholerae* bacterium. Symptoms are produced by its toxin, known as cholera toxin (CT), which is secreted in the small intestine. Only *V. cholerae* serogroups O1 and O139 display epidemic potential, with no crossprotection against both serogroups due to differences in their somatic components [1].

The disease is characterized by sudden outbreaks of fast spread, with health systems commonly collapsing when facing the outbreaks, particularly in underdeveloped countries. Prevention measures are recommended, such as guaranteeing drinking water sources and their permanent sanitation, real challenges under economic constraints [2]. Therefore, a successful vaccine has been considered advantageous for prevention. One of the leading strategies in the field of cholera vaccination is focused on obtaining a live-attenuated *V. cholerae* strain, which could be administered by the oral route to stimulate the mucosal immune system in a fashion similar to that of wild-type bacterial strains. This could lead

to the development of promising vaccine candidates able to mimic the events of the natural infection [3].

The use of that vaccine strategy implies concerns on the reacquisition by engineered strains of toxin genes from wild-type strains. In fact, the CT coding genes are carried by the CTX ϕ filamentous phage genome [4]. In this sense, the probabilities for virulence reversion by phage infection would be limited mainly to conditions promoting bacterial expression of the phage receptor, mainly at the intestines. There are other vibriophages: VGJ ϕ , VEJ ϕ , KSF- ϕ , VSK, VSKK and fs2, which could display advantages over CTX ϕ to transmit the CT coding genes between strains in the natural ecosystems [5-7]. These phages use the mannose-sensitive hemagglutinin fimbria, which is expressed in watery environments and may be involved in the transmission of the toxin genes by hybrid CTX ϕ phages through a specialized transduction mechanism.

In this line of development for vaccine purposes, two live-attenuated *V. cholerae* strains were recently

1. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Ahmad QS, Faruque AS, Salam MA, et al. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1116-22.
2. Bishop AL, Camilli A. *Vibrio cholerae*: lessons for mucosal vaccine design. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(1):79-94.
3. Lopez AL, Clemens JD, Deen J, Jodar L. Cholera vaccines for the developing world. *Hum Vaccin.* 2008;4(2):165-9.
4. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996;272(5270):1910-4.
5. Campos J, Martinez E, Marrero K, Silva Y, Rodriguez BL, Suzarte E, et al. Novel type of specialized transduction for CTX phage or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2003;185(24):7231-40.

obtained at the National Center for Scientific Research (CNIC), in Cuba, based on serogroup O139 and named TLP01 and TLP05. They were generated by deletion of CTX ϕ prophage and CT *ctxAB* genes, followed by the replacement of the *hapA* gene encoding for the protease hemagglutinin by an inactivated version. This last bears an inserted DNA fragment coding for the endoglucanase A from the bacterium *Clostridium thermocellum*, used for easy selection of the engineered strains. Additionally, the *mshA* gene was replaced by a mutated allele to prevent the production of the MSHA fimbria. This aborts the infection by the CT gene-carrying hybrid phages using fimbria as receptor and reduces the probabilities for CT genes reacquisition through this mechanism [8].

As evidenced so far, the incidence of cholera outbreaks is closely related to environmental and ecological factors which are subsequently controlled by large-scale climate changes [9, 10]. Microorganism persistence fundamentally depends on its ability to adapt and develop survival strategies, among them: biofilm formation, rugose phenotype acquisition or reaching the viable non-culturable state [11]. In fact, *V. cholerae* commonly grow forming biofilms on either biotic or abiotic surfaces [12]. Those biofilms provide a micro-environment probably favoring microorganism survival and persistence for long interepidemic periods, by supporting the establishment of positive metabolic transactions with other bacterial community members. Besides, biofilms confer protection against several stressing and predatory environmental agents [13].

V. cholerae biofilm formation depends on the synthesis of an exopolysaccharide (EPS) coded by a set of genes located in the *vps* polysaccharide operon. Strains O1 El Tor and O139 additionally depend on flagellar motility for biofilm production, and O1 El Tor strains further require the production of the MSHA fimbria [14, 15]. The acquisition of the rugose phenotype is also included among the attributes needed to produce EPS [16].

There are also reports on *V. cholerae* development of other types of biofilms, independent of *vps* genes, in a seawater model. They required Ca²⁺ ions instead of the *vps* genes monosaccharides [17].

However, if the mentioned above TLP01 and TLP05 strains of *V. cholerae* serogroup O139 would be used as active pharmaceutical ingredients for vaccine development, it is expected that vaccinees will excrete these strains in the feces. Therefore, it would be necessary to evaluate or to model the environmental impact of their release.

For that purpose, this work was aimed to model the environmental performance of the *V. cholerae* TLP01 and TLP05 vaccine strains. Their abilities to produce different types of biofilms, to acquire the rugose phenotype and persist under stressing environmental conditions (sodium hypochlorite, detergents or high salt concentrations) were evaluated *in vitro*.

Materials and methods

Materials

Strains

The *V. cholerae* strains used in this study were: C7258, wild-type; TLP01 and TLP05, mutant strains to the

mshA gene; TLP03, an isogenic strain; and TLP13 atoxigenic parental strain (Table). The last two strains were used as assay controls.

Culture media

The culture media were TSB (17 g/L tryptone, 3 g/L peptone, 2.5 g/L K₂HPO₄, 5 g/L NaCl) supplemented at 0.4 % glucose; simulated seawater (27.3 g/L NaCl, 13.6 g/L Mg₂SO₄, 1.5 g/L CaCl₂, 0.8 g/L KCl, 0.3 g/L NaHCO₃, 0.005 g/L Na₂B₄O₇, 0.001 g/L LiCl), adjusted to pH 7.0 and supplemented with casein hydrolysate at 1 %; and peptone alkaline water (10 g/L peptone, 10 g/L NaCl; pH 8.5).

Methods

Assessment of biofilm formation ability

The ability of *V. cholerae* strains to produce biofilms was assessed in TSB medium supplemented with glucose and simulated seawater [17]. The assay was conducted in 96-well polystyrene plates, starting from a 1:100 dilution of fresh cultures at exponential phase with similar optical densities at 600 nm (OD_{600nm}). This avoided the presence of autoinducers in the inoculums which may interfere in biofilm formation. Wells containing uninoculated culture media were used as baseline controls [18]. The strains TLP01, TLP03, TLP05 and TLP13 were tested, and the experiments were run in triplicate. The plates were incubated at 37 °C for 24, 48 or 72 h, and culture homogeneity was checked at each time point by determining OD_{600nm} in a microplate reader (Multiscan, Finland). After three successive washes in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 9.58 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄; pH 7.2), plates were stained with 1 % safranin solution (prepared in 33 % acetic acid), and biofilm OD_{490nm} of biofilms was measured in the same microplate reader.

Induction of the rugose phenotype

Alkaline peptone water 5-mL samples were inoculated with 5 μ L of fresh cultures of strains TLP01, TLP05 or TLP13, and incubated at 37 °C for 30 days. Serial dilutions were made on preset time points and strains were plated in LB-agar medium (10 g/L tryptone; 10 g/L NaCl; 5 g/L yeast extract, pH 7.0, plus 15 g/L bacto agar). Strain morphology was observed and classified as rugose or flat, also describing any other variation if present [19].

Table. *Vibrio cholerae* strains tested for environmental performance under in vitro-modeled conditions*

Strains	Description
C7258	Wild-type, serogroup O1, biotype El Tor, serotype Ogawa
TLP01	Mutant Δ CTX ϕ , <i>hapA::celA</i> , Δ <i>mshA</i> derived from the <i>V. cholerae</i> TLP13 strain, serogroup O139, motile
TLP03	Mutant Δ CTX ϕ , <i>hapA::celA</i> , Δ <i>mshA</i> derived from the <i>V. cholerae</i> TLP13 strain, serogroup O139, motile
TLP05	Mutant Δ CTX ϕ , <i>hapA::celA</i> , Δ <i>mshA</i> derived from the <i>V. cholerae</i> O139 TLP13 strain, serogroup O139, non-motile
TLP13	Mutant Δ CTX ϕ derived from the <i>V. cholerae</i> CRC266 strain, serogroup O139

* The strain C7258 was isolated in Peru, in 1991. The other strains were described in reference [8].

6. Campos J, Martinez E, Izquierdo Y, Fando R. VEJphi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. Microbiology. 2010; 156(Pt 1):108-15.

7. Das B, Bischerou J, Barre FX. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. Indian J Med Res. 2011;133: 195-200.

8. Ledón T, Ferran B, Perez C, Suzarte E, Vichi J, Marrero K, et al. TLP01, an *mshA* mutant of *Vibrio cholerae* O139 as vaccine candidate against cholera. Microbes Infect. 2012;14(11):968-78.

9. Lipp EK, Huq A, Colwell RR. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(4):757-70.

10. Huq A, Sack RB, Nizam A, Longini IM, Nair GB, Ali A, et al. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4645-54.

11. Kamruzzaman M, Udden SM, Cameron DE, Calderwood SB, Nair GB, Mekalanos JJ, et al. Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(4):1588-93.

12. Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. Appl Environ Microbiol. 2001;67(7):3220-5.

13. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev. 2002;26(2):125-39.

14. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol Microbiol. 1999;34(3):586-95.

15. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol Microbiol. 2001;39(2):223-35.

16. Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(7):4028-33.

17. Kierek K, Watnick PI. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(24):14357-62.

Assessment of strain sensitivity to stressing agents

The sensitivity of strains TLP01, TLP05 and TLP13 was tested under stressing environmental conditions, comprising the presence of sodium hypochlorite, sodium dodecyl sulfate (SDS) and high salt concentration.

Sensitivity to sodium hypochlorite

The survival of *V. cholerae* strains TLP01 and TLP13 to sodium hypochlorite concentrations was tested under conditions favoring or not biofilm formation [19]. First, strains were grown in capped borosilicate flasks filled with 3 mL of TSB medium supplemented at 0.4 % glucose, and incubated at 30 °C for 24 h. Subsequently, planktonic cultures of each strain were checked for homogeneity in an spectrophotometer for OD_{630nm}. The planktonic content was discarded and aggregated cells were resuspended in 5 mL of PBS. Biofilms were disaggregated by adding 1 g of glass pearls to each flask followed by vortexing. Samples were taken for microcounting by serial dilutions, prior to the addition of the stressing agent. Then, NaOCl was added up to 2 ppm and incubated for 1, 5, 10, 20 or 30 min. Subsequently, the stressing agent was inactivated on the given samples by adding sodium thiosulfate at 0.015 %, viable cells were counted, and adequate amounts of each dilution plated in LB and further incubated at 37 °C for 20-22 h.

Strains were also cultured under shaking to avoid biofilm formation, in test tubes filled with TSB medium supplemented with glucose at 0.4 %, at 37 °C for 4 h. Approximately 10⁷ colony-forming units (c.f.u.) of each culture were subjected to the action of the previously mentioned NaOCl concentrations and their sensitivity to the agent was assessed as previously described.

Sensitivity to SDS

Strains TLP01, TLP05 and TLP13 were tested for sensitivity to sodium dodecyl sulfate (SDS), starting from cultures in a 24-well polystyrene plate containing TSB medium supplemented with glucose at 0.4 %, which were inoculated from 1:100 dilutions. A well containing uninoculated culture medium was used as baseline control. SDS 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 % concentrations were tested [20]. The growth of each strain in the absence of the agent was also tested. The plate was read every 2 h at 630 nm. The experiment was done in duplicate.

Sensitivity to NaCl concentrations

For strains C7258, TLP01, TLP05 and TLP13, two colonies were isolated and TLP13, and further grown with agitation for 6 h. Afterwards, 1 mL of each bacterial culture was centrifuged and cells were resuspended in 1 mL of TSB medium supplemented at 2.5 M NaCl. After incubation for 0, 15, 30 and 60 min, 100 µL were taken for microcounting from each test sample. Serial dilutions were made from each and plated on LB medium, being further incubated at 37 °C for 20-22 h. The results were analyzed by adjusting the fractions of bacteria surviving to salt stress to a curve, according to the Weibull model (a statistic distribution model of inactivation time points) [21]:

$$\text{Log } S = \alpha \frac{1}{2.3} \times \left(\frac{t}{\alpha} \right)^{\beta}$$

Where:

S: fraction of viable bacteria at each time point, in respect to the amount at the start of the experiment; calculated following the expression:

$$S = \frac{\text{c.f.u. (t)}}{\text{c.f.u. (t}_0\text{)}}$$

t: the period that the system is under the stress tested (salt stress);

α: scale parameter; depends on the evaluated component (osmolarity);

β: shape parameter; related to the curve shape and the resistance ability to the stress applied (salt stress).

Statistical analysis

Data were statistically analyzed with the Prisma for Windows statistical package, version 4.0. The statistical significance was set to 0.05 % for all the comparisons. Means were compared by the Student's t test as indicated for each case in the Results and discussion section.

Results and discussion

Biofilm formation ability

The ability of *V. cholerae* TLP strains to form biofilms was assessed, under conditions promoting them or not depending on EPS production (*vps*-dependent or *vps*-independent biofilms). Studies were run in rich medium and simulated seawater, respectively. The ability was inferred from the quantification of the EPS produced by each strain, due to the tight relationship between these processes [14, 15].

In the absence of EPS, bacteria only formed a monolayer on the culture surface [14]. Similarly, in the presence of any other mutation blocking biofilm formation, the strain produces undetectable EPS amounts, according to the test method used.

Quantification of *vps*-dependent biofilms

V. cholerae forms dense biofilms composed of bacterial columns surrounded by water channels in rich culture media such as LB or TSB [15]. These media provide the ideal conditions *in vitro* to promote *vps*-dependent biofilm production.

In TSB medium supplemented with glucose, only the TLP03 and TLP13 strains produced detectable EPS amounts within the first 24 h, supporting the assumption that they do produce biofilms. A halo was detected in the air-liquid interphase, characteristic of those tridimensional structures. Nevertheless, strains TLP01 and TLP05 did not produced detectable EPS (Figure 1). Such evidences indicate that, even when strains TLP03 and TLP13 generate biofilms under the conditions tested, this ability was significantly reduced for TLP03 (an *mshA* mutant) compared to the atoxigenic parental strain TLP13, at least after 24 and 48 h of culture (Student's t test, *p* = 0.018 and *p* = 0.0134, respectively). The absence of biofilms for the TLP05 strain could be related to its non-motile phenotype. This strain carries a random mutation unrelated to its engineering process which abrogates motility, although

18. Yildiz FH, Dolganov NA, Schoolnik GK. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol.* 2001;183(5):1716-26.

19. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata SI, Yoshida SI. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(10):3648-55.

20. Provenzano D, Klose KE. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(18):10220-4.

21. Van Boekel MAJS. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *J Food Microbiol.* 2002;74(1-2):139-59.

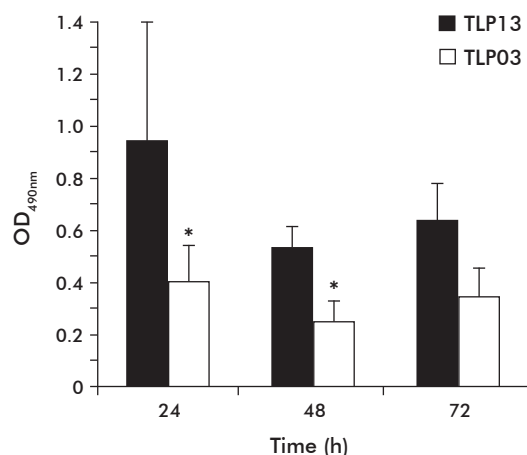


Figure 1. Quantification of *vps*-dependent *Vibrio cholerae* biofilms. The assay was run in TSB broth supplemented at 0.4 % glucose. Biofilms were quantified as the mean optical density at 490 nm ($OD_{490\text{ nm}}$) from three independent experiments. Cut-off value ($0.1 OD_{490\text{ nm}}$) was calculated as twice the OD value of the uninoculated culture medium. Strains TLP01 and TLP05 did not reach the cut-off (not shown). Error bars stand for standard deviation. The asterisk represents significant differences against the parental strain TLP13 (Student's *t* test, $p < 0.05$).

its flagellum was present as corroborated by electron microscopy [8]. Flagellar movement influences biofilm formation in *V. cholerae* O139, as reported by Watnick *et al.* [15]. This process is particularly relevant at starting the monolayer.

The results indicated that a spontaneous mutation had to occur in the TLP01 mutant interfering on the formation of these structures. It is unrelated to the *mshA* mutation, since the evidences suggest that the isogenic TLP03 mutant could establish the tridimensional polysaccharide structure.

Quantification of *vps*-independent biofilms

In seawater, *V. cholerae* forms calcium-dependent biofilms instead on *vps* genes. This element directly mediates cell-to-cell or cell-surface interactions in bacterial biofilms [17]. Hence, a seawater model obtained in the laboratory [17] was chosen to quantify *vps*-independent biofilm production. As established from readouts at 600 nm, strains TLP01, TLP03, TLP05 and TLP13 similarly produced biofilms under the tested culture conditions (Figure 2).

In contrast to TSB medium results, all the strains were able to produce biofilms in seawater. There are reports describing that MSHA is required but unessential for the calcium-dependent biofilm formation and that *mshA* mutants establish weaker cell-to-cell interactions and thinner biofilms [17]. Our results are in agreement with those reported, since *mshA* mutants showed reduced biofilm formation compared to the parental TLP13 strain (Figure 2).

Regarding motility, under sugar deficitary conditions and in the presence of calcium, the flagellum could become a signal inducing biofilm formation. According to Kierek and Watnick [17], the flagellum is also required to structure calcium-dependent structures, but with an effect not as relevant as in the case of the equivalent mutation for *vps*-dependent biofilms. The results obtained for the TLP05 strain also confirms

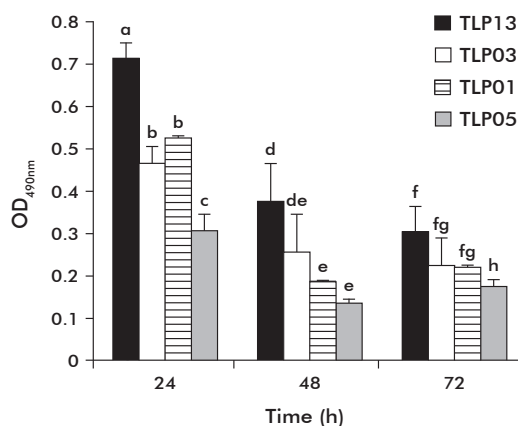


Figure 2. Quantification of *vps*-dependent *Vibrio cholerae* biofilms. The assay was run in TSB broth supplemented at 0.4 % glucose. Biofilms were quantified as the mean optical density at 490 nm ($OD_{490\text{ nm}}$) from three independent experiments. Cut-off value ($0.1 OD_{490\text{ nm}}$) was calculated as twice the OD value of the uninoculated culture medium. Strains TLP01 and TLP05 did not reach the cut-off (not shown). Error bars stand for standard deviation. The asterisk represents significant differences against the parental strain TLP13 (Student's *t* test, $p < 0.05$). Different letters in the same time point represent significant differences, as determined by one-tailed Anova (Tuckey's *a posteriori* test, $p < 0.05$).

those previous reports. During the experiment, TLP05 generated biofilms at levels below those of the TLP01 and TLP03 mutants, at least after 24 h (One-tailed Anova, $p < 0.05$; Tuckey's *a posteriori* test, $p < 0.05$). Hence, the TLP05 strain could be less prone to produce biofilms due to the *mshA* gene mutation and its non-motile phenotype.

These results indicate that TLP01 and TLP05 strains produce *vps*-independent biofilms; though, at levels below those of the parental strain. Accordingly, under the studied conditions, these two mutants do not bear any phenotype-related competitive advantage for environmental persistence. This type of biofilms requires millimolar calcium concentrations, absent in fluvial environments but found in seawater [22]. Such calcium dependence determines that *vps*-independent biofilms could be more relevant in marine ecosystems than in lacustrine and briny ones.

On the other hand, biofilm formation is required to reach the viable non-culturable state [11]. In this sense, the inability of the TLP01 and TLP05 mutants to produce biofilms could lead to their decreased survival and make them disadvantageous in natural environments which are far more complex than conditions modeled in this study. Thus, a different behavior cannot be ruled out in natural environments, although such non-biofilm producer phenotype could be a containment element contributing to the biosafety of the live-attenuated vaccines having those strains as active pharmaceutical ingredients. Other experiments must be run, including competition assays with wild strains, in order to evaluate other types of interactions in a scenario closer to the natural environments.

Induction of the rugose phenotype

The *V. cholera* rugose phenotype is a bacterial survival and environmental persistence mechanism. This morphological change makes it highly resistant

22. Lizarraga-Partida ML, Méndez-Gómez E, Rivas-Montano AM, Vargas-Hernández E, Portillo-López A, González-Ramírez AR, *et al.* Association of *Vibrio cholerae* with plankton in coastal areas of Mexico. *Environ Microbiol.* 2009;11(1):201-8.

to agents as chlorine, hydrogen peroxide and other oxidative or osmotic stresses [19]. Previous studies demonstrated that the rugose phenotype is related to EPS production, which promotes biofilms structuring [16]. Keeping this in mind, the development of rugose phenotype was evaluated for TLP01 and TLP05 mutants compared to the TLP13 parental strain, by incubation in alkaline peptone water at 37 °C for 30 days. It was shown that the atoxigenic parental strain TLP13 started the rugose phenotype on day 8. Meanwhile, from day 13 on, the TLP01 strain developed opaque colonies with a corolla in the center but not the typical rugose phenotype. The TLP05 mutant kept the flat phenotype during the entire experiment.

These results confirmed that TLP01 and TLP05 had lost the ability to develop rugose colonies and, therefore, biofilms *in vitro*, this ability intact in its parental TLP13 strain. These two phenotypes depend on EPS production, indicating that TLP01 and TLP05 mutants have their *vps*-dependent EPS production mechanism affected at certain point not engineered during their genetic construction. Such a dysfunction would explain both, their inability to develop the rugose phenotype and the tridimensional structuring of biofilms.

Those properties would make TLP01 and TLP05 more vulnerable to environmental stressing conditions, affecting their persistence in aquatic ecosystems where nutrients are far restricted and resistance mechanisms required. Nevertheless, the relevance of EPS for environmental persistence is debatable since there are no reports on rugose isolates from environmental niches.

Assessment of strain sensitivity to stressing agents

Sensitivity to chloride

Sodium hypochlorite is a first-choice disinfectant for drinking water regardless its instability, being used at concentrations ranging 2-5 ppm. It has been reported to induce the rugose phenotype in *V. cholerae*, as for other agents. This also supports the environmental disadvantage of TLP01 and TLP05 compared to other natural strains. At the same time, biofilm formation

arises as another resistance mechanism, with the agent inactivated after getting into contact with polysaccharide structures. Therefore, resistance to chloride was studied in the TLP01 and TLP13 strains which produce or not biofilms. The experiment was run under conditions favoring or not biofilm formation (planktonic or shaken cultures, respectively), by exposure of 10^6 - 10^7 c.f.u./mL to 2 ppm for 1, 5, 10, 20 and 30 min, and surviving c.f.u. were counted.

Strains grown under shaking had increased chloride sensitivity (Figure 3A), with no viable cells after 5 min of exposure. It has been described that chloride is a stress agent for *V. cholerae* [19]. The planktonic culture characterized by free cells in the medium provides no protection against the agent, as evidenced in the experiment. On the contrary, the atoxigenic parental strain TLP13 was highly resistant when biofilms were present, with steady viable cell counts over time (Figure 3B). There were about 10^7 c.f.u./mL after a 30-min exposure, opposed to the lack of viable cells at any time for the TLP01 strain (Figure 3B). These results were in agreement with those of cultures under shaking.

Our findings confirm the relevance of TLP13 biofilms in chloride inactivation and allow to foresee the relevance these structures would play in *V. cholerae* survival and persistence. In spite of the environmental disadvantage of strains TLP01 and TLP05, their coexistence with other strains able to produce such structures could mitigate their limitations.

Sensitivity to SDS

The sensitivity of *V. cholerae* to SDS at concentrations ranging 0.05-1.0 % was investigated. The typical performance of strains TLP01, TLP05 and TLP13 in TSB medium supplemented with glucose at 0.4 % in the absence of SDS was set as reference condition for the experiment (Figure 4A). There were no differences in the growth rate among the three strains, as evidenced by spectrophotometric determinations at 630 nm.

When SDS was tested, at 0.05 % cultures grew similarly for all the strains, with no significant delays. The stressing effect of SDS manifested at 0.1 %

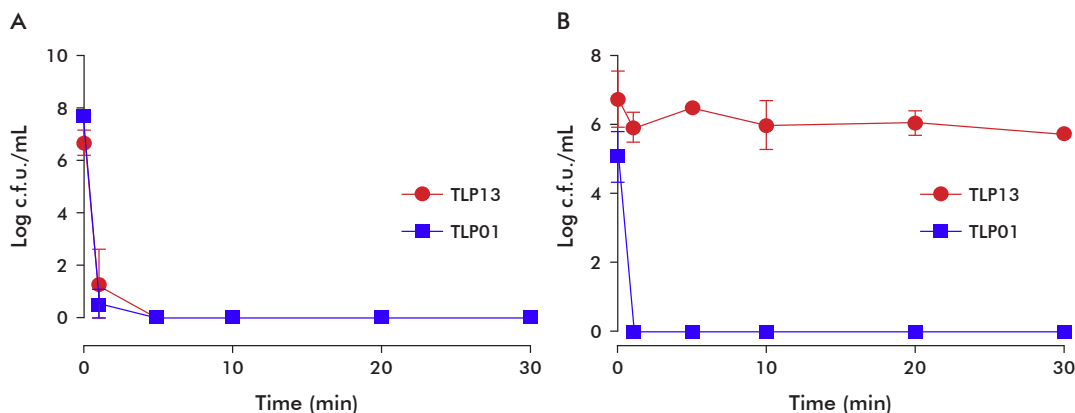


Figure 3. Evaluation of *V. cholerae* O139 strains sensitivity to chloride. A) Cultures grown under shaking. Strains were grown for 4 h at 37 °C. B) Cultures grown under conditions promoting biofilm formation, for 24 h. In both cases, 10^6 - 10^7 c.f.u./mL of strains TLP01 and TLP13 were exposed to the agents, and samples were taken for microcounting after 0, 1, 5, 10, 20 and 30 min of exposure. Chloride was inactivated by adding 0.015 % sodium thiosulfate. Sensitivity was calculated as the average viable c.f.u. from three independent experiments. Error bars represent the standard deviations.

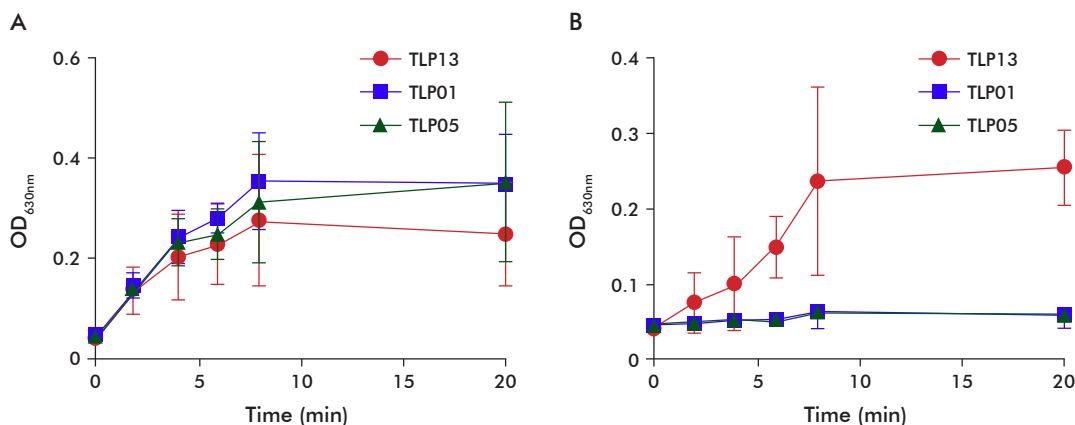


Figure 4. Evaluation of *V. cholerae* O139 strains sensitivity to SDS. Strains TLP01, TLP05 and TLP13 were grown in TSB medium supplemented with glucose at 0.4 % in the absence of SDS (baseline control of the experiment). B) Growth under 0.25 % SDS. The experiment was run in 24-well polystyrene plates, and the optical density of the samples was determined at 630 nm (OD_{630nm}) every 2 h for the first 10 h of exposure. Error bars correspond to the standard deviation of two independent experiments.

concentrations although growth was not completely inhibited. The growth of mutant strains TLP01 and TLP05 stopped at 0.25 %, with strain TLP13 still growing under those conditions and only stopped at 1.0 % SDS (Figure 4B). These results indicate that the SDS minimal inhibitory concentration is four times lower for TLP01 and TLP05 than that of the parental TLP13.

As most of gram-negative bacteria do, *V. cholerae* regulates the diffusion rate of small molecules through its external membrane by modulating the synthesis of external membrane porins, specifically OmpT and OmpU [23]. In response to bile salts, the transcriptional regulator ToxR positively induces the expression of *OmpU*, while suppressing that of *ompT*. The production of OmpT is associated to the increase in bacterial bile sensitivity [20, 24], while the OmpU production has been implicated in resistance to antimicrobial peptides, organic acids and anionic bile detergents and SDS [25]. Altogether, these results allow predicting the performance of the strains tested, in the presence of other agents of similar nature such as antibiotics and other types of detergents.

It has been previously described a major OmpU band in the SDS-PAGE electrophoretic pattern of external membrane proteins of the TLP13 wild type strain [26]. This pattern is characteristic of strains carrying the *toxR* wild-type allele. On the contrary, the *toxR* mutants only produce OmpT. Curiously, the TLP01 and TLP05 mutants show detectable levels of both proteins, indicative of an intermediate phenotype probably caused by a mutation [26]. According to the results of Provenzano and Klose [24], the reduced resistance to detergents as SDS in these two mutant strains may be related to a lower expression of the OmpU porin. Otherwise, the effect that other mutations could exert in these vaccine strains cannot be ruled out.

Osmotolerance

High salinity is among the harsh physicochemical conditions that could affect the environmental performance of *V. cholerae* [27]. Hence, a test was run to evaluate the effect of high NaCl concentrations on

the outcome of the TLP01, TLP05 and TLP13 strains. The wild-type C7258 strain was used as control. Approximately 10⁷ c.f.u./mL of each strain was subjected to the effect of the stressing agent. Results were analyzed by adjusting bacterial fractions, which survived after 15, 30 or 60 min of exposure to NaCl, to a curve according to the Weibull model. That model has been successfully used to evaluate tolerance of different microorganism's populations against stressing agents [21]. Results are summarized in figure 5. Viable cell counts declined over time for all the strains, with TLP01 and TLP05 c.f.u. counts two orders below those of the wild strain, very significant for the study.

The β constant values for each strain curves were compared by the Fisher's test. As shown by comparing the control strain C7258 results to those of the other strains, it displayed a higher resistance to salinity

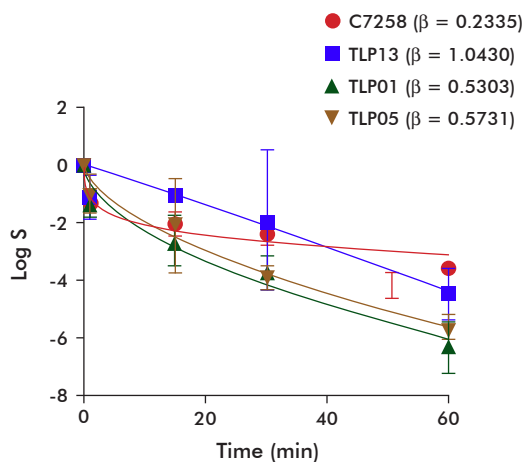


Figure 5. Evaluation of *V. cholerae* O139 osmotolerance. Approximately 10⁷ c.f.u./mL of strains C7258, TLP01, TLP03, TLP05 and TLP13 were exposed to 2.5 M NaCl and samples were taken from each for microcounting after 0, 15, 30 and 30 min of exposure. Strain sensitivity to the high salt concentrations was determined by adjusting each incubation time point c.f.u./mL value to that on time 0, according to a Weibull model ($\text{Log } S = (-1/2.3) \times (t/\alpha)^\beta$; $S = \text{c.f.u.}(t)/\text{c.f.u.}(t_0)$). Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

23. Sperandio V, Bailey C, Giron JA, DiRita VJ, Silveira WD, Vettore AL, et al. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 1996;64(12): 5406-9.

24. Provenzano D, Lauriano CM, Klose KE. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. J Bacteriol. 2001;183(12):3652-62.

25. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. Infect Immun. 2008;76(8): 3595-605.

($p < 0.05$). The concave shape of its curve, influenced by its β value, could allow us to infer that C7258 cells have the ability to adapt to high salt concentrations, an effect absent for the other strains tested. There were no significant differences in the performance of the atoxigenic TLP01, TLP05 and TLP13 strains.

These results point towards osmoadaptation properties of the candidate vaccine strains, compared to a non-engineered strain. In this sense, TLP01 and TLP05 appear to be less tolerant to salt stress than the wild-type strain C7258. This is relevant considering that once released to the environment, they would be disfavored in respect to the natural toxigenic strains. At the same time, their reduced osmotolerance equally contributes to its biosafety when used as live-attenuated vaccines. Since there were no significant differences in the performance of TLP01 and TLP05 compared to TLP13 under the assayed conditions, this could indicate an intrinsic property of the two strains, or be related to a single collateral unexpected mutation, which appeared during the initial CTX ϕ genes deletion event. In spite of being fortuitous, the resulting effect provides a positive property to these mutants which may contribute to limit their environmental survival.

Noteworthy, *V. cholerae* is one of the few *Vibrio* species successfully performing under low osmolarity conditions, always in the presence of sodium, in spite of its optimal salinity ranging 5-25 g/L. It could also grow in dissolved organic material at salinity concentrations near 45 g/L. Therefore, this bacterium adapts well to freshwater and briny waters in endemic areas. The periodical intrusion of salt water seems to

increase *Vibrio* survival in those environments, but in certain areas and for given periods the increase in salinity tends to reduce the viable cell counts [9]. In this sense, the strains acquiring the viable non-culturable state should be also considered. This last aspect remains to be evaluated in vaccine strains.

Conclusions

Here we demonstrate that strains TLP01 and TLP05 had limitations in the mechanisms that regulate biofilm and EPS formation *in vitro*, osmotolerance and susceptibility to detergents. The impact of these properties under other experimental conditions near those of the natural ecosystems should be further studied, in spite of these mechanisms being expected to influence the vibrios environmental performance to certain extent. The results indicate that these two strains have properties which limit their behavior *in vitro*. And such properties could act as containment for the biological agent used as active pharmaceutical ingredient for a vaccine candidate.

The *mshA* gene mutation also reduces the possibility to reacquire toxin genes in watery environments. The potential environmental persistence limitations coming from the results presented will contribute to increase vaccine biosafety. In this sense, a poor environmental performance could reduce the impact that the reacquisition of the toxin genes would have during human infection or for the environment. It seems to be quite improbable that these two strains could achieve bacterial population levels under competitive scenarios, enough to significantly contribute to disseminate the *ctxAB* genes or to affect humans.

26. Ledón T, Ferran B, Fando R. Estudio de la funcionalidad de ToxR en cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. Rev CENIC Cienc Biol. 2011;42(1):25-28.

27. Castaneda Chavez Mdel R, Pardo S, Sadas V, Orrantia Borunda E, Lango Reynoso F. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. Mar Pollut Bull. 2005;50(12):1641-8.

Received in September, 2013.

Accepted in April, 2014.