

00551  
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

289223

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A VALORES BAJOS DE pH  
DE CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli*  
AISLADAS DE POZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

MARIA CLEMENTINA CUETO VIGIL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE



MEXICO. D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Alejandro Cravioto Quintana  
**VOCAL:** Dr. Carlos Eslava Campos  
**SECRETARIO:** Dr. Edmundo Calva Mercado  
**SUPLENTE:** Dra. Yolanda López Vidal  
**SUPLENTE:** Dra. Amelia Farrés González-Saravia

**SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO**

Laboratorio Mo. 324 del Conjunto "E" de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**FINANCIACION**

Beca de ALFA Network, coordinada por la Universidad de Reading, contrato UE No. ALR/B7-3011/94.04/5.0130.9.

Fondo Patrimonial de la Universidad de La Sabana, Bogotá Colombia.

## AGRADECIMIENTOS

A Carmen Wachter por la orientación del proyecto de investigación, dirección de la tesis y el cálido apoyo brindado en todo momento desde mi llegada a México.

A mi Comité Tutoral integrado por los Doctores Carmen Wachter, Carlos Eslava y Francisco Ruiz, por las sugerencias y estímulos a lo largo del trabajo.

Al Dr. Carlos Eslava por las facilidades para la realización de parte del trabajo en el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina y su permanente colaboración personal.

A Rocío Santillana por su apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio y su ayuda en la elaboración del análisis estadístico.

A Delia Licona, Irma Cañedo y José Luis Méndez, que compartieron conmigo sus conocimientos para la serotipificación y obtención de proteínas de membrana externa, utilizados en este trabajo.

A los miembros del Jurado, Doctores Alejandro Cravioto, Amelia Farrés, Yolanda López Vidal, Carlos Eslava y Edmundo Calva, por el tiempo dedicado y las valiosas sugerencias aportadas.

A mis compañeros de los laboratorios de Química y Salud Pública, por su apoyo y amistad.

También agradezco sinceramente la colaboración de todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron involucradas en hacer posible la realización de este trabajo: Margarita Naish, Armando Navarro, Gabriel Pérez, Idalia Florez, Leticia García.

A ALFA Network, coordinado por la Universidad de Reading (contrato UE No. ALR/B7-3011/94.04-5.0130.9) y a la Universidad de La Sabana (Bogotá, Colombia) y su Fondo Patrimonial por el apoyo económico para hacer posible mi estadía en México.

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A VALORES BAJOS DE pH  
DE CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE POZOL

CONTENIDO

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1. GENERALIDADES	9
1.1 Pozol.	9
1.1.1 Elaboración del pozol.	10
1.1.2 Cambios en el maíz durante la elaboración del pozol.	10
1.1.3 Microbiología del pozol.	10
1.1.4 Enterobacterias en el pozol.	11
1.2 Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados.	12
1.2.1 Enterobacterias en alimentos fermentados.	12
1.2.2 Clasificación de <i>Escherichia coli</i> .	13
1.3 Respuestas bacterianas al pH.	17
1.3.1 Ecosistemas alimentarios.	17
1.3.2 Estrés ácido.	17
1.3.3 Efecto del pH extracelular.	18
1.3.4 Mantenimiento del pH intracelular.	18
1.3.4.1 Homeostasis pasiva	19
1.3.4.2 Homeostasis activa.	19
1.3.5 Regulación.	20
1.3.6 Mecanismos inducibles de tolerancia en enterobacterias	20
1.3.6.1 Respuesta de tolerancia a la acidez (ATR).	21
1.3.6.2 Tolerancia a la acidez y Fur.	21
1.3.6.3. Sistema PhoQR.	22
1.3.6.4. Factor sigma.	22
1.3.6.5 Síntesis de proteínas de choque térmico.	22
1.3.7 Resistencia a la acidez de <i>Escherichia coli</i> .	23
1.3.8 Sistemas de resistencia a la acidez dependientes de aminoácidos.	23
1.4 Relación patogenicidad y pH bajo.	24
1.5 Expresión de proteínas de membrana externa.	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Medios de cultivo.	29
3.2 Microorganismos usados.	29

3.3 Selección de cepas.	30
3.4 Determinación del porcentaje de sobrevivencia a la acidez.	31
3.5 Análisis estadístico.	32
3.6 Determinación serológica de serotipos de <i>Escherichia coli</i> usados.	33
3.7 Determinación de la resistencia a la acidez de cepas sometidas a choque térmico.	34
3.8 Obtención y electroforesis de proteínas de membrana externa.	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Selección de cepas.	38
4.2 Comparación de la resistencia a la acidez.	40
4.3 Cambios fenotípicos relacionados con tratamiento ácido.	47
4.4 Resistencia a la acidez de cepas sometidas a choque térmico.	47
4.5 Expresión de proteínas de membrana inducidas por choque térmico.	51
5. CONCLUSIONES	56
6. RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS	
Anexo 1. Serotipos de <i>E. Coli</i> identificados en muestras de pozol.	66
Anexo 2. Número de unidades formadoras de colonias sobrevivientes a distintos valores de pH, de las cepas de <i>Escherichia coli</i> estudiadas.	67
Anexo 3. Porcentaje de sobrevivencia a diferentes valores de pH, de las cepas de <i>Escherichia coli</i> estudiadas.	68
Anexo 4. Porcentaje de sobrevivencia de las cepas de <i>Escherichia coli</i> a tratamientos con diferentes condiciones de acidez.	69
Anexo 5. Variables para la prueba F ANOVA de una dirección.	70
Anexo 6. Títulos de las serologías de las cepas antes y después de la exposición a condiciones ácidas en caldo Luria a pH 3.0 acidificado con ácido láctico.	70
Anexo 7. Porcentaje de sobrevivencia de las cepas de <i>Escherichia coli</i> a tratamientos ácidos en caldo Luria ajustado con HCl, antes y después de choque térmico.	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de sobrevivencia a la acidez.	24
Tabla 2. Microorganismos usados.	30
Tabla 3. Factores de virulencia de las cepas de <i>E. coli</i> resistentes a acidez aisladas de pozol preseleccionadas para la realización de este trabajo.	31
Tabla 4. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas <i>E. coli</i> aisladas de pozol, en caldo Luria con pH 3.0 ajustado con HCl.	38
Tabla 5. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas <i>E. coli</i> EHEC, en caldo Luria a pH 3.0 ajustado con HCl.	38
Tabla 6. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas <i>E. coli</i> ambiental y clínicas en caldo Luria a pH 3.0, ajustado con HCl.	39
Tabla 7. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas <i>E. coli</i> K-12, en caldo Luria a pH 2.0, 2.5 y 3.0 ajustado con HCl.	39
Tabla 8. Comparación de los porcentajes de sobrevivencia de cepas de <i>E. coli</i> en una hora de cultivo en caldo Luria con pH ácido.	40
Tabla 9. Análisis de varianza unifactorial para determinar la validez de los resultados de sobrevivencia de diferentes cepas de <i>E. coli</i> cultivadas en medio con pH ácido.	44
Tabla 10. Comparación de porcentaje de sobrevivencia observado en las diferentes cepas analizado por la prueba de Duncan.	44
Tabla 11. Comparación de porcentaje de sobrevivencia observado en los diferentes valores de pH analizado por la prueba de Duncan.	45
Tabla 12. Comparación del porcentaje de sobrevivencia observado en los diferentes tiempos de exposición al ácido, analizado por la prueba de Duncan.	45
Tabla 13. Análisis multifactorial de varianza.	46
Tabla 14. Análisis por densitometría de bandas de bajo peso molecular de electroforesis de geles de extractos de OMPs.	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento para determinación del porcentaje sobrevivencia a la acidez.	32
Figura 2. Procedimiento para la realización del choque térmico y determinación de la resistencia a la acidez.	34
Figura 3. Procedimiento para la obtención de proteínas de membrana externa (OMPs).	36
Figura 4. Resistencia de cepas <i>E.coli</i> a pH 3.0 ajustado con HCl.	42
Figura 5. Resistencia de cepas <i>E.coli</i> a pH 2.5 ajustado con HCl.	42
Figura 6. Resistencia de cepas <i>E.coli</i> a pH 2.0 ajustado con HCl.	43
Figura 7. Resistencia de cepas <i>E.coli</i> a pH 3.0 ajustado con ácido láctico.	43
Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.5 sin choque térmico.	48
Figura 9. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.5 con choque térmico.	48
Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.0 sin choque térmico.	49
Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.0 con choque térmico.	49
Figura 12. Patrón de OMPs de cepas de <i>E.coli</i> cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 a 30°C.	53
Figura 13. Patrón de OMPs de cepas de <i>E.coli</i> cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 antes y después de choque térmico.	53
Figura 14. Patrón de OMPs de cepas de <i>E.coli</i> cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 antes y después de choque térmico.	54



# ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A VALORES BAJOS DE pH DE CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE POZOL

## RESUMEN

El pozol es una bebida ácida preparada a partir de una masa fermentada de maíz. Aunque se produce una fermentación láctica y se alcanzan valores de pH menores de 4.5, se han aislado serotipos patógenos de *Escherichia coli* que sobreviven durante la fermentación.

Los estudios de resistencia a la acidez se han centrado principalmente en el serogrupo 0157 por el grave síndrome urémico hemolítico que produce. Se ha reportado incremento de la resistencia a la acidez en esta bacteria después de un tratamiento térmico subletal, correlacionado con la síntesis de proteínas de membrana externa (OMPs) de bajo peso molecular.

El serogrupo 088 de *E. coli* ha sido considerado como patógeno, asociado a brotes diarreicos en Brasil e India. Cepas con este serogrupo fueron aisladas de pozol en estudios previos; en este trabajo se muestran los resultados relacionados con la resistencia a la acidez de cepas de *E. coli* 088:H25 aisladas de muestras de pozol, clínicas y de ambiente, comparados con los obtenidos en *Escherichia coli* 0157:H7 y *E. coli* K12, usados como control positivo y negativo respectivamente.

Se determinó la sobrevivencia de estas cepas en caldo Luria ajustado a pH 2.0, 2.5 y 3.0 con ácido láctico y clorhídrico y no se encontraron diferencias significativas entre la sobrevivencia de la cepa aislada de pozol y los resultados obtenidos con la cepa 0157. Por otra parte, la cepa ambiental 088:H25 mostró el porcentaje de sobrevivencia más alto al pH ácido en alguno de los valores de pH ensayados.

Se analizó el tratamiento con choque térmico (48°C por 10 minutos), para determinar la expresión de OMPs y se encontró que en una cepa de pozol y en la 0157:H7 se incrementa la síntesis de una OMP de aproximadamente 19 kDa; también se observó en estas mismas cepas aumento de la resistencia a la acidez, bajo tratamiento similar. No hubo incremento en la sobrevivencia a la acidez, ni síntesis de OMPs de bajo peso molecular en las cepas clínica, ambiental ni K12.

Las diferencias en el incremento de la resistencia a la acidez y en la expresión de OMPs posterior a choque térmico subletal de cepas de *E. coli* del mismo serotipo pero diferente origen, sugieren diversos mecanismos de resistencia a la acidez. Los resultados obtenidos apoyan la importancia epidemiológica de las cepas de *E. coli* 0157:H7 y 088:H25 para la seguridad de los alimentos ácidos.

## ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A VALORES BAJOS DE pH DE CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE POZOL

### INTRODUCCION

Las bacterias experimentan periódicamente situaciones de estrés en gran variedad de eventos naturales o de patogénesis. Con la finalidad de aumentar la posibilidad de sobrevivencia en estas circunstancias, los microorganismos son capaces de detectar señales de alarma y desencadenar una respuesta molecular, sintetizando proteínas específicas. El descubrimiento de que bacterias con respuestas a estrés deficientes son menos virulentas, ha sido una nueva revelación en la patogénesis microbiana (Bearson y col. 1997).

En sus hábitats naturales las enterobacterias son constantemente sometidas a variadas situaciones de estrés ambiental, siendo el ácido una de las condiciones hostiles más frecuentes; microorganismos neutrofilicos como *E. coli*, encuentran estas condiciones en su tránsito por el tracto gastrointestinal, con valores de pH extremadamente bajos en el estómago y presencia de ácidos grasos volátiles en el intestino. Fuera de un huésped, los organismos entéricos enfrentan estrés ácido en los residuos industriales, procesamiento de alimentos y degradación de la materia orgánica. Así, la capacidad de detectar y responder a cambios de pH potencialmente letales, es crucial para la sobrevivencia del microorganismo.

El pozol es una bebida tradicional del sureste de México, obtenida a partir de una masa fermentada de maíz nixtamalizado. El procesamiento del pozol es casero y carece de condiciones higiénicas, permitiendo la acción sobre la masa, de bacterias, levaduras y hongos que realizan el proceso natural de fermentación. Durante el proceso se incorporan enterobacterias, algunas de las cuales no se inhiben durante la fermentación. Estudios previos realizados por Sainz, 1998, mostraron la presencia y sobrevivencia de cepas de *E. coli* patógenas en el pozol, a pesar de los bajos valores de pH alcanzado (3.85), a las 48 horas de fermentación de la masa.

La mayoría de los estudios de resistencia a valores de pH bajo en *E. coli* se centran en la cepa 0157:H7, debido a la gravedad de los síntomas que ocasiona; sin embargo en México, donde aparentemente esta cepa no causa problemas, son las cepas EPEC y ETEC, como las aisladas del pozol, las que ocasionan episodios graves de diarreas, sobre todo en niños.

La capacidad de los microorganismos patógenos para desarrollar respuestas de adaptación a condiciones de estrés, recibe cada vez más atención en la microbiología de alimentos. La adaptación a condiciones ácidas por parte de los patógenos entéricos, puede incrementar

significativamente su sobrevivencia en alimentos ácidos y alterar otras características fisiológicas de la célula.

En este trabajo se estudió la resistencia al estrés ácido de cepas del serotipo patógeno, 088:H25, aisladas de diferentes fuentes (pozol, ambiente, pacientes con diarrea) para evaluar su comportamiento y establecer el riesgo de su transmisión en alimentos como el pozol.

## CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

El maíz es quizá la planta americana que actualmente tiene más importancia para la humanidad, y con seguridad, la que más utilidad tuvo para todas las culturas indígenas americanas. La cosecha de este cultivo es actualmente la más importante de los Estados Unidos, tanto por su valor, como por la extensión de tierra cultivada, superando incluso a la soya y el trigo. En la América intertropical el maíz sigue siendo, como lo fue durante milenios la base de la alimentación de México, América central y algunos países andinos (Caso, 1961).

### 1.1. POZOL

Es una bebida ácida y refrescante que se consume desde la época prehispánica en el sureste de México; el término pozol viene del vocablo náhuatl *pozolli*, que significa espumoso. Para su consumo se prepara diluyendo en agua una masa fermentada de nixtamal (maíz hervido en agua con cal), (Cruz y Ulloa, 1973). Se ingiere crudo, como bebida ceremonial y alimento básico por las poblaciones indígenas del sureste de México y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Algunos grupos étnicos como los chontales y choles de Tabasco, los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, choles y mames de Chiapas y los zapotecos de Oaxaca, consumen pozol como alimento básico. Se utiliza también con fines medicinales para controlar diarreas, adicionado con miel de abeja para reducir la fiebre y los mayas preparaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales; también lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Ulloa y col, 1987).

Según los autores mencionados, existen variantes de pozol en los diferentes Estados productores. En Tabasco y Chiapas, se prepara con un aroma especial, añadiendo la planta "isaúl" al agua en que se bate la masa; en Tabasco hay una modalidad llamada "chorote" que se obtiene por fermentación de la masa de maíz con cacao molido. En la región de Chinantla, Oaxaca agregan a la bebida cacao tostado y molido o cenizas de carbón de encino; en Yucatán, suelen agregarle coco.

Los indígenas preparan pozol en la casa para el consumo familiar y sólo algunos productores en gran escala lo elaboran para la venta. Entre la población indígena, el pozol es consumido diariamente por adultos, niños e infantes (Ulloa y col, 1987).

### 1.1.1 ELABORACION DEL POZOL

Siguiendo el proceso tradicional indígena en los Estado de Tabasco y Chiapas, el maíz se limpia para eliminar materiales extraños y la nixtamalización se realiza por cocción en agua con cal (hidróxido de calcio), hasta que se hinchan los granos y se desprenden las cascarillas. Los granos se frotran con las manos y se enjuagan para eliminar la cal y el hollejo. Después de un tiempo de remojo, que aumenta la retención de humedad, viene la molienda y la formación manual de las bolas, que se envuelven en hojas de plátano. Se deja fermentar a temperatura ambiente de 0.5 a 4 días y en ocasiones dos semanas o más. Para preparar el pozol, una vez fermentada la masa, se suspende en el agua disgregándola con la mano. La forma de consumir pozol es muy distinta entre los indígenas, que normalmente lo consumen sin añadir otros ingredientes; en cambio los mestizos o ladinos, siempre agregan azúcar y comúnmente hielo (Cañas y col. 1993).

Algunos componentes fibrosos no son solubilizados completamente por la nixtamalización, produciendo un sedimento en la bebida cuando la masa es suspendida en agua, que no es del gusto de los mestizos; éstos han modificado el proceso, con la adición de una segunda cocción o "reventado" de los granos de maíz, antes de molerlos para reducir el sedimento (Cañas y col, 1993; Wachter y col, 2000). La población mestiza prefiere el pozol ligeramente fermentado, de tal manera que la masa preparada temprano en la mañana es consumida ese mismo día.

### 1.1.2 CAMBIOS EN EL MAIZ DURANTE LA ELABORACION DEL POZOL

La fermentación de la masa de nixtamal se lleva a cabo en estado semisólido, con la intervención de una microbiota compleja, compuesta por diferentes grupos de bacterias, mohos y levaduras (Cañas y col, 1993).

Durante la fermentación del maíz se desarrolla un sabor ácido y un aroma característico que le imparten a la bebida propiedades refrescantes. El pH de los granos es de 5.7 y aumenta durante la nixtamalización a 7.5. La masa tiene un pH inicial de 6.8 y disminuye a 3.9 en el octavo día de fermentación (Ulloa, 1974). Cravioto y col. (1955) analizaron el pozol y los granos de maíz utilizados en su preparación, encontrando que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptofano, que el maíz. La concentración de proteína es mayor y ésta es de mejor calidad en el pozol que en el maíz.

### 1.1.3 MICROBIOLÓGIA DEL POZOL

Se han adelantado varios estudios para determinar la complejidad de la microbiota presente en el pozol, enumerando y caracterizando los microorganismos presentes en muestras obtenidas

comercialmente. Es evidente que la fermentación es debida principalmente a bacterias lácticas; en ausencia de oxígeno no hay concentraciones suficientes de otros microorganismos, para causar cambios bioquímicos en el sustrato. Si se permite el acceso de oxígeno, como en las bolas tradicionales de pozol envueltas en hoja de plátano, se presenta abundante crecimiento de hongos a lo largo de los días, que contribuyen al sabor y se describe el proceso como una fermentación láctica con maduración por hongos (Wacher y col, 1993; Nuraida y col, 1995).

Durante la fermentación, el valor de pH de la masa cae de 7.0-7.5 a 5.5 en 12 horas y alcanza 3.9 en 3 a 4 días. Wacher y col. (1993) reportan concentraciones máximas en ufc/g de  $10^9$  bacterias ácido lácticas,  $10^7$  mesófilos aerobios,  $10^6$  enterobacterias,  $10^6$  levaduras y  $10^4$  mohos. Los autores atribuyen como fuentes de microorganismos la contaminación en varios puntos del proceso. La microbiota primaria de las bacterias ácido lácticas, enterobacterias y mesófilos iniciales del pozol proviene de la fase de remojo y la molienda en molinos comerciales aporta cantidades aun mayores tanto de bacterias ácido lácticas como de mesófilos y agrega levaduras. Otras etapas del proceso, como el amasado de las bolas y la exposición al ambiente, contribuyen con números menores de microorganismos (Wacher y col, 1993).

Estos resultados se entienden por la naturaleza casera del proceso, susceptible de contaminación fecal y las deficiencias de los servicios públicos como el agua potable en la región. Por otro lado, los molinos manuales nunca se desarmen para su limpieza y los comerciales se limpian superficialmente eliminando la masa seca y enjuagando únicamente con agua (Wacher y col, 1993). Esto permite el acúmulo de residuos de masa que sirven de sustrato a los microorganismos presentes.

#### 1.1.4 ENTEROBACTERIAS EN EL POZOL

En 1998, Sainz analizó 10 muestras de pozol, a partir de las cuales aisló 73 cepas de *E. coli*, en las cuales determinó la presencia de factores de virulencia y la sobrevivencia durante la fermentación. En la clasificación serológica de las cepas se encontraron algunos serotipos patógenos pertenecientes a los grupos enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), uropatógenas (UPEC) y enteroagregativas (EAEC). Estos microorganismos se aislaron a las 48 horas de incubación de la muestra de pozol, cuando el pH había descendido a valores comprendidos entre 3.85 y 4.77, y aun bajo estas condiciones se encontraron creciendo 25 cepas.

Wacher y col, (2000) realizaron la comparación de la microbiota inicial y final así como los patrones de fermentación durante los procesos de elaboración de pozol indígena y mestizo. Sus resultados mostraron que no se presentan diferencias en relación a los eventos analizados con respecto al tipo de elaboración. Además se observó que la acidificación de la masa no inhibió las

enterobacterias, que crecieron bien en las primeras horas de fermentación y sobrevivieron después de alcanzarse los valores de pH más bajos.

## 1.2. SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Gracias a sus bajos valores de pH y la presencia de ácidos orgánicos producidos en la fermentación, los alimentos fermentados tienen menos posibilidades de ser fuente de transmisión de bacterias patógenas, que alimentos similares no fermentados (Mensah y col. 1989; 1990). Sin embargo, la resistencia a la acidez de algunos microorganismos es una característica importante, que podría permitirles sobrevivir en alimentos fermentados y traspasar con facilidad la barrera gástrica en humanos, produciendo enfermedad.

Las bacterias lácticas tienen un papel importante en la conservación de muchos alimentos; son capaces de resistir condiciones adversas que inhiben el crecimiento o eliminan a otros microorganismos y producen ácidos orgánicos, sin formación de productos indeseables. Además poseen actividad antimicrobiana por la elaboración de bacteriocinas, diacetilo y peróxido de hidrógeno (Vuyst, 1994). Entre los ácidos que ejercen efectos de preservación sobre los alimentos están el láctico y el acético, que tienen propiedades inhibitorias y germicidas (Fields, 1977); la diferencia entre dichas propiedades está en la concentración de su forma no disociada, que a su vez es dependiente de la constante de disociación ( $pK_a$ ).

Los alimentos fermentados a pesar de poseer variedad de sistemas protectores contra los microorganismos, en muchas ocasiones son contaminados por los patógenos, como se describe en algunos ejemplos de variedad de productos elaborados con esta metodología, con reportes de presencia de enterobacterias.

### 1.2.1 ENTEROBACTERIAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS

Los productos cárnicos fermentados, como la mayoría de las salchichas, no sufren calentamiento durante su manufactura o antes de su consumo y en general se tiene un buen registro de seguridad para salchichas secas. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas fallas en la elaboración y almacenamiento pueden llevar a brotes de infecciones alimentarias y/o intoxicaciones. Durante la fermentación la población de enterobacterias puede permanecer constante (alrededor de  $10^4$ ), o aumentar ligeramente en los tres días iniciales, pero luego, lentamente es inactivada. Los factores que favorecen la permanencia de las bacterias son la mayor actividad de agua, valores altos de pH inicial, baja concentración de azúcares fermentables, escaso número de lactobacilos en la mezcla de salchicha fresca y empleo de mínimas

concentraciones de nitrato. En Alemania, *Salmonella* es la enterobacteria más común (16%) en salchichas fermentadas frescas, y en menor proporción (1%) en las secas. Lo anterior probablemente por el hecho de que para conservar la consistencia y sabor "fresco", las salchichas se preparan con muy poco o ningún acidulante y son sometidas sólo a 1-2 días de fermentación, suficiente para la formación del color, pero no para inhibir el desarrollo de enterobacterias (Lucke, 1985).

El dahi hindú es un producto obtenido por fermentación láctica de leche de búfalo o vaca, de aspecto semejante al yogurt aunque posee menor acidez. Los compuestos antibacteriales producidos por la biota fermentadora previenen el crecimiento de microorganismos indeseables y mejoran la digestión. Sin embargo, Bhat y Reporter (1949), encontraron que algunos patógenos entéricos sobrevivían por largos periodos en dahi y concluyeron que éste podría ser una fuente potencial de infección por *S. typhi*, si la contaminación ocurría después del proceso de calentamiento.

Mensah y col (1988) estudiaron en Ghana masas de maíz fermentadas y observaron disminución de la cantidad de patógenos inoculados en las preparaciones después de 24 h; sin embargo, tanto algunas cepas como variedades de *Shigella* spp. sobrevivieron después de ese tiempo, y concluyeron que la fermentación ácida no elimina totalmente las bacterias indeseables.

Estudios realizados en *E. coli* 0157:H7 por Wang y Doyle, (1998), afirman que su ácido tolerancia es un importante factor de virulencia; esta propiedad le permite sobrevivir en alimentos ácidos como sidra, (pH 3.7), mayonesa, salchichas fermentadas, salami seco (pH 4.5) y resistir la acidez gástrica en el humano. Sin embargo, el mecanismo de inducción de la tolerancia a la acidez no ha sido totalmente dilucidado.

### 1.2.2 CLASIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

*E. coli* es un microorganismo de gran interés que forma parte de la microbiota intestinal, fuera de éste puede ocasionar problemas infecciosos en diferentes órganos, incluyendo infecciones gastrointestinales, renales, septicemia, neumonía y meningitis. Además de la importancia de clonas adaptadas a vivir en el hospedero en un estado óptimo de parasitismo, aparecen otras con propiedades de virulencia que se relacionan con la patogénesis de la diarrea.

Antes del empleo de la biología molecular y de la identificación de los factores de virulencia que explican el potencial de patogenicidad de las diferentes cepas, los investigadores usaron reacciones bioquímicas, patrones de sensibilidad a antibióticos y los antígenos de superficie bacterianos, como método conveniente para identificar y caracterizar a estas bacterias. La



tipificación serológica es todavía ampliamente usada para la detección del origen de brotes de enfermedades intestinales y para la identificación de cepas patógenas. Recientemente se ha propuesto un esquema de clasificación basado en identificar factores de virulencia de cepas de *E. coli* que utiliza técnicas de biología molecular que codifican genes implicados en la expresión de genes de virulencia.

Para la identificación serológica se utiliza la detección de los antígenos somático (O) y flagelar (H). El esquema de clasificación basado en los factores de virulencia incluye patrones característicos de adherencia a las células huésped, producción de toxinas e invasividad. Con la información que se posee en la actualidad se han definido cinco tipos de *E. coli*: enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatógena, enteroagregativa y enterohemorrágica (Salysers y Whitt, 1994).

#### *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las cepas ETEC, a semejanza de *V. Cholerae*, se adhieren a la mucosa del intestino delgado sin invadir las células y producen sintomatología de diarrea por acción de toxinas que actúan sobre el epitelio intestinal. Como en el cólera, no hay cambios celulares aparentes de las células a las que la bacteria se adhiere, la inflamación es mínima y la diarrea es menos severa, pero puede ser fatal, especialmente en infantes y niños de hasta 3 años. En los países en desarrollo los adultos tienen inmunidad parcial, pero afecta a los viajeros de sitios libres de cepas ETEC. La infección se adquiere por ingestión de agua y alimentos contaminados.

Las cepas ETEC elaboran dos tipos diferentes de toxinas: la termolábil (LT), se inactiva a 100°C durante 10 minutos y la termoestable (ST), que conserva su toxicidad después de incubación a 100°C durante 30 minutos. La toxina LT tiene dos tipos: La LT-I que comparte 80% de identidad con la toxina producida por *V. cholerae* 01 y es semejante en función y antigenicidad; el segundo tipo, LT-II se aísla principalmente de animales y no se asocia a enfermedad en animales ni humanos. La adhesión es mediada por factores de colonización CFA, que son adhesinas fimbriadas.

#### *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

De distribución mundial, afecta principalmente adultos, identificándose en niños únicamente a partir del sexto mes de vida. Causa una enfermedad indistinguible a nivel sintomático, de la disentería producida por *Shigella* spp., como es la presencia de moco y sangre. Estas cepas invaden y se multiplican activamente en los enterocitos colonizados y se diseminan lateralmente a las células vecinas, tal y como se ha descrito en *Shigella* spp., siendo altamente virulentas.

#### *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Es el grupo más recientemente definido, causa una diarrea secretora persistente en niños con duración mayor a 14 días y en adultos en países desarrollados, infectados por alimentos contaminados. EAEC presenta un patrón de adherencia a células HEp-2 caracterizado por la formación de agregados que se han definido como ladrillos apilados. El mecanismo de patogenicidad comienza a dilucidarse, considerándose varios eventos, entre ellos la adherencia y la producción de toxinas como los más importantes. Esliava y col, (1998) han descrito dos características histopatológicas inducidas por la bacteria que son: formación de una capa densa de moco sobre la mucosa intestinal y daño de la misma, aparentemente por la elaboración de toxinas. También han reportado la presencia de una toxina termo-lábil (Pet), codificada sobre un plásmido relacionado con la adherencia, con alta homología con las proteasas EspP de *E. coli* EHEC y la EspC de *E. coli* EPEC, que lo mismo que Pet son proteínas secretoras autotransportadas. Savarino y col. describieron previamente que EAEC produce una enterotoxina termoestable (EAST1), relacionada con la toxina ST de *E. coli* ETEC, que no ha sido responsabilizada de la enfermedad así como una hemolisina. Se han descrito algunos serogrupos relacionados con EAEC como es el caso de 044, 086.

#### *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Este grupo también se llama verotoxigénico, (VTEC) por el efecto de sus toxinas sobre células Vero. La bacteria se ha relacionado con casos de colitis hemorrágicas y cuadros de síndrome urémico-hemolítico en humanos. La cepa prototipo de este grupo es *E.coli* O157:H7, responsable de brotes a gran escala en países desarrollados por infección a través de alimentos contaminados. Se distingue de otras cepas de *E.coli*, por la producción de las toxinas (SLTI y SLTII), la incapacidad para fermentar el sorbitol y de expresar actividad de  $\beta$ -glucuronidasa. Generalmente la diarrea es más parecida a la disentería de *Shigella* que a las diarreas por ETEC o EPEC. *E.coli* O157:H7 es una bacteria generalmente resistente a la acidez, lo que incrementa la posibilidad de su participación en infecciones alimentarias a partir de productos fermentados. Tiene varios factores implicados en la patogénesis como son las toxinas tipo Shiga así como una isla de patogenicidad llamada LEE, que codifica para proteínas como la intimina, involucrada en el evento de adhesión y esfacelamiento que se ha descrito en las cepas EPEC. Aunque *E.coli* O157:H7 es el serotipo predominante en las enfermedades transmitidas por alimentos, se han aislado variantes O157 citotoxigénicas y no móviles, que producen síndrome urémico. (Feng y col, 1998).

#### *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Es una importante causa de diarrea aguda especialmente en niños, en países en desarrollo. Su mecanismo de patogenicidad se caracteriza por la adherencia de las bacterias a la porción apical del enterocito con formación de un pedestal y posterior destrucción del borde rugoso de las

microvellosidades. El mecanismo se confirmó en humanos por Ulshen y Rollo (1980), que describieron estructuras similares en niños con diarrea crónica. La lesión fue designada como A/E, adhesión y esfacelamiento del epitelio, (deformación y destrucción de microvellosidades) por Moon y colaboradores en 1983. Al microscopio de luz se examinó el patrón con adherencia bacteriana focal e inflamación por infiltrado celular; en el microscopio electrónico se visualizó cambios estructurales de las microvellosidades, destrucción de éstas y formación de un pedestal de fibras de actina en los sitios de adherencia bacteriana. Se observó la penetración bacteriana al enterocito por invaginación de la membrana plasmática o en vacuolas (Scaletsky y col. 1996).

Inicialmente Cravioto y col (1979) mostraron que el 80% de las cepas EPEC clásicas se adherían a células HEp-2 en presencia de D-manosa. Basados en esos estudios se han identificado tres patrones de adherencia (Nataro y col. 1987):

- Adherencia localizada, con formación de microcolonias en uno o más sitios de las células epiteliales intestinales.
- Adherencia difusa, con la bacteria ubicada uniformemente sobre las células.
- Adherencia agregativa, en la cual las bacterias tiene la apariencia de pilas de ladrillos sobre la superficie celular.

La adherencia localizada se asocia con cepas EPEC y es mediada por una estructura fimbrial en forma de haz (Bfp), codificada por el gene *bfpA* localizado en un plásmido, llamado factor de adherencia EPEC: EAF (Girón y col. 1991). Para producir la lesión A/E, es necesario un grupo de genes cromosomales *eaë* de 35 kb llamado locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), del que se ha obtenido una sonda de 1kb para diagnóstico. Igualmente se ha obtenido una sonda de 1kb del plásmido EAF. Parece ser que *eaë* es un marcador más adecuado para estudios epidemiológicos en Europa, mientras que la sonda EAF se ha propuesto como más apropiada por su incidencia, para los países en desarrollo, pero muchas veces los resultados son equivalentes (Bouzari y col. 2000).

Los serogrupos O clásicos reconocidos en la categoría EPEC más comunes son: 26, 55, 86, 111, 114, 119, 125ac, 126, 127, 128ab, 142 y 158 (Gomes y col. 1989). Sin embargo en un estudio realizado en Brasil por Pedroso y col en 1993 encontraron que cepas del serotipo O88H25, aisladas de seis pacientes con diarrea, presentaban una frecuencia mayor del gen EAF+ que el observado en cepas de serotipos clásicos. También demostraron producción de lesiones de adhesión y esfacelamiento (A/E) y penetración intracelular tanto en células HeLa como de mucosa de duodeno humano.

Posteriormente Kamlakar y Pathak en 1995 estudiaron en la India 500 casos de diarreas de niños y adultos y encontraron como serotipos EPEC más comunes los 086, 055, 0111, 028 y 020; pero también aunque en menor cantidad: 0132, 088, 0114, 0116 y 0152.

### 1.3 RESPUESTAS BACTERIANAS AL pH

Una de las características más notables de las bacterias es su capacidad para sobrevivir condiciones ambientales extremas. Las bacterias rompen las reglas que los biólogos dan por establecidas y dan a los microbiólogos revelaciones únicas en los límites vitales. *Escherichia coli* es capaz de crecer a valores de pH entre 5.0 y 8.0, manteniendo el pH intracelular ( $pH_i$ ) de forma extraordinariamente constante (Glenn y Dilworth, 1999).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a condiciones de pH adversas, son relevantes en medicina con relación a la invasión patogénica, en la industria de alimentos por su potencial para transmitir patógenos y en la agricultura con el manejo de suelos con pH adverso para mantener su productividad, especialmente para contrarrestar la acidificación inducida por el hombre.

#### 1.3.1 ECOSISTEMAS ALIMENTARIOS

Los alimentos son ecosistemas complejos, compuestos por el ambiente y los organismos que viven en él (Doyle y col., 1997). El ambiente del alimento está compuesto por factores intrínsecos inherentes al alimento (ej. pH, actividad de agua y nutrientes) y factores extrínsecos, externos a él (ej. temperatura, gases ambientales, presencia de otros microorganismos, etc.). Los dos tipos de factores pueden ser manipulados para conservar el alimento.

#### 1.3.2 ESTRÉS ÁCIDO

El estrés ácido puede describirse como el efecto biológico combinado del pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos en el ambiente; incluye ácidos, como lactato, butirato, propionato y acetato, producidos comúnmente como resultado de la fermentación. Los ácidos débiles en su forma protonada, no cargada, pueden difundir a través de la membrana celular y disociarse en el interior de la célula, disminuyendo en el proceso el pH interno ( $pH_i$ ). A menor pH externo ( $pH_o$ ), más ácidos débiles no disociados estarán disponibles (según sus valores  $pK_a$ ), para atravesar la membrana y afectar el  $pH_i$ . Por lo tanto, se necesita menor concentración de ácido orgánico para destruir una célula a  $pH_o$  de 3.5, que a  $pH_o$  de 4.4 (Bearson y col. 1997). La acumulación citoplasmática de ácidos orgánicos, además de la acidificación interior de la célula, tiene efecto desacoplante del metabolismo celular (Diez-Gonzalez y col. 1997a).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se atribuye tradicionalmente a la disminución del pH por debajo del intervalo de crecimiento y a la inhibición del metabolismo por parte de las moléculas ya disociadas (Diez-Gonzalez y col. 1997b.). Con la teoría quimiosmótica se observó que los ácidos y bases altamente lipofílicos podían transferir protones a través de la membrana celular, (como lo hacen los ácidos orgánicos) y disipar la fuerza protón motriz; se piensa que la entrada de protones desacopla el crecimiento y disipa los recursos energéticos por difundir la fuerza mencionada (Diez-Gonzalez y col. 1997b).

Estudios comparativos de respuestas a la acidez de *E. coli* y *S. typhimurium* han mostrado que pH<sub>i</sub> de *E. coli* disminuye más acentuadamente que el de *Salmonella* a un pH externo de 5.0; la velocidad de crecimiento de *E. coli* es menor de la de *Salmonella* a este pH, mientras que lo hacen a idéntica velocidad a pH 7.0 (Hickey y Hirshfield, 1990).

### 1.3.3 EFECTOS DEL pH EXTRACELULAR

Macromoléculas externas a la membrana citoplasmática como flagelo, pili, proteínas periplásmicas, pared celular, etc. están expuestas a cualquier cambio del pH extracelular, y son el primer punto de daño por pH adverso. Las bacterias tienen opciones limitadas para proteger estas estructuras y deben producir versiones modificadas capaces de resistir pH adverso o cuando esto no es posible, prescindir de la función. Esto ocurre por ejemplo con la pérdida de movilidad del flagelo y por tanto de la respuesta quimiotáctica, bajo condiciones de pH ácido (Bowra y Dilworth, 1981).

Cuando la bacteria opera en intervalos de pH 3-4 unidades fuera de su valor habitual, las relaciones entre las formas ionizadas y no ionizadas de los sustratos cambian y procesos como el sistema de transporte de solutos pueden no estar disponibles (Glenn y Dilworth, 1999).

### 1.3.4 MANTENIMIENTO DEL pH INTRACELULAR

El pH interno de las bacterias tiende a ser mantenido dentro de los límites propios de su condición de acidofílico, neutrofilico o alcalofílico (Hall y col, 1995). Dado que el pH interno de las bacterias debe ser mantenido constante, se han propuesto varios mecanismos para minimizar el estrés por pH externos no óptimos:

- Disminución de la permeabilidad de la membrana.
- Capacidad amortiguadora del citoplasma.
- Salida de protones del citoplasma, o limitación de la entrada.
- Prevención de la toxicidad de iones metálicos.

Las bacterias que crecen en un intervalo de pH de ácido a neutro, generalmente mantienen su  $pH_i$  a un valor más alcalino que el de su ambiente (Booth, 1999) y cambios en éste alteran la fisiología celular y la expresión génica con valores tan pequeños como 0.2 unidades de pH. En *E. Coli* uno de los regulones de sobrevivencia global más importantes, el regulado por RpoS, es inducido por acidificación leve del medio de crecimiento.

La capacidad para mantener el  $pH_i$  dentro de un intervalo angosto de valores a pesar de las variaciones del pH ambiental, se llama homeostasis de pH y sus dos componentes principales se conocen como "activos" y "pasivos".

#### 1.3.4.1 HOMEOSTASIS PASIVA:

Los principales componentes del sistema pasivo son la baja permeabilidad de la membrana a los iones, especialmente protones y la capacidad amortiguadora del citoplasma. La primera fue enfatizada por Mitchell (1961) con la teoría quimiosmótica. El intervalo de pH para crecimiento y sobrevivencia es disminuido severamente por cambios en la permeabilidad de la membrana. Variación en la composición de los lípidos se ha observado como respuesta a condiciones de acidez y puede alterar la permeabilidad de la membrana.

La capacidad amortiguadora del citoplasma para recuperar el  $pH_i$  depende de la magnitud del cambio. El glutamato y aspartato combinados en las proteínas pueden tener una concentración efectiva de 300 mM, pero esta cantidad no está totalmente disponible para amortiguar el pH del citoplasma; la contribución de este componente puede incrementar el  $pH_i$  cuando está por debajo de pH 5.5, ya que el  $pK_a$  de estos grupos está entre 3.9 y 4.1 (Doyle y col. 1997).

La principal desventaja de la estrategia del mejoramiento del pH del citoplasma es el requerimiento de acceso continuo de sustratos disponibles en cantidad suficiente; pero puede ser práctica para bacterias entéricas o para otras que se encuentren en ambientes ricos en nutrientes, como los alimentos.

#### 1.3.4.2 HOMEOSTASIS ACTIVA:

Implica la habilidad de detectar y responder a perturbaciones de  $pH_i$ . Se alcanza principalmente por el movimiento controlado de cationes y aniones a través de la membrana, siendo los principales los iones potasio, sodio y protones. El transporte de potasio tiene un papel importante en la homeostasis de *E. Coli* y la activación de los sistemas de KefB y KefC, integrados a mecanismos de detoxificación dependientes de glutatión, controlan el  $pH_i$  para la sobrevivencia celular (Ferguson y col. 1999).

Los sistemas antiporto de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  son centrales para el equilibrio del sodio y el mantenimiento de su gradiente para transporte, pero no para la regulación del pH citoplasmático.

Los cambios de pH debidos al catabolismo pueden ser una consecuencia inevitable del uso de sustratos disponibles o una respuesta a un pH desfavorable; el catabolismo de azúcares generalmente resulta en acidificación, mientras que el de ácidos orgánicos o aminoácidos incrementa el pH interior, pero son resultados no controlados, debidos al metabolismo. Por contraste, la descarboxilación de aminoácidos como la lisina, por el sistema *cad* en *E. coli* (Watson y col. 1992) o el de la arginina, vía arginina descarboxilasa, lleva a un incremento del  $\text{pH}_i$ , como respuesta inducida por el pH bajo.

Otra opción importante involucra sistemas con requerimientos de energía para bombear activamente iones, de forma que se pueda mantener el  $\text{pH}_i$ . El costo energético de estos sistemas es alto y a pH ácido, pueden necesitar también sistemas para remover iones indeseables como podrían ser  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , lo que incrementa aun más dicho gasto.

### 1.3.5 REGULACIÓN

La expresión de genes que dirigen el transporte de protones, la degradación de aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o básicas y aun la virulencia, pueden ser reguladas por el pH externo ( $\text{pH}_o$ ). Las células poseen diferentes mecanismos sensores a los cambio de pH (Doyle y col., 1997). Los aminoácidos pueden cambiar a su forma protonada o no protonada por variaciones del pH, lo que varía la estructura secundaria o terciaria de la proteína, alterando su función, y señalando el cambio. La célula puede responder únicamente a una forma de estas moléculas señal; así cuando los ácidos orgánicos cruzan la membrana citoplasmática solamente en su forma protonada, un incremento en la concentración intracelular, indicaría elevación de la acidez ambiental. El gradiente de protones transmembranales ( $\Delta\text{pH}$ ), puede por sí mismo servir como sensor y regular el aumento o disminución de procesos dependientes de energía.

### 1.3.6 MECANISMOS INDUCIBLES DE TOLERANCIA A LA ACIDEZ EN ENTEROBACTERIAS

Bacterias entéricas como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* encuentran comunmente ambientes ácidos durante su vida como comensales o patógenos, y deben tener la capacidad de soportarlos para lograr la colonización. Por ello estos microorganismos han desarrollado estrategias únicas para sobrevivir a encuentros transitorios o permanentes con condiciones ácidas potencialmente letales. Los procesos que les capacitan para esta resistencia, incluyen los sistemas de homeostasis inducible y mecanismos moleculares de protección y reparación.

El pH intracelular (pH<sub>i</sub>) debe ser mantenido por encima de un cierto pH crítico al cual las proteínas intracelulares podrían ser desnaturalizadas irreversiblemente. La tolerancia a la acidez ha sido estudiada más extensamente en *Salmonella typhimurium*, donde se han encontrado tres mecanismos progresivamente más rigurosos para mantener un pH<sub>i</sub> compatible con la viabilidad celular (Foster, 1991). Estos tres mecanismos son la respuesta homeostática, la respuesta de tolerancia a la acidez (ATR: acid tolerance response) y la síntesis de proteínas de choque térmico, ASPs (acid shock proteins).

A pH > 6.0, las células de *Salmonella* ajustan su pH<sub>i</sub> a través de la respuesta homeostática, que mantiene este pH por modulación alostérica de la actividad de la bomba de protones, antiportadores y simportadores, para incrementar la velocidad a la cual los protones son expulsados del citoplasma. El mecanismo homeostático es constitutivo y funciona en la presencia de inhibidores de síntesis de proteínas (Doyle y col. 1997).

#### 1.3.6.1 RESPUESTA DE TOLERANCIA A LA ACIDEZ (ATR)

Es desencadenada por pH<sub>i</sub> de 5.0 a 6.0 (Foster, 1991) y este mecanismo es sensible a la presencia de inhibidores de síntesis de proteínas; se han identificado por lo menos 18 de 50 proteínas ATR-inducidas (ASPs) y parece involucrar la ATPasa membranal, que bombea protones y mantiene pH<sub>i</sub> a valores mayores de pH<sub>o</sub>. La ATR puede inducir protección cruzada contra otros tipos de estrés ambientales, como calentamiento y estrés oxidativo, pero no ocurre la protección recíproca: el choque osmótico no induce tolerancia a la acidez (Foster y Moreno, 1999). Parece que el estrés ácido es un indicador general de estrés, mientras que el calentamiento, sales, peróxido de hidrógeno, son señales de estrés más específicas.

La exposición a pH 5.8 por algunas generaciones, induce 12 proteínas, reprime seis y hace las células menos sensibles a mayores concentraciones de sal y al calor (Leyer y Johnson, 1993). La adaptación a la acidez también se presenta en *Escherichia coli* 0157:H7 (Leyer y col. 1995). La habituación a la acidez ocurre cuando células de *E. coli* en fase logarítmica crecen en caldo nutritivo a pH 5.0; estas células adaptadas pueden sobrevivir a pH 3.0 o 3.5, mejor que las provenientes de pH 7.0, por la síntesis de proteínas que reparan daños al DNA.

#### 1.3.6.2 TOLERANCIA A LA ACIDEZ Y Fur

Entre las ASPs estudiadas están ocho proteínas reguladas por el factor sigma alternativo  $\sigma^s$  codificado por *rpoS*, cuatro controladas por la proteína reguladora de hierro, Fur y cuatro proteínas reguladas por el sistema de dos componentes PhoPQ. Fur es una proteína represora típica a concentraciones elevadas de Fe<sup>2+</sup>, pero en aparente contraste con esta función, puede actuar como regulador positivo de una subpoblación de ASPs (Bearson y col. 1998). Las mutantes que



carecen de Fur no pueden producir estas proteínas y son sensibles a la acidez; experimentos realizados para separar las propiedades detectoras de hierro y acidez de este regulador, han revelado tres clases de mutaciones de Fur: la primera causa una sobre-expresión de genes regulados por  $Fe^{2+}$ , y producen sensibilidad a la acidez; la segunda y la tercera clase de mutaciones son específicas para la detección individual de hierro o de ácido

#### 1.3.6.3 SISTEMA PhoPQ ES INDUCIBLE POR ÁCIDO

El sistema PhoPQ, es útil únicamente contra estrés ácido que involucre ácidos inorgánicos, especialmente cuando el sistema dependiente de *rpoS* no está disponible. Aunque PhoQ es un detector extracelular de  $Mg^{2+}$ , se ha demostrado que también es detector de pH (Bearson y col. 1998).

Respecto a la porina PhoE fosfato-específica se ha demostrado que los iones fosfato inhiben la adaptación a la acidez y las mutantes *phoE* son resistentes al ácido (Bearson y col. 1997); se ha propuesto que PhoE proporciona un conducto para la entrada de  $H^+$  permitiendo la acidificación del periplasma y la estimulación de una proteína sensora transmembranal, que podría ser la señal para inducción de habituación a la acidez. Niveles altos de fosfato en el medio bloquean el acceso de  $H^+$  al poro PhoE y por tanto interfieren con la transducción de señales. Aparentemente la adaptación a la acidez es un mecanismo independiente de ATR y resistencia a la acidez, ya que estos dos sistemas operan en medios con alto contenido de fosfato.

#### 1.3.6.4 FACTOR SIGMA S

El factor sigma s ( $\sigma^s$ ) codificado por el gene *rpoS* tiene un papel bien establecido en la expresión de genes regulatorios de la fase estacionaria. El notable incremento del nivel de  $\sigma^s$  en la fase estacionaria está asociado con el aumento de la resistencia a estrés general; sin embargo, trabajos recientes han mostrado que bacterias en fase logarítmica sometidas a estrés ácido podrían inducir también  $\sigma^s$  y que ocho ASPs son dependientes de  $\sigma^s$ . Este sistema protege a la célula contra ácidos orgánicos o inorgánicos (Bearson y col. 1998). El gene responsable de la producción de  $\sigma^s$  es el *mviA* (mouse virulence), que controla virulencia y posee homología con la familia OmpR (Benjamin y col. 1991). La producción de  $\sigma^s$  es controlada por MviA que modula la acción de la proteasa ClpXP y como resultado de esta interacción hay rápida degradación de  $\sigma^s$  en ausencia de estrés; la presencia de estrés inactiva MviA, impidiendo la acción de la proteasa.

#### 1.3.6.5 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Es desencadenada por valores de  $pH_i$  de  $<5.0$ . Estas son un conjunto de proteínas regulatorias distintas a las inducidas por ATR, pero similares a las producidas por choque frío en *Listeria*

*monocytogenes* (Foster y Hall, 1991). La mayoría de las funciones de las proteínas de choque térmico (Hsps: heat shock protein) son conocidas; varias (GroE, DnaK y otras), son chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas recién sintetizadas o alteradas por el choque térmico. Algunas marcan proteínas para su destrucción y otras son proteasas que degradan proteínas cuando han sido dañadas irreparablemente por el choque térmico (Snyder y Champness, 1997).

### 1.3.7 RESISTENCIA A LA ACIDEZ DE *Escherichia coli*

Como *S. typhimurium*, *E. coli* posee mecanismos de ácido resistencia tanto en fase logarítmica como estacionaria; sin embargo se ha establecido la mayor resistencia a la acidez de *E. coli* en la fase estacionaria en medios complejos (Bearson y col. 1998), donde puede sobrevivir algunas horas a pH 2.0. La entrada de *E. coli* en la fase estacionaria es acompañada de importantes cambios fisiológicos mediados por un sistema de regulación global con la participación del factor sigma codificado por *rpoS* (Gorden y Small, 1993).

Existen variedad de reportes en la literatura respecto a los grados de resistencia a la acidez de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella flexneri*; cuando utilizan células en fase estacionaria a pH 2.5 en medio mínimo *Shigella flexneri* muestra muy poca resistencia a la acidez, mientras que *S. typhimurium* y *E. coli* tienen tolerancia similar. La situación cambia completamente cuando se usan medios complejos por la presencia en *E. coli* y *Shigella flexneri* de sistemas dependientes de aminoácidos. Además, el crecimiento de los organismos en fase estacionaria en medio complejo produce un sistema de resistencia a la acidez glucosa-represible, que podría proteger las células en medio mínimo, aun sin glutamato o arginina.

Estudios recientes con *E. coli* 0157, proponen un nuevo punto de vista de la tolerancia a la acidez; reportan que las células, adaptadas o no, pueden experimentar pérdida de viabilidad, aunque a diferentes velocidades, pero todos los cultivos tienen una subpoblación de células (variantes fisiológicas, no mutantes), que sobreviven a tratamientos ácidos por largos períodos de tiempo. La ácido resistencia de esta subpoblación no depende de  $\sigma^s$ , pero no se sabe si los sistemas *gad* o *adi* pueden ser importantes (Bearson, 1998).

### 1.3.8 SISTEMAS DE RESISTENCIA A LA ACIDEZ DEPENDIENTES DE AMINOÁCIDOS

Para *E. coli* se han descrito tres sistemas de resistencia a la acidez (RA) dependientes de medio complejo (Bearson y col., 1997) y la actividad de cada sistema depende de si las células experimentan metabolismo oxidativo o fermentativo (Tabla 1).

Dos sistemas RA fermentativos comprenden las arginina y glutamato descarboxilasas inducibles, funcionan por la descarboxilación del aminoácido correspondiente que consume un protón a pH bajo, con un sistema antipuerto que renueva el aminoácido citoplasmático. El operón *adi* codifica para la arginina descarboxilasa y *gadC* codificando un glutamato- $\gamma$ -amino butirato antiportador, son requeridos por los sistemas RA respectivos.

El tercer sistema inducido por crecimiento en fase estacionaria en caldo Luria, es reprimido por glucosa, pero una vez inducido no requiere la presencia de aminoácidos en el medio durante el encuentro posterior con pH<sub>o</sub> 2.5, y ese es el llamado sistema oxidativo; es dependiente de  $\sigma^s$ , mientras que los sistemas RA glutamato y arginina son sólo parcialmente dependientes de este factor sigma, relacionado probablemente con la pérdida de otros componentes de RA requeridos además de las descarboxilasas, más que con la expresión de *adi* y *gadC*; es decir, que como ocurre en *S. typhimurium*, las descarboxilasas satisfacen sólo un aspecto del complejo sistema de tolerancia.

Tabla 1. Componentes de sobrevivencia a la acidez (Lin y col, 1995)

SISTEMA	ACIDO INDUCCION	<i>S.typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.flexneri</i>
MEDIO MINIMO				
RTA fase logarítmica (pH 3.3)	si	si (transitorio)*	si	no
RTA fase estacionaria (pH 3.0)	si	si (varias hrs)*	?	no
GSR** fase estacionaria (pH 3.0)	no	si	si	si
MEDIO COMPLEJO (pH 2.5)				
oxidativo	si	no	si	si
fermentativo	no	no	si	no
glutamato ( <i>gadC</i> )	si	no	no	si
arginina ( <i>adi</i> )	si	no	si	no

\* (Wilmes-Riesemberg y col. 1992)

\*\*GSR: general stress resistance component of acid survival

#### 1.4 RELACIÓN PATOGENICIDAD Y pH BAJO

La importancia del jugo gástrico en el control de las infecciones alimentarias es bien reconocida. Para causar enfermedad en los humanos, un microorganismo debe sobrevivir al ambiente extremadamente bajo del estómago (pH 1.5), antes de alcanzar el intestino. Así, la acidez de jugo gástrico constituye la primera línea de defensa contra los patógenos alimentarios. La reducción de la acidez gástrica se ha asociado con aumentos en la sobrevivencia de algunos patógenos alimentarios comunes. Al respecto se ha demostrado que *Shigella* spp. es más tolerante al ácido (pH 2.0 a 2.5) que *Salmonella* y *E. coli*. Esto permite formular la hipótesis de que la mayor tolerancia a la acidez de *Shigella* spp. contribuye a su baja dosis infecciosa de 10 a 500

microorganismos (Gorden y Small, 1993); también *E. coli* 0157:H7 es capaz de iniciar patogénesis con una dosis infecciosa de 10 a 100 bacterias viables (Chart, 2000).

Estudios realizados por diversos grupos han destacado la importancia del pH bajo en la patogenicidad de las enterobacterias; por ejemplo, la dosis infecciosa de *Salmonella* disminuye significativamente si la acidez gástrica es controlada con amortiguadores, sugiriendo que los organismos mejor preparados para tolerar la acidez estomacal, más probablemente sobrevivirán para producir enfermedad (Bearson y col. 1997).

En *E. coli* se ha demostrado que la adhesión bacteriana a superficies celulares incrementa la ácido resistencia. Hay evidencias claras de la correlación existente entre la respuesta de las enterobacterias al estrés ácido y el proceso patogénico. Se ha reportado que *E. coli* enteropatógenas y enteroinvasivas, son significativamente más tolerantes a la acidez que cepas no patógenas como *E. coli* K-12 (Gorden y Small, 1993).

Un hallazgo importante es que una vez activado, el sistema de ácido resistencia puede permanecer activo por prolongados períodos de almacenamiento en frío; esto implica, que las cepas con esta propiedad retienen la ácido resistencia aunque estén apropiadamente refrigerados y sobrevivirán eficientemente a los encuentros con pH ácido en el conducto gastrointestinal de los huéspedes (Lin y col. 1996).

La resistencia a la acidez de *E. coli* 0157:H7 es la más estudiada. Se ha comprobado que estas cepas usan efectivamente el sistema de resistencia a la acidez dependiente de glutamato, para prevenir el efecto letal de los ácidos débiles. En ensayos realizados con benzoato (Lin. y col. 1996), los sistemas oxidativo y dependiente de arginina no fueron tan efectivos para combatirlo, pero sí contra el efecto de una mezcla de ácidos grasos volátiles, que simulaban la composición intestinal. Estudios realizados por Jordan y col. (1999) correlacionan el incremento de la ácido tolerancia con la reducción de acumulación de protones aunque no se conoce si es debida al incremento en la salida o disminución de la entrada a la célula, comprobándose que la población de bacterias ácido resistentes, tiene aumentada la capacidad para mantener el pH.

El desarrollo de medios efectivos para la validación de la inocuidad de los productos alimenticios y de los procesos que confían en la ácido inactivación de los microorganismos patógenos requiere que:

- Sean caracterizados los mecanismos de respuesta a la acidez entre los microorganismos aislados y el rango de respuestas de ácido tolerancia (ATRs).
- Sean identificadas las cepas que se encuentren presentando mayor ácido resistencia.
- Asegurar que los aislamientos presenten su estado de mayor resistencia.

- Disponer de la información necesaria para asegurar efectivamente la capacidad de la ácido tolerancia de inducir protección cruzada en *E. coli* contra otras tensiones, como irradiaciones o procesamiento térmico.

## 1.5 INVESTIGACIÓN DE LA EXPRESION PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA INDUCIDAS POR ACIDEZ

La membrana externa de las bacterias Gram negativas es una estructura compleja que constituye la interfase entre el interior de la célula y el ambiente. La monocapa de la membrana externa contiene lipopolisacáridos como único componente lípido; las moléculas de LPS están compuestas por dos regiones conservadas: el lípido A que ancla la molécula en la membrana y el núcleo de oligosacáridos, unido al polisacárido O (antígeno somático).

Uno de los mecanismos utilizados por las bacterias para aumentar las posibilidades de sobrevivencia ante situaciones de estrés ácido es la respuesta molecular programada, por la cual se sintetizan proteínas específicas inducibles (Bearson y col. 1997). Presumiblemente estas proteínas actúan previniendo o reparando el daño molecular causado por el estrés ácido. Algunas de estas proteínas son inducidas bajo distintas condiciones de estrés, como el choque térmico y otras únicamente en respuesta a un estrés específico.

En estudios sobre la sobrevivencia de células *E. coli* 0157:H7 sometidas a choque térmico subletal y luego a pH 2.5 se observó que ésta fue 10 a 100 veces mayor, comparada con células no tratadas, dependiendo de la cepa (Wang y Doyle, 1998). Se ha comprobado, que la exposición a calor medio o la ácido adaptación, puede contribuir a la ácido tolerancia de *E. coli* 0157:H7. Se ha propuesto que el bajo pH interno bacteriano induce enzimas específicas que influyen la homeostasis; por tanto, es posible que proteínas de membrana recién sintetizadas, puedan incrementar la sobrevivencia de este organismos cuando se expone a acidez letal, ya sea por mantenimiento del pH transportando H<sup>+</sup>, o por reparación de componentes dañados.

La base molecular para la respuesta al choque térmico ha sido mejor entendida en *E. coli* que en otros microorganismos (Snyder y Champness, 1997); se inducen 30 genes en dos regulones, que codifican 30 Hsps (proteínas de choque térmico). Se conocen muchas de las funciones de estas proteínas, que se encuentran en pequeñas cantidades durante el crecimiento normal; algunas como GroE, DnaK, DnaJ y GrpE son chaperonas que dirigen el plegamiento de proteínas recién traducidas, DnaK y DnaJ afectan la estabilidad de una proteína requerida para la replicación del DNA; las chaperonas pueden contribuir a la sobrevivencia al choque térmico por unir proteínas desnaturalizadas por el aumento repentino de temperatura o a plegarse correctamente cuando

esta configuración ha sido deteriorada. Lon y Clp son proteasas, que degradan proteínas desnaturalizadas irreparablemente por la temperatura; las aminoaciltransferasas inducidas después del choque térmico están involucradas en síntesis de proteínas.

En la investigación citada de Wang y Doyle, (1998) se ha reportado la síntesis de dos proteínas de membrana externa (OMPs) de 22 y 15 kDa, a los 10 minutos del choque térmico y expresadas por lo menos por 6 h en células mantenidas a 37°C. En dicho estudio no se observaron diferencias significativas entre el choque térmico y la adaptación inducida. La secuencia N terminal de la proteína OMP de 22kDa es un componente de una alkil hidroperoxidasa reductasa; contiene un disulfuro redox activo, posiblemente involucrado en el transporte de H<sup>+</sup>. La proteína de 15kDa tiene 100% de homología con otra de función desconocida de *E.coli* y su secuencia de nucleótidos está localizada en el gene de uracilo glucosilasa DNA, encargada del inicio de la reparación del DNA que ha sufrido daños oxidativos. En esta cepa la adaptación produce el aumento de la síntesis de dos OMP, que posiblemente sean componentes protectores de regulación global que responden a tensiones ambientales como el calor o el choque ácido, para reparar daños en el DNA o lípidos de membrana.

Dado que el pozol presenta un descenso rápido del pH desde las primeras horas de fermentación, hasta alcanzar valores de pH 3.85 a las 48 h, es muy factible que las cepas presentes en la masa desarrollen tolerancia a la acidez y respuestas varias al estrés que esta representa. De ahí la importancia de estudiar su capacidad de resistencia a estos ambientes.

## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la resistencia a la acidez de algunas cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de pozol, para contribuir a su control y eliminación de alimentos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de resistencia a la acidez de cepas patógenas de *E. coli* aisladas de pozol.
2. Evaluar y comparar la capacidad de sobrevivencia a la acidez de cepas de *E. coli* 0157:H7 y de cepas aisladas de diferentes fuentes (pozol, ambiente, clínicas).
3. Identificar la presencia de cambios en la expresión del antígeno somático y/o flagelar en cepas de *E. coli* después del tratamiento a pH ácido.
4. Conocer si el efecto de un choque térmico influye en la resistencia a la acidez de las cepas en estudio a pH 2.0 y 2.5 a 30°C.
5. Evaluar si las cepas aisladas de pozol, sometidas a estrés térmico expresan proteínas de membrana externa semejantes a las que se han relacionado con resistencia a la acidez.

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados en las pruebas microbiológicas fueron:

- Caldo Luria-Bertani (LB), medio complejo compuesto de 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L triptona y 5 g/L NaCl. (pH 7.3). Se esterilizó 15 min a 121°C en tubos con 4.5 ml de medio cultivo y se utilizó para obtención de cultivos bacterianos en fase estacionaria.
- Caldo LB ajustado a pH 3.0, 2.5 y 2.0 con HCl y a pH 3.0 con ácido láctico (al 0.85% de Aldrich).
- Placas de agar Luria (caldo LB adicionado con 1.5% de agar bacteriológico). Usadas para cuentas de *E.coli*.
- Solución salina estéril: NaCl 0.15N en agua destilada, como diluyente.

Se utilizó caldo Luria como medio de cultivo, ya que se sabe que *E.coli* crece mejor que otros microorganismos a valores bajos de pH en medios complejos (Hickey y Hirshfield, 1990). No se agregó glucosa al medio para limitar la producción de acidez.

### 3.2 MICROORGANISMOS USADOS

Las características y origen de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio se describen en la Tabla 2. Se usaron *E. coli* patógenas aisladas del pozol e identificadas por Sainz, (1998), pertenecientes al serotipo 088:H25, reportado como patógeno (Pedroso, 1993 y Kamlakar, 1995). Las cepas de *E.coli* 0157:H7 y K-12 y las de procedencia distinta a alimentos fueron suministradas por el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las cepas *E. coli* de origen clínico serotipo 088:H25 proceden de muestras del IMSS de pacientes con enfermedad diarreica con sangre y la cepa *E. coli* ambiental de serotipo 088:H25 fue obtenida en muestreos de aire de la ciudad de México por la Dra. Irma Rosas del Instituto de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM.

Conservación cepas:

Las cepas se conservaron a temperatura ambiente en tubos con agar soya tripticasa por dos meses, o en agar Dorset, por tiempo mayor a un año y a -70°C en viales con caldo soya tripticasa y glicerol al 50%. El agar Dorset se preparó homogenizando 20 huevos desinfectados en 950 ml de NaCl 0.15N, y 50 ml de glicerol, se sirvió en viales y se coaguló con inclinación a 85°C en ambiente húmedo.



Tabla 2. Microorganismos usados

No. CEPA	SEROTIP O	PROCEDENCIA
<i>E. coli</i> 095214 (Pz-1)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 095215 (Pz-2)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 095217 (Pz-3)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 095219 (Pz-4)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 095222 (Pz-5)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 095223 (Pz-6)	088:H25	pozol con 48h fermentación (Sainz, 1998)
<i>E. coli</i> 029358 (Eh-1)	0111ab:H-	Niños <2 años, Tlaltizapan, Morelos (Cravioto, 1990) (*)
<i>E. coli</i> 088267 (Eh-2)	0157:H7	CVD: Center vaccine development; Colección DEC (Whittam, 1993) (*)
<i>E. coli</i> 091816 (Eh-3)	0157:H7	INDRE, México D.F. (*)
<i>E. coli</i> 091986 (Eh-4)	0157:H7	INDRE México D.F. (*)
<i>E. coli</i> 097133 (CI-1)	088:H25	Muestra clínica: IMSS (*)
<i>E. coli</i> 097426 (CI-2)	088:H25	Muestra clínica: IMSS (*)
<i>E. coli</i> 096428 (Amb)	088:H25	Ciencias de la Atmósfera, UNAM (Rosas, 1997) (*)
<i>E. coli</i> K-12 14R519 (K-1)		Laboratorio Central de Salud Pública, Londres, UK (*)
<i>E. coli</i> K-12 092045 (K-2)		CVD: Center vaccine development, Baltimore (*)
<i>E. coli</i> K-12 HB101 087195 (K-3)		CVD: Center vaccine development, Baltimore (*)
<i>E. coli</i> K-12 HB101 090054 (K-4)		CVD: Center vaccine development, Baltimore (*)

(\*) Amablemente suministradas por el Cepario del Laboratorio Salud Pública, Facultad Medicina, UNAM.

### 3.3 SELECCIÓN DE CEPAS

Sainz en 1998 aisló 73 cepas de *E. coli* a partir de 10 de muestras de pozol de las cuales sobrevivieron 25 con valores de pH entre 3.85 y 4.77, a las 48 h de fermentación (Anexo 1). De éstas se consideró seleccionar para este trabajo 6 cepas EPEC con el serotipo 088:H25, provenientes de la muestra 1 por las siguientes razones:

- Esta muestra tiene el menor valor de pH a las 48h de fermentación de todas las estudiadas.
- Es la única muestra que exhibe permanencia de todas las cepas aisladas, a lo largo de las 48 h de fermentación.
- Varias cepas poseen factores de virulencia (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de virulencia de las cepas de *E. coli* resistentes a acidez aisladas de pozol preseleccionadas para la realización de este trabajo(\*).

		CARACTERÍSTICAS DE		PATOGENICIDAD
No. CEPA	SEROTIPO	CLASIFICACION	HIBRIDAC. SONDAS	PATRON ADHERENCIA
Pz-1	088:H25	EPEC		
Pz-2	088:H25	EPEC	Gene <i>eae</i>	
Pz-3	088:H25	EPEC	Gene <i>eae</i>	
Pz-4	088:H25	EPEC		
Pz-5	088:H25	EPEC	Gene <i>eae</i>	localizada
Pz-6	088:H25	EPEC		

(\*) Tomado de: Sainz, 1998.

Se realizaron análisis preliminares para seleccionar las cepas de trabajo; se contaba además con 3 cepas *E. coli* 088:H25, aisladas de ambientes diferentes al del pozol, 3 cepas *E. coli* 0157:H7, 1 cepa enterohemorrágica de *E. coli* serotipo 0111ab:H- y 4 cepas *E. coli* K-12, cepas de laboratorio que podrían fungir como control negativo para el estudio (Tabla 2).

#### 3.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA A LA ACIDEZ

Se utilizaron cultivos en fase estacionaria (Figura 1), incubados a 30°C durante 18 h en caldo Luria a pH 7.0. Se ajustaron a 50% de transmitancia, medida a 530 nm, que corresponden a una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> ufc/ml, agregando caldo Luria fresco estéril. Se inocularon 0.5 ml en series de 7 tubos ajustados a los distintos valores de pH para cada prueba y se incubaron a 30°C; se retiraron muestras a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h, para hacer cuentas en placa. Se realizó cuenta en placa inoculando por duplicado las placas de agar Luria con 0.1 ml de diluciones apropiadas en solución salina 0.15N; se extendió el inóculo con varilla de vidrio doblada flameada con alcohol y enfiada. Después de 18 a 24 h de incubación a 30°C, se realizaron las cuentas de ufc/ml. Se determinaron los porcentajes de sobrevivencia respecto a cada cultivo inicial, utilizando los logaritmos de las ufc y considerando como 100% la concentración inicial de microorganismos.

Se realizaron tres experimentos:

##### Experimento 1.

Determinación de la sobrevivencia a la acidez de *E. coli* aislada de pozol, en cada tratamiento de pH: 2.0, 2.5 y 3.0 ajustados con HCl y pH 3.0 ajustado con ácido láctico.

##### Experimento 2.

Comparación de la resistencia a la acidez de las cepas seleccionadas de *E. coli* aisladas de pozol, con *E. coli* 0157:H7 y K-12 HB101

### Experimento 3.

Comparación de la resistencia a la acidez de las cepas seleccionadas de *E. coli* aisladas de pozol, con cepas de serotipos semejantes procedentes de ambientes no ácidos: clínico y ambiental.

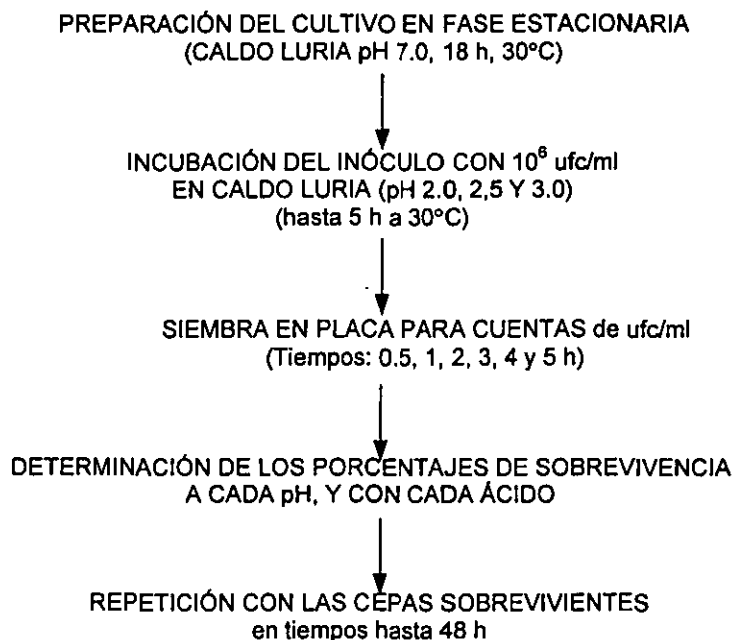


Figura 1. Procedimiento para determinación del porcentaje supervivencia a la acidez.

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para probar existencia o no de diferencias entre las medias de los distintos tratamientos y cepas usadas. Se establecieron las determinaciones para cada grupo de datos: cada cepa bajo los 4 tratamientos de pH, a lo largo de 5 horas de fermentación y cada pH comparando las 5 cepas usadas, a través del mismo tiempo. Se usó el análisis de varianza del programa SPSS, versión 4, bajo la opción de ANOVA unifactorial para cada una de las variables con  $\alpha$  de 0.01 y 0.05.
2. Se estableció una comparación múltiple de medias, utilizando método de Duncan para definir presencia de subgrupos con diferencias significativas entre cepas, tiempo de exposición a la acidez y tratamientos, utilizando el mismo programa estadístico.

### 3.6 DETERMINACION SEROLÓGICA DE SEROTIPOS DE *E.coli* DE CEPAS USADAS

Para descartar la posibilidad de alteraciones en los polisacáridos de la membrana externa de las cepas, tras la exposición de varias horas a condiciones fuertes de acidez, se realizó la determinación de su serotipo antes de la prueba y con las cepas sobrevivientes a pH de 2.0 con HCl.

#### Obtención del antígeno somático (O):

Se sembró cada cepa cubriendo toda la superficie en tubos inclinados de 16x150 mm con agar soya tripticasa ajustado a pH 7.0, para lograr buen crecimiento. Después de incubar a 37°C por 24 h, se desprendió el cultivo por adición de 10 ml de NaCl 0.15 N. La suspensión se transfirió a un segundo tubo que se llevó a calentamiento con vapor efluente durante 1 h para finalmente ajustar la turbidez de la suspensión al tubo tres del nefelómetro de McFarland. Después de enfriar se adicionó formalina a cada tubo hasta concentración final del 0.6%, para conservar el antígeno.

#### Obtención antígeno flagelar (H):

Para evaluar la movilidad de las cepas, se sembraron por picadura en tubos de 16x150 mm con medio semisólido y tubo de Craigie para evaluar la movilidad. Se incubaron a 30°C por 15 días o más, hasta observar crecimiento ascendente del fondo del tubo de Craigie hasta la superficie del medio. El crecimiento se transfirió con asa de la superficie del agar a un caldo de peptona de biotriptasa al 2% y se incubó 24h a 30°C. Se conservó igual que el antígeno somático, con 10 ml de formalina hasta concentración final del 0.6%. (El agar semisólido tiene 10g peptona de caseína, 3g extracto de carne, 80g gelatina bacteriológica, 5g NaCl, 4g agar-agar, por litro; se ajustó el pH a 6.9, se hirvió 2 minutos y se esterilizó con el tubo de Craigie 15 min. 121°C).

#### Serotipificación:

Las reacciones de aglutinación se realizaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo, con procedimiento establecido en el Laboratorio de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la UNAM; se usaron los sueros específicos (SERUNAM) obtenidos en conejo, determinándose los antígenos somáticos con una batería de 175 antígenos monovalentes, y los flagelares con 56 sueros específicos, diluidos 1:100 en NaCl 0.15 N.

En cada pozo se colocaron 100µl del suero monovalente correspondiente y 50 µl del antígeno somático o flagelar, según el caso. Las placas se cubrieron con plástico adherente para evitar la evaporación durante la incubación a 50°C, de 24 h para la determinación del antígeno somático y de 2 h para la del flagelar.

La presencia o ausencia de aglutinación se realizó con la ayuda de un aglutinoscopio. El establecimiento del título se hizo con posteriores diluciones de los sueros positivos, desde 1:100 hasta 1:12800, asignándose a cada cepa el serogrupo donde se observó reacción positiva con la dilución más alta del suero. El conjunto de la fórmula de antígenos obtenidos somático-flagelar (O-H), permitió establecer el serotipo de cada cultivo bacteriano.

### 3.7 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA ACIDEZ DE CEPAS SOMETIDAS A CHOQUE TÉRMICO

Se usó como medio de cultivo caldo Luria, a pH 7.0 para obtener el cultivo en fase estacionaria. La temperatura de cultivo fue 30°C y el choque térmico en baño de agua por 10 minutos a 48°C. El método es modificación del empleado por Wang y Doyle, (1998).

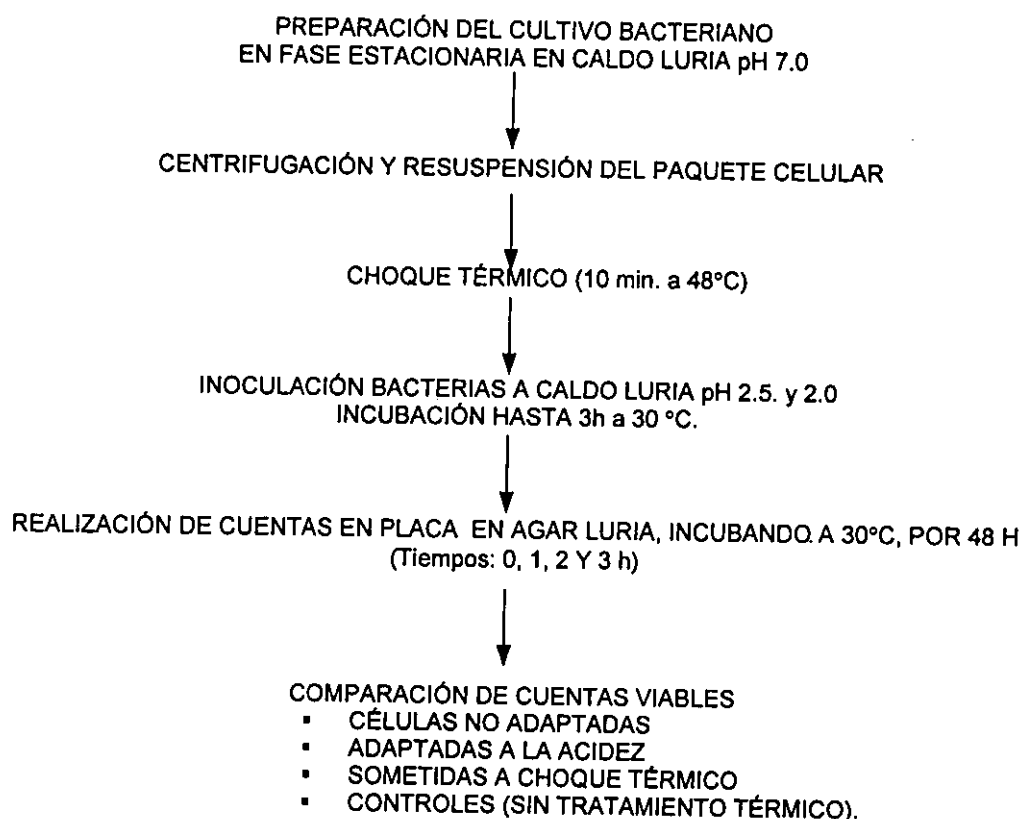


Figura 2. Procedimiento para la realización del choque térmico y determinación de la resistencia a la acidez

El cultivo bacteriano se preparó con dos transferencias a caldo Luria pH 7.0 fresco en días consecutivos antes del uso y cultivo nocturno de cada cepa en caldo Luria a 30°C antes del choque térmico (Figura 2). El cultivo final de 18 h de incubación se sedimentó por centrifugación a 4000 g/10 min a 4°C y se resuspendió en medio Luria fresco pH 7.0. Se ajustó a 50% de transmitancia, medida a 530 nm, que corresponde a una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> ufc/ml. El choque térmico se realizó por incubación en baño de agua a 48°C por 10 min; se transfirió 0.1 ml de células a tubos con 9.9 ml Luria acidificado con HCl a valores de pH de 2.5 y 2.0, y se incubaron hasta 3 horas a 30°C. Se hicieron cuentas en placas de agar Luria cada hora de las 0 a las 3 h por el método de superficie, incubando a 30°C, por 48 h. Se realizaron las cuentas de ufc/ml y se determinaron los porcentajes de sobrevivencia respecto a cada cultivo inicial, utilizando los logaritmos de las ufc, considerando como 100% la concentración inicial de microorganismos.

Se hicieron comparaciones de las cuentas viables entre células no adaptadas (*E. coli* 0157:H7, muestra clínica y ambiental) y adaptadas a la acidez (muestra de pozol) sometidas a choque térmico y controles (sin tratamiento).

### 3.8 OBTENCIÓN Y ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMPs)

Las células usadas fueron microorganismos sometidos a choque térmico y sin tratamiento. Se usó el método de Fedorka-Cray, modificado ligeramente por Wolf (1997).

El proceso para la obtención de proteínas de membrana externa (OMPs), esquematizado en la Figura 3, se realizó con la cosecha de células de 200 ml de cultivo de 18 h en caldo Luria a pH 7.0 a 37°C y agitación a 150 rpm, de cada cepa de *E. coli*. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 6.000 g/10 min a 4°C (Centrífuga Sorval RC5B plus), resuspendiendo el sedimento en 1 ml de amortiguador Hepes 10 mM, (pH 7.4).

El paquete celular fue sonificado en dos períodos de 1 min en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento y desnaturalización de las proteínas. El tiempo preciso de sonicación practicada con el equipo "vibra cell" Fisher (50 watt, 20% de salida) se determinó empíricamente, realizando extensiones en portaobjetos del sonificado y coloreando con Gram hasta observar al microscopio un porcentaje aceptable de rompimiento celular de alrededor de un 80%.

Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación a 9.700 x g/10 min en centrífuga Eppendorf 5415. Del sobrenadante se obtuvieron las membranas por ultracentrifugación (15.800 x g/30 minutos, a 4°C en Ultra Sorval RC), siendo luego solubilizadas utilizando 400 µl del detergente

sarcosyl al 1% en Hepes pH 7.4, incubando la mezcla a temperatura ambiente 30 min, con agitación suave. Con posterior ultracentrifugación (15.800 x g/30 minutos a 4°C) y lavado con 200 µl de Hepes pH 7.4, se obtuvo el sedimento final conteniendo los extractos de proteínas de membrana externa que se congeló porcionado en alícuotas a -20°C. o -80°C para su análisis de concentración de proteínas y visualización de las bandas correspondientes por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizada.

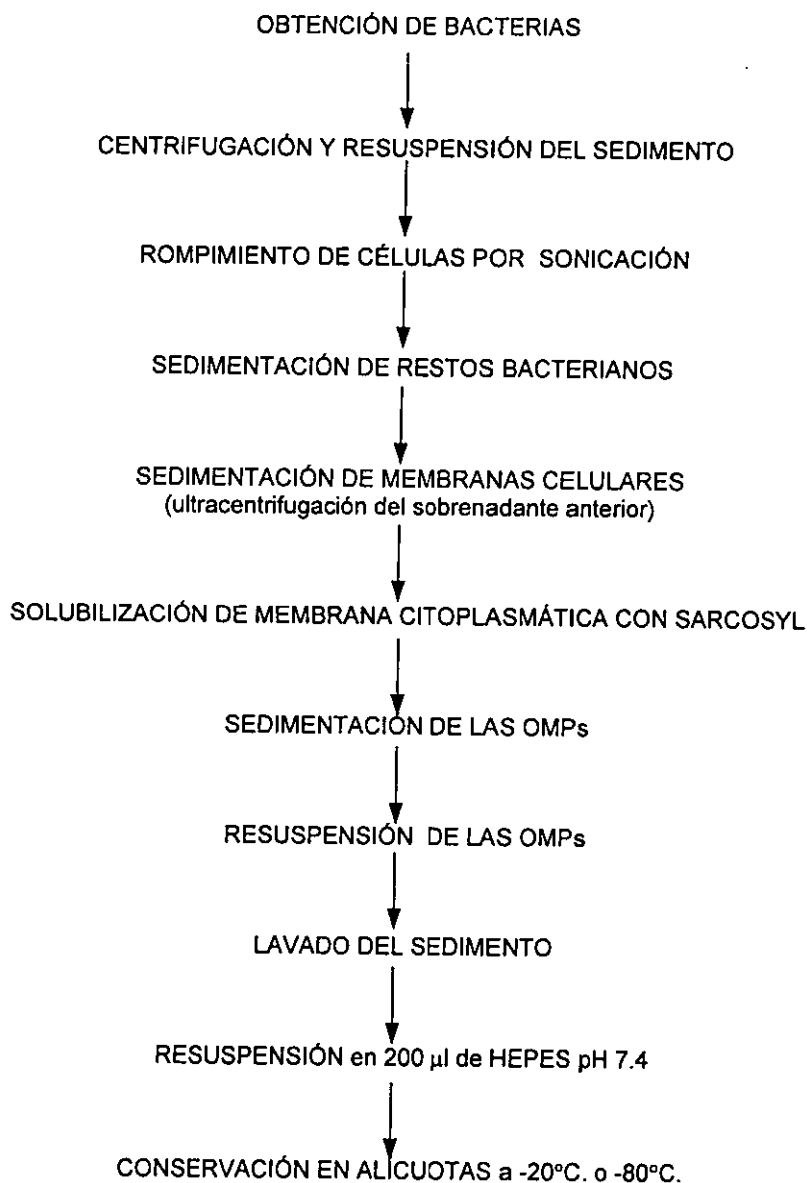


Figura 3. Procedimiento para la obtención de proteínas de membrana externa (OMPs)

La determinación de la concentración de proteínas en el extracto de membrana externa se realizó por el método de Bradford (Alexander y Griffith, 1993), en microplaca, usando un estándar de

albúmina bovina (1 mg/ml, 1:10) y 20  $\mu$ l de cada dilución 1:4 a 1:20 en PBS. Se diluyó el extracto de muestra en PBS 1:20 a 1:640 y se tomaron 20  $\mu$ l de cada dilución de muestra. Se agregó a todos los pozos 120  $\mu$ l de reactivo de Bradford (Azul de Coomassie en solución de ácido fosfórico y metanol) y se leyeron las densidades ópticas a 595 nm. Se graficó la curva de calibración, contra la que se determinó la concentración de cada muestra según factor de dilución.

## ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la separación por electroforesis de las proteínas obtenidas se usó la técnica del gel discontinuo de poliacrilamida de Laemmli, (1970) y las preparaciones se corrieron en la cámara Mini-Protean II de Bio-Rad. Para preparar el gel de separación al 15% se usaron 2.5 ml agua desmineralizada, 2.5 ml Tris/HCl 2.1M, pH 8.8, 100  $\mu$ l SDS al 10% (p/v), 5.0 ml acrilamida/bis al 30%, 50  $\mu$ l de persulfato de amonio fresco al 10% y 5  $\mu$ l de TEMED. Se transfirieron 4 ml de la solución a la celda de electroforesis, se llenó hasta borde superior con agua destilada y se permitió polimerizar al gel por lo menos por 1 hora.

El gel concentrador (4%), se preparó con 6.1 ml agua desmineralizada, 100  $\mu$ l SDS al 10%, 2.5 ml Tris/HCl 0.75M, pH 6.8, 1.33 ml de acrilamida/bis al 30%, 50  $\mu$ l de persulfato de amonio fresco al 10% y 10  $\mu$ l de TEMED. Se retiró el agua del gel de separación, agregándose mezcla del gel concentrador que se dejó polimerizar por una hora. Después se llenó la unidad de electroforesis con buffer pH 8.3.

Se calentaron 20  $\mu$ l OMPs por 5 min a 95°C en baño de agua, ajustándose dilución según concentración de OMPs a 30  $\mu$ l/ml en 20 $\mu$ l, con buffer de montaje. Se dispensaron 18 $\mu$ l de cada muestra por pozo muestras en pozos gel y se corrió electroforesis a 200 volts por 45 minutos a temperatura ambiente. Se usaron marcadores de proteínas de bajo peso molecular de Bio-Rad, para la estimación del peso y posición las bandas encontradas.

Se coloreó con agitación suave con solución colorante/fijadora de Azul de Coomassie, al 0.1% en metanol ácido, posteriormente se decoloró con varios cambios de metanol 40% y ácido acético 10% y se fijó el gel húmedo sobre celofán o papel filtro. Los geles coloreados fueron explorados con el ScanJet IIC (Hewlett-Packard) y se realizaron análisis de densitometría usando el programa Quantity One del Fluor S de Bio-Rad.

Se realizaron electroforesis para proteínas de membrana externa obtenidas de *E.coli* antes y después del tratamiento térmico de 10 min a 48°C. De esta manera se compararon los patrones de las OMPs obtenidos, entre las distintas cepas y para cada una antes y después del calentamiento.



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 SELECCIÓN DE CEPAS

Se seleccionaron seis cepas 088:H25 aisladas de pozol para realizar el tratamiento ácido (pH 3.0) en caldo Luria, ajustado con HCl. Los resultados de porcentaje de sobrevivencia obtenidos a las 5 horas de cultivo muestran que cinco de las seis cepas sobrevivieron hasta este tiempo (Tabla 4). Estudios previos establecen (Gorden y Small, 1992) que con un 10% de sobrevivencia a pH 2.5 durante dos horas se puede considerar a una cepa resistente. En este ensayo de selección se decidió utilizar las cepas que presentaran sobrevivencia mayor del 50%. Con este criterio se seleccionaron las cepas Pz-3, Pz-5 y Pz-6 que fueron viables con porcentajes entre el 60 y el 80%.

Tabla 4. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas *E. coli* aisladas de pozol, en caldo Luria con pH 3.0 ajustado con HCl.

<i>E. coli</i> 088:H25	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	Cepa Seleccionada
Pz-1	65	60	60	45	30	
Pz-2	60	50	48	35	30	
Pz-3	78	78	77	76	74	✓
Pz-4	52	39	38	15	0	
Pz-5	88	88	87	86	85	✓
Pz-6	83	79	66	65	62	✓

Con el propósito de realizar un estudio comparativo se incluyeron tres cepas de *E. coli* del serotipo 0157:H7 que se sabe son bacterias resistentes al ácido de manera notable (Chart, 2000) y una cepa 0111ab:NM del grupo EHEC.

Tabla 5. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas *E. coli* EHEC, en caldo Luria a pH 3.0 ajustado con HCl.

<i>E. coli</i> EHEC	Serotipo	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	Cepa Seleccionada
Eh-1	0111ab:H-	60	55	50	40	30	
Eh-2	0157:H7	90	90	90	89	75	✓
Eh-3	0157:H7	85	75	70	70	68	
Eh-4	0157:H7	86	80	70	68	65	

Los resultados obtenidos con estas cuatro cepas mostraron que todas las cepas 0157 presentan porcentajes de sobrevivencia mayor al 50% a las cinco horas. Con respecto a la cepa 0111,

aunque presentó el mismo porcentaje de sobrevivencia, éste sólo se observó hasta las tres horas de tratamiento (Tabla 5).

Tabla 6. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas *E. coli* ambiental y clínicas en caldo Luria a pH 3.0, ajustado con HCl.

Cepa <i>E. coli</i>	procedencia	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
097133 (CI-1)	IMSS	87	88	88	84	80
097426 (CI-2)	IMSS	87	85	80	80	75
096428 (Amb)	Inst. C.de la Atm.	89	56	48	44	42

De la colección de cepas del Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, se seleccionaron cepas 088:H25 de distinto origen: dos fueron de origen clínico (CI-1 y CI-2) y una aislada del aire en la Ciudad de México (Amb). Estas cepas 088:H25 de origen ambiental y clínico se sometieron al mismo tratamiento ácido para evaluar su capacidad de sobrevivencia a pH 3.0. Al respecto se observó que las cepas de origen clínico mostraron porcentajes de sobrevivencia del 80 (CI-1) y 75% (CI-2) y la ambiental del 42% (Tabla 6). Como se puede observar a pH 3.0 además de las cepas 0157:H7 consideradas como bacterias con propiedades para sobrevivir a pH ácido, *E. coli* del serotipo 088:H25, de diferente origen, presentan propiedades de ácido tolerancia.

Tabla 7. Porcentajes de sobrevivencia a la acidez de cepas *E. coli* K-12, en caldo Luria a pH 2.0, 2.5 y 3.0 ajustado con HCl.

<i>E. coli</i> K-12	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	Cepa Seleccionada
pH 3.0						
K-1	80	80	78	73	68	
K-2	84	84	80	64	60	
K-3	95	89	89	83	80	
K-4	63	57	25	25	0	✓
pH 2.5						
K-1	98	94	85	85	80	
K-2	94	94	94	82	79	
K-3	95	89	84	73	70	
K-4	84	53	50	50	0	✓
pH 2.0						
K-3	55	0	0	0		
K-4	21	0	0			✓

Como control negativo de crecimiento a pH ácido se utilizaron tres cepas *E. coli* K12 (K-1, K-2 y K-3). Resultó interesante observar que a pH 3.0, las tres cepas presentaron sobrevivencia superior al

60% a las 5 horas de inoculación. Por tal motivo se decidió trabajar con valores de pH menores (2.0 y 2.5) y ensayar con otra cepa K12 (K-4). La cepa seleccionada fue una *E. coli* HB101 (K-4), que incluso fue sensible al pH 3.0 (Tabla 7).

En el estudio las bacterias se expusieron al pH ácido durante la fase de crecimiento estacionaria tardía, por ser la fase en la que de acuerdo a algunos reportes se presenta la mayor posibilidad de tolerancia a la acidez. Benjamin y Datta (1995) demostraron la alteración de la expresión de genes, cuando la célula entra en la fase estacionaria de crecimiento; en *E. coli* 0157:H7 observaron mayor tolerancia a la acidez a partir de células en fase estacionaria tardía (cultivo nocturno), la cual disminuía hasta mil veces cuando las células estaban en la fase exponencial media. Advirtieron un segundo pico de tolerancia a la acidez, al inicio de la fase estacionaria, con crecimiento 100 veces menor que el de la fase estacionaria tardía.

#### 4.2 COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA ACIDEZ

Los ensayos de resistencia a la acidez se realizaron con las tres cepas de pozol seleccionadas, sin embargo para establecer comparaciones de cepas únicas, y considerando que los resultados fueron similares en las tres cepas, se presentan los correspondientes a una de éstas (Pz-3). Los promedios de las ufc y de los porcentajes de sobrevivencia calculados con sus logaritmos, se presentan en los anexos 2 a 4. Las desviaciones estandar de las pruebas de sobrevivencia a la acidez estuvieron entre 0.47 y 7.12.

Tabla 8. Comparación de los porcentajes de sobrevivencia de cepas de *E. coli* en una hora de cultivo en caldo Luria con pH ácido.

CEPA	pH 3.0 con HCl	pH 2.5 con HCl:	pH 2.0 con HCl:	pH 3.0 con ac. Láctico:
<i>E. coli</i> 0157:H7 (Eh-2)	90 %	97 %	17 %	43 %
<i>E. coli</i> 088:H25 (Cl-2)	87 %	99 %	86 %	79 %
<i>E. coli</i> 088:H25 (Amb)	89 %	81 %	60 %	65 %
<i>E. coli</i> 088:H25 (Pz-3)	78 %	98 %	72 %	70 %
<i>E. coli</i> K-12 HB101K-4	63 %	84 %	0 %	0 %

Los resultados de sobrevivencia en caldo Luria con pH ácido fueron variables dependiendo del tiempo, del ácido con que se reguló la acidez, así como el serotipo y el origen de la cepa (Anexos 3 y 4); en la Tabla 8 se resumen los porcentajes obtenidos a la hora de cultivo en los medios con cada valor de pH, tiempo en que la cepa K-4, considerada control negativo no presenta sobrevivencia. Así se observa que las cepas 088:H25 de origen clínico, la aislada del ambiente y

de pozol mantuvieron su viabilidad de modo muy similar (60 a 99%) a todos los valores de pH. La cepa 0157:H7, aunque presentó sobrevivencia de 90 y 97% con el medio ajustado con ácido clorhídrico a pH 2.5 y 3.0, disminuyó la viabilidad a 17% a pH 2.0 y a 43% cuando se usó ácido láctico.

Al realizar el análisis de la resistencia a la acidez entre las diferentes cepas 088:H25 previamente seleccionadas (pozol, ambiental y clínica) en caldo Luria a pH 3.0 ajustado con HCl, a lo largo de 5 horas de cultivo, se observó que los porcentajes de sobrevivencia, con excepción de la cepa ambiental (que mostró menor porcentaje), fueron similares (Figura 4).

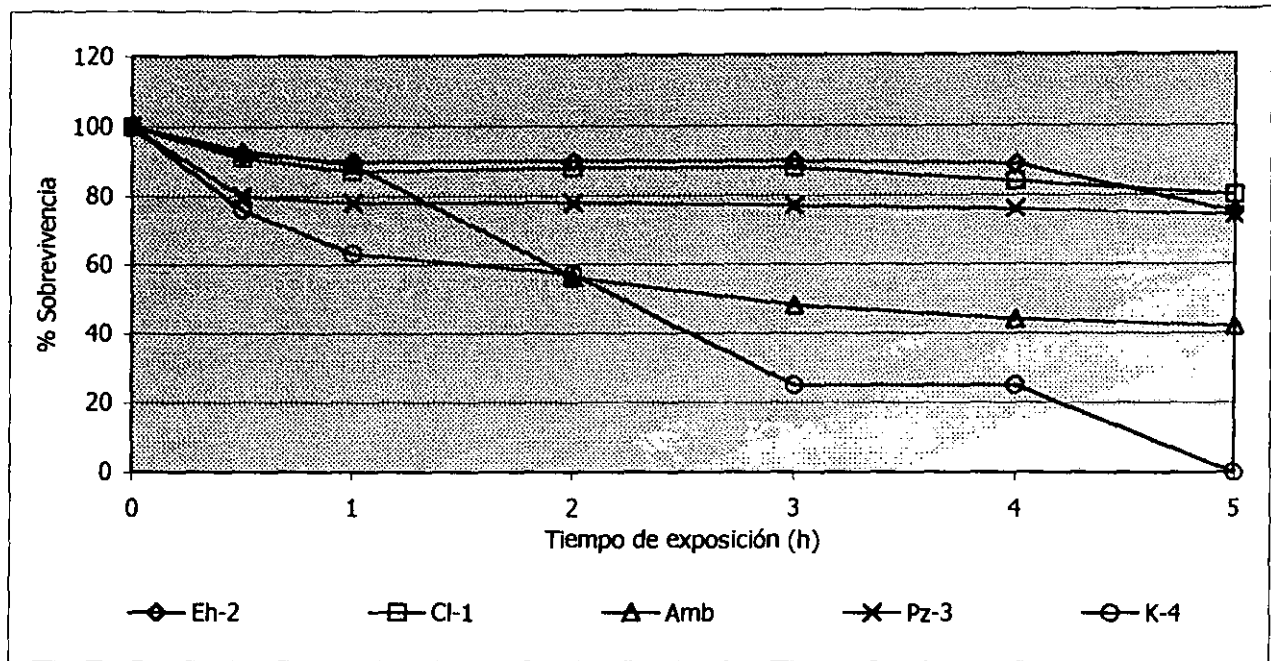
Cuando el pH usado fue de 2.5 (ajustado con HCl), se observó sobrevivencia similar a las 4 horas con las cepas de *E. coli* de pozol (83%) y *E. coli* 0157 (82%). Un resultado no esperado fue el hecho de que la cepa de origen ambiental 088, que al cultivarse previamente a pH 3.0 mostró 42% de sobrevivencia a las 5 horas, en esta fase del estudio se mantuvo viable en mayor proporción (63%); la cepa de origen clínico presentó viabilidad del 89% en el mismo tiempo de incubación (Figura 5).

Creciendo en caldo Luria con el pH ajustado a 2.0 con HCl (Figura 6), las tres cepas 088:H25 (Cl-1, Pz-3 y Amb) exhibieron resistencia las 3 horas, con porcentajes de 73%, 35% y 50% respectivamente. Por otro lado las cepas clínica y ambiental sobrevivieron a las 4 horas con 37 y 13%. Los valores obtenidos con estas cepas fueron superiores a los que mostró *E. coli* 0157:H7 que sólo sobrevivió la primera hora (17%).

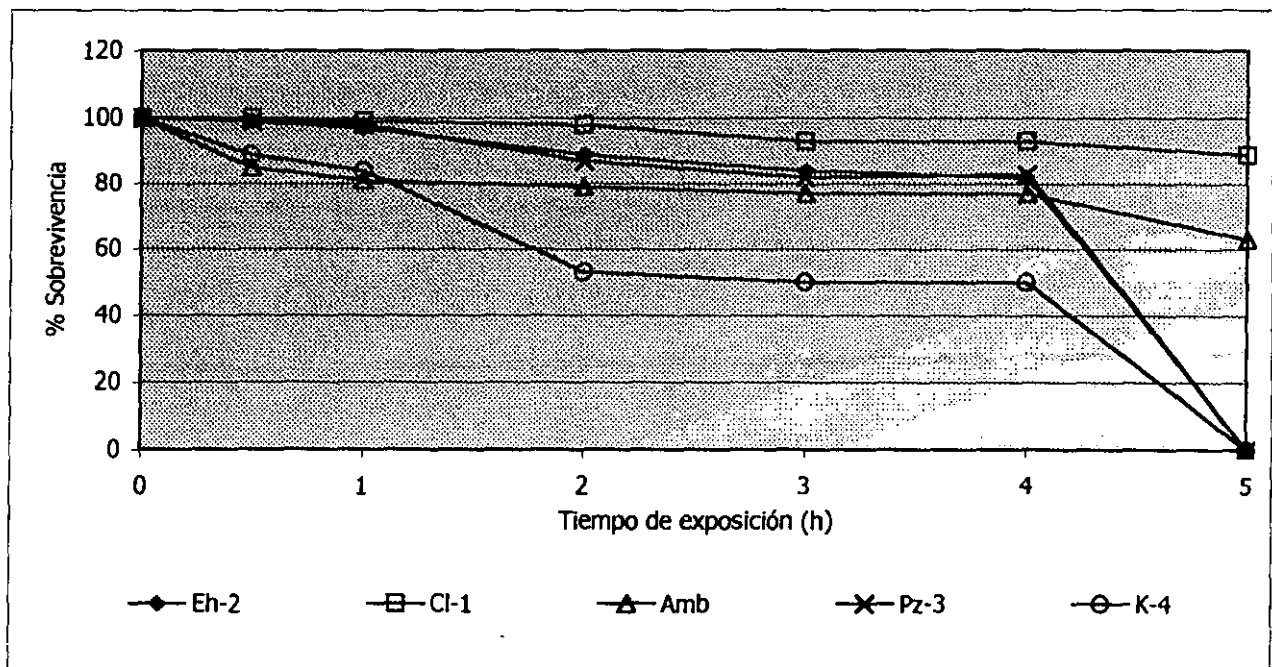
Los resultados de tolerancia y sobrevivencia a pH ácido se modificaron cuando el pH del medio se ajustó con ácido láctico. En estas condiciones de cultivo la inhibición del crecimiento bacteriano fue más pronunciada (Figura 7). Al ajustar el pH a 3.0 se observó inhibición desde las 2 horas de cultivo con 28% de sobrevivencia para Pz-3. Con respecto a la cepa *E. coli* 0157:H7, ésta se mantuvo viable sólo 15% y se obtuvo sobrevivencia similar con las cepas clínica, ambiental y de pozol. *E. coli* K12 en cualquiera de las condiciones mostró mayor susceptibilidad al tratamiento, presentando sobrevivencia menor que las otras cepas.

La comparación del mismo valor de pH ajustado con distintos tipos de ácidos, muestra la capacidad de penetración al citoplasma de los ácidos orgánicos gracias a su forma no protonada. El porcentaje y el tiempo de sobrevivencia al mismo pH pero ajustado con ácido láctico disminuyó de manera importante para *E. coli* 0157:H7 (Figuras 4 y 7). Resultados similares se observaron con las cepas 088:H25 cuando se utilizó ácido láctico para ajustar el pH del medio.

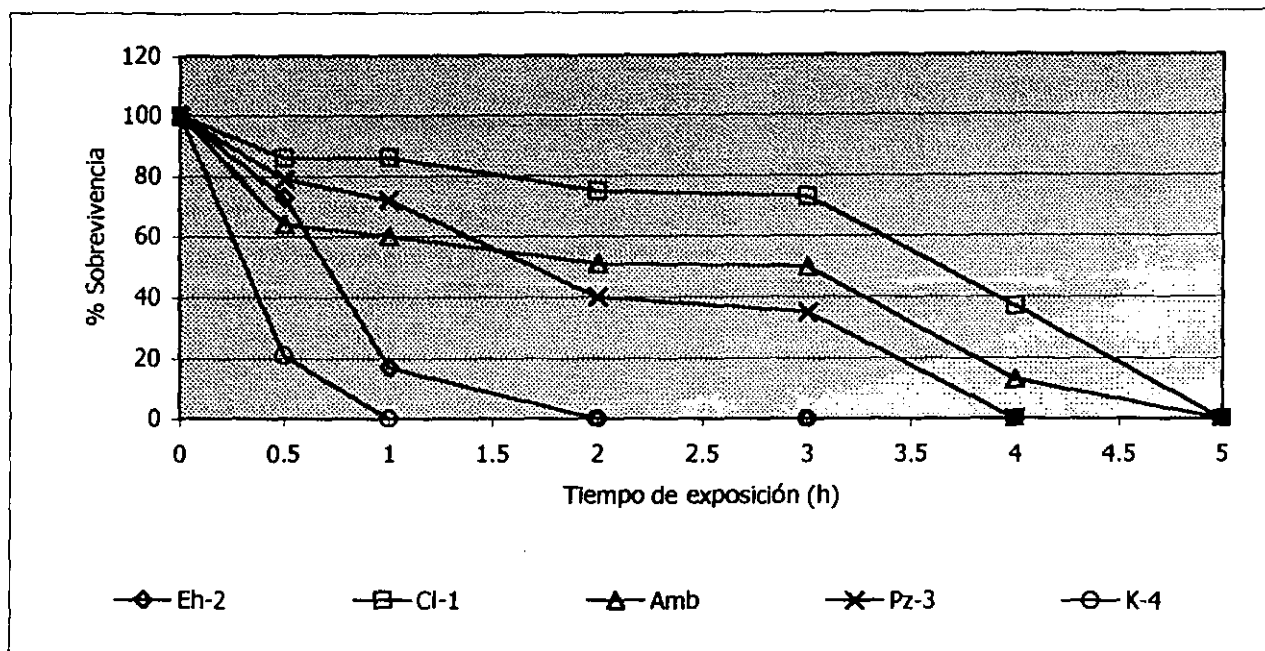
**Porcentaje de sobrevivencia de las cepas de *Escherichia coli* a tratamientos con diferentes condiciones de acidez**



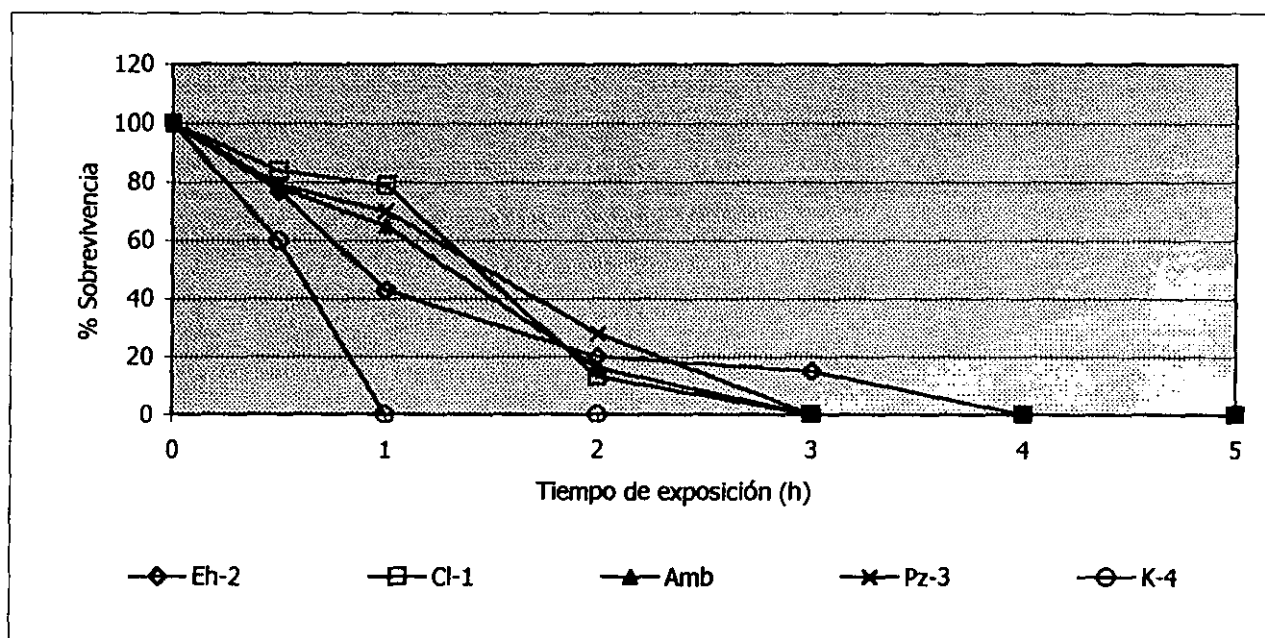
**Figura 4. Resistencia a pH 3.0 ajustado con HCl**



**Figura 5. Resistencia a pH 2.5 ajustado con HCl**



**Figura 6. Resistencia a pH 2.0 ajustado con HCl**



**Figura 7. Resistencia a pH 3.0 ajustado con ácido láctico**

Se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) unifactorial. El análisis de los valores de F experimentales indican que son los efectos de pH y tiempo de exposición los principales involucrados en las diferencias significativas encontradas.

Tabla 9. Análisis de varianza unifactorial para determinar la validez de los resultados de sobrevivencia de diferentes cepas de *E. coli* cultivadas en medio con pH ácido.

	F crítico $\alpha$ 0.05	F crítico $\alpha$ 0.01	Valor F (experimental)	Diferencia significativa
% de sobrevivencia vs cepas	2.62	3.83	5.52	si
% de sobrevivencia vs pH	2.62	3.83	48.23	si (muy alta)
% de sobrevivencia vs tiempo	2.12	2.85	48.44	si (muy alta)

El valor de F que analiza la varianza de porcentaje de sobrevivencia contra las cepas está muy cercano al obtenido en las tablas de F. La desviación se puede atribuir al comportamiento de la cepa control negativa que difiere de manera notable de las otras 4 cepas (Tabla 9).

Estos datos indican un claro efecto de variación de los resultados no atribuible al azar sino a los factores analizados, dado lo cual se decidió aplicar la prueba de rangos múltiples, para determinar con precisión dónde están las diferencias. Se usó la prueba creada por D.B. Duncan, para muestras de igual tamaño (Berenson, 1996), que establece las medias de porcentaje de sobrevivencia que tienen o no diferencias significativas para cada variable. La descripción de estas variables se detalla en el Anexo 5.

Tabla 10. Comparación de porcentaje de sobrevivencia observado en las diferentes cepas analizado por la prueba de Duncan.

$\alpha$ 0.05			$\alpha$ 0.01			Grupos
K-4	(37.6)*	-a-**	K-4	(37.6)	-a-	A
Eh-2	(58.3)	-b-	Eh-2	(58.3)	-b-	B
Amb	(58.8)	-b-	Amb	(58.8)	-b-	
Pz-3	(61.3)	-b-	Pz-3	(61.3)	-b-	
			CI-1	(72.3)	-b-	
Pz-3	(61.3)	-c-				C
CI-1	(72.3)	-c-				

\*En paréntesis los valores de las medias de los porcentajes de sobrevivencia.

\*\*letras iguales = semejanza; letras distintas = diferencia

La cepa de origen clínico fue en promedio la que mostró mayor resistencia a la acidez con una media de 72.3, seguida de la de pozol y la ambiental (Tabla 10). Para  $\alpha$  0.05, no hay diferencias

significativas entre la cepa de pozol y la clínica (Grupo C), ni entre la de pozol, la 0157 y la ambiental (Grupo B). Resulta interesante observar que la cepa aislada de pozol presenta un comportamiento dual, pudiendo incluirse en ambos grupos (B y C). También se pudo observar que con  $\alpha$  0.01 no se presentan diferencias significativas entre las cepas patógenas, pero sí cuando éstas se comparan con la cepa de *E.coli* K12, que conformaría el grupo A. Con  $\alpha$  0.05 se encontraron diferencias significativas entre los grupos B y C.

Tabla 11. Comparación de porcentaje de sobrevivencia observado en los diferentes valores de pH analizado por la prueba de Duncan.

medias de % de sobrevivencia	$\alpha$ 0.05	$\alpha$ 0.01	Grupos
35.3	pH 3.0 con ácido láctico pH -a-*	pH 3.0 con ácido láctico -a-*	A
40.9	pH 2.0 con HCl -a-	pH 2.0 con HCl -a-	
75.5	pH 3.0 con HCl -b-	pH 3.0 con HCl -b-	B
78.9	pH 2.5 con HCl -b-	pH 2.5 con HCl -b-	

\* (letras iguales = semejanza; letras distintas = diferencia)

Al comparar los resultados de sobrevivencia en medios con diferentes valores de pH se encontró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos a pH 2.0 con HCl y 3.0 con ácido láctico (grupo A), ni entre los tratamientos con HCl a pH 2.5 y 3.0 (grupo B), como se observa en la Tabla 11. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los dos subgrupos de tratamiento indicados (A y B), en las dos probabilidades del 95% y del 99% analizadas. Se demuestra la diferencia de comportamiento respecto al poder sobre las células de los ácidos orgánicos e inorgánicos, teniendo los primeros mayor efecto a menor acidez.

Tabla 12. Comparación del porcentaje de sobrevivencia observado en los diferentes tiempos de exposición al ácido, analizado por la prueba de Duncan

medias de % de sobrevivencia	$\alpha$ 0.05	$\alpha$ 0.01	Grupos
21.2	5 h -a-*	5 h -a-	A
38.5	4h -b-	4 h -b-	B
44.4	3h -b-	3 h -b- 2 h -b-	
44.4	3 h -c-	1 h -c-	C
50.9	2 h -c-	0.5 h -c-	
68.3	1h -d-		D
80.4	0.5 h -e-		E

\* (letras iguales = semejanza; letras distintas = diferencia)



Comparando los porcentajes de sobrevivencia obtenidos a lo largo del tiempo, se observan diferencias significativas muy marcadas presentes durante los tratamientos a pH ácidos, especialmente entre los periodos de 4 y 5 horas y entre 1 y 2 horas (Tabla 12) .

El análisis multifactorial de varianza es un modelo estadístico para probar las consecuencias de trabajar con dos o más variables independientes en un solo diseño experimental. Cada variable independiente (factor) presenta dos o más niveles; entre los diversos niveles de cada factor, las pruebas de significación reciben el nombre de efectos principales. Todos los efectos que se deben a la combinación de los factores, se llaman efectos de interacción, que pueden ser significativos o no. Cuando se realizó este análisis se observó que los efectos evaluados de manera independiente mostraron un valor de F notablemente mayor que cuando se analizaron las interacciones (Tabla 13). El ensayo indica numéricamente la mayor contribución en la respuesta, de los efectos principales o factores individuales que sus interacciones; esto se observa claramente en la columna con el porcentaje de aporte de cada efecto en la respuesta.

Tabla 13. Análisis multifactorial de varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS LIBERTAD	F Nivel 0.05	F Nivel 0.01	VALOR F EXPERIMENTAL	% EFECTO CONTRIBUCIÓN
EFECTOS PRINCIPALES					
cepas	4	2.39	2.36	71.23	11.6
tratamientos pH	3	2.62	3.83	292.72	47.6
tiempo	6	2.12	2.85	234.29	38.0
INTERACCIONES					
cepas-pH	12	1.78	2.73	7.68	1.1
cepas-tiempo	24	1.54	1.84	3.13	1.2
pH-tiempo	18	1.60	1.92	18.72	0.5

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que la cepa 088:H25 aislada de pozol presenta una resistencia a la acidez comparable a la de la *E. coli* 0157. *E. coli* 0157:H7 es un patógeno importante en países desarrollados, pero no se ha identificado como un problema de salud en países en desarrollo. Las cepas de *E. coli* 088 han sido aisladas de pacientes con diarrea en India y Brasil (Gomes y col. 1989; Kamlakar y Patak, 1995); estudios en el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, muestran que este serogrupo también se aísla en la república Mexicana tanto de alimentos, como de muestras clínicas y ambientales. Era de esperar que sería mayor la resistencia a la acidez de la cepa aislada de pozol, que las de origen clínico y ambiental por la posibilidad de habituación a su ambiente. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un comportamiento de resistencia a la acidez similar en todas las cepas 088 analizadas e incluso superior en algunos casos a la observada con la cepa 0157 (Tabla 8). La alta

resistencia a la acidez mostrada por la cepa ambiental resulta por demás interesante y sugiere la importancia de continuar su estudio y dilucidar sus mecanismos de adaptación por las implicaciones que para la salud pública pueden representar cepas con estas características que pueden diseminarse por el aire.

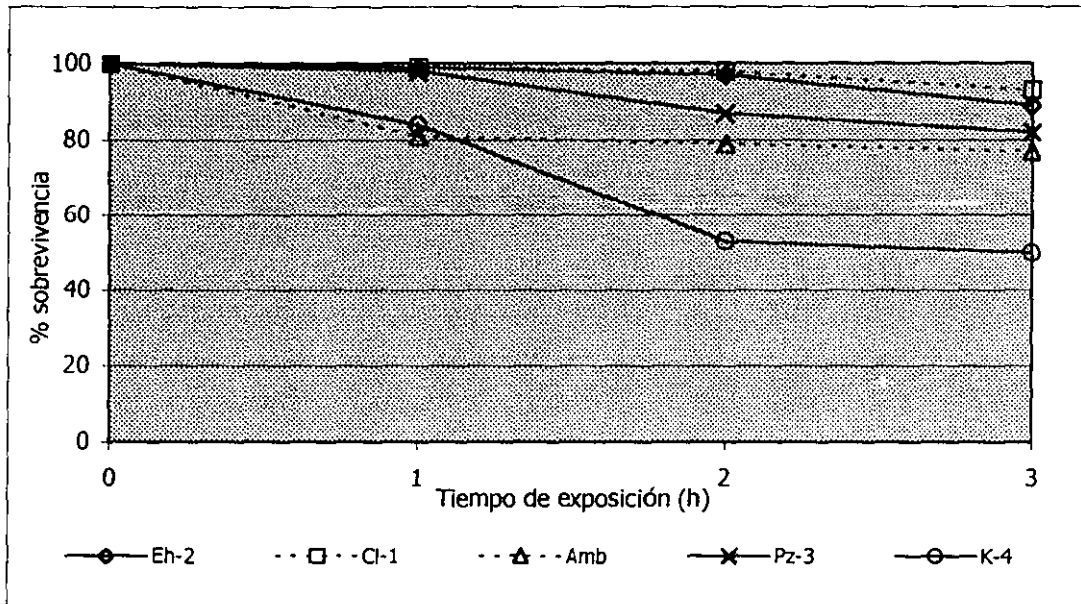
#### 4.3 CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CEPAS DE *E. coli* RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO ÁCIDO

Se realizaron pruebas de tipificación serológica de los antígenos somático y flagelar de cada una de las cepas incluidas en el estudio de resistencia a la acidez, para confirmar tipo antigénico original y evaluar si el estrés ácido inducía cambios en la expresión de los antígenos somático (O) y flagelar (H). La obtención de los antígenos se realizó a partir de cultivos resistentes a pH 3.0 ajustado con ácido láctico y cultivados a pH 7.0; los resultados obtenidos en las reacciones de aglutinación mostraron que el tratamiento ácido no ocasiona cambios en la expresión de los antígenos referidos, sugiriendo que la regulación de la expresión de éstos no es modificada por cambios ambientales relacionados con la acidez. Aunque no se observaron cambios antigénicos, al realizar los ensayos de titulación de la respuesta de aglutinación se encontró que se requieren concentraciones más altas del suero después del tratamiento para obtener una buena respuesta (Anexo 6).

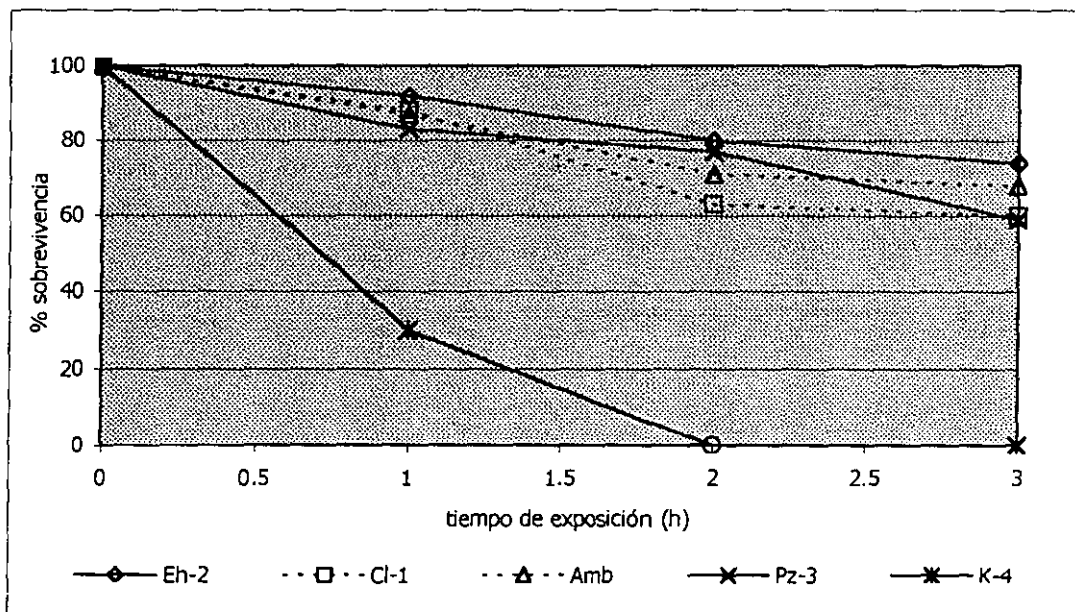
#### 4.4 RESISTENCIA A LA ACIDEZ DE CEPAS SOMETIDAS A CHOQUE TÉRMICO

Estudios previos con *E. coli* 0157:H7 (Wang y Doyle, 1998), refieren que cuando esta bacteria se somete a estrés térmico moderado, incrementa su capacidad de resistencia al ácido, relacionando lo anterior con la expresión de dos proteínas de superficie de bajo peso molecular. Para conocer si un evento similar se presenta en las cepas incluidas en este estudio, previo al cultivo de las bacterias en caldo Luria acidificado, éstas se incubaron en baño María a 48°C durante 10 minutos. Los resultados de sobrevivencia obtenidos con y sin tratamiento térmico, utilizando caldo Luria ajustado con HCl a pH 2.5 no mostraron diferencias en ninguna de las cepas de *E. coli* 088:H25 (Figuras 8 y 9). Con respecto a la cepa K12, sometida al mismo tratamiento (Anexo 7), se observó que esta cepa después del choque térmico fue más susceptible al pH ácido. Por otro lado al realizar el mismo tratamiento a 48°C y posteriormente cultivar en caldo Luria a pH 2.0, se observó un incremento importante en la sobrevivencia a la acidez, tanto de la cepa de pozol, como de la 0157 (Figuras 10 y 11).

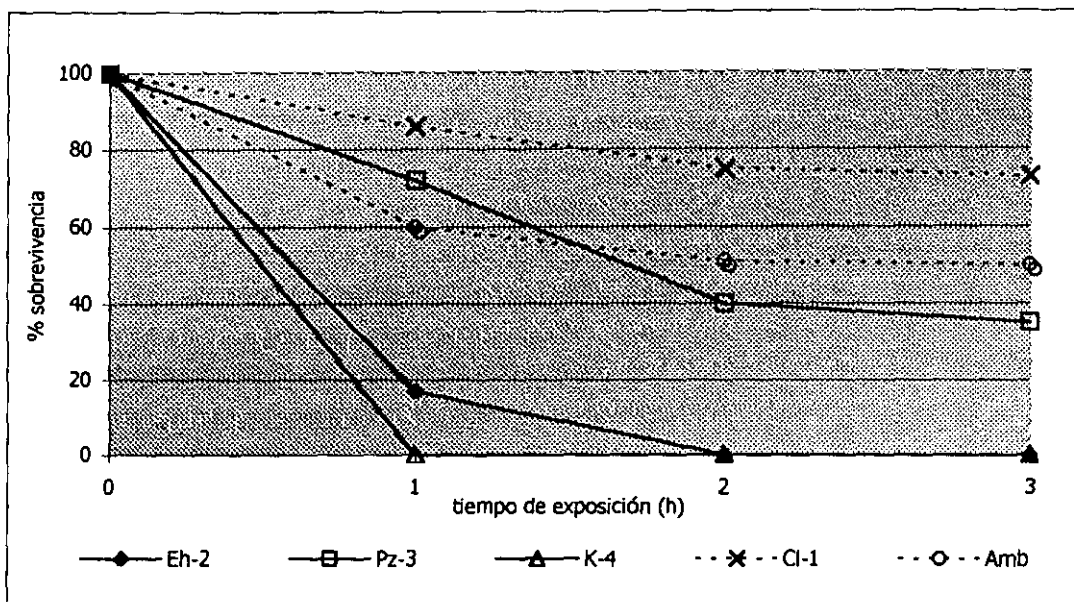
**Porcentajes de sobrevivencia de las cepas de *Escherichia coli* antes y después de choque térmico**



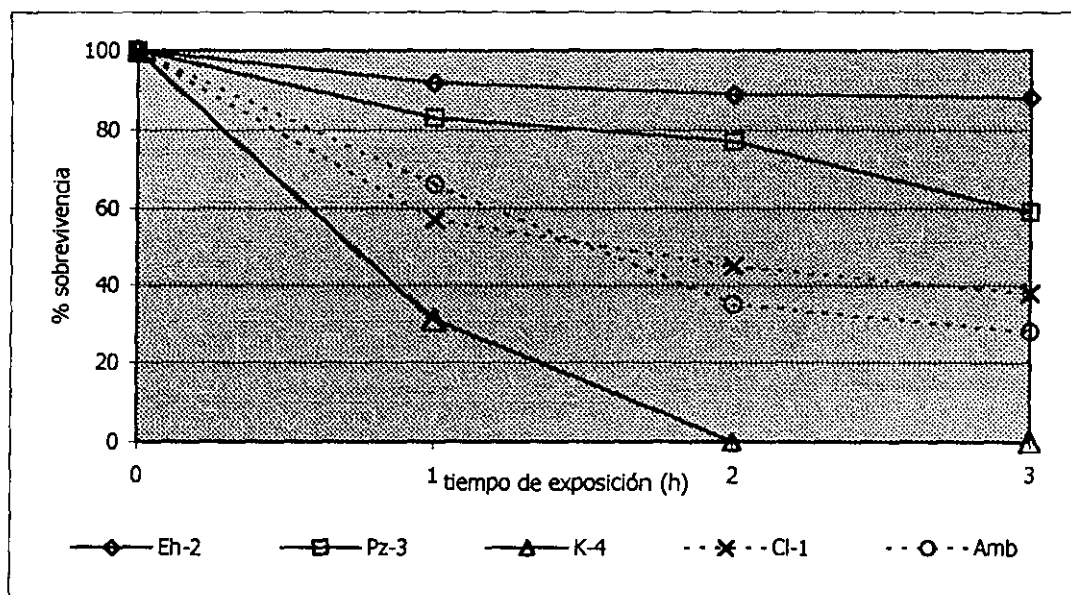
**Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.5 sin choque térmico.**



**Figura 9. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.5 posterior al choque térmico.**



**Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.0 previa al choque térmico.**



**Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia en caldo Luria a pH 2.0 posterior al choque térmico.**

Con respecto a las cepas clínicas y ambiental, que habían mostrado tolerancia a la acidez después de la exposición a 48°C, no sólo no se observó aumento en la sobrevivencia, sino que por el contrario, ésta disminuyó, lo que hace suponer la existencia de mecanismos de resistencia a la acidez distintos a los de la cepa de pozol y 0157.

*E. coli* 0157:H7 presenta mecanismos de protección a la acidez inducidos por otros factores de estrés como la temperatura (Bearson y col. 1990). En este estudio se muestra como la cepa 088:H25 aislada de pozol presenta un comportamiento parecido al descrito para *E. coli* 0157:H7. La observación resulta de gran interés por el hecho de que el serogrupo 088 ha sido relacionado con la etiología de la diarrea en diversas partes del mundo (Pedroso y col. 1993; Kamlakar y Pathak, 1995). Considerando el que se haya aislado de un alimento de uso muy difundido en el sureste de la república Mexicana y el hecho relacionado con la temperatura predominante en estados como Tabasco, Chiapas y Campeche, la cual fluctúa entre 30 y 40°C, se puede resaltar la importancia de la resistencia a la acidez de bacterias aisladas de alimentos ácidos y cómo el consumo de éstos mismos puede ser fuente importante en la transmisión de microorganismos causantes de enfermedad intestinal.

Benito y col. (1999) han reportado las variaciones en la resistencia natural de aislamientos de *E. coli* 0157:H7 a presiones hidrostáticas altas, calentamiento medio y otros tipos de estrés; comprobaron que cepas aisladas de casos clínicos de pacientes con infecciones transmitidas por alimentos y otras fuentes, mostraban amplias diferencias en la resistencia a la presión hidrostática; las cepas más resistentes a ésta, eran también más resistentes al calentamiento que otras cepas. Una cepa representativa de resistencia a presión era simultáneamente más tolerante a estrés ácido, oxidativo y osmótico, que otra sensible a la presión. La mayoría de estas diferencias se observaron sólo en bacterias en fase estacionaria, con la única excepción de la resistencia a la acidez que también fue aparente en la fase exponencial. Resultados preliminares del estudio mencionado sugieren que las diferencias en tolerancia a la presión entre las cepas pueden estar relacionada con diferencias en susceptibilidad a daño a la membrana.

En este estudio, el antecedente reseñado puede llevar a la conclusión del potencial peligro de resistencia que adquieren las cepas patógenas por su permanencia habitual en alimentos ácidos. Por lo anterior se puede considerar que este tipo de bacterias representan un peligro potencial para la salud, ya que no obstante encontrarse en un alimento ácido y estar sometidas a situaciones variadas de estrés, éstas podrían colaborar en el incremento de tolerancia a tales condiciones.

La capacidad de los microorganismos para desarrollar respuestas de adaptación a estrés debe ser considerada en las investigaciones de permanencia de microorganismos en alimentos. Es

importante contemplar el uso de células adaptadas o bajo estrés, en vez de cultivos normales en crecimiento exponencial, que pueden representar inadecuadamente su estado de sobrevivencia en los ambientes naturales.

#### 4.5 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA INDUCIDAS POR CHOQUE TÉRMICO

Para conocer si el estrés térmico inducía la expresión de proteínas de superficie relacionadas con la tolerancia a ambientes ácidos (Wang y Doyle, 1998), se analizaron los patrones de proteínas de membrana externa en las cepas de *E. coli* antes y después de choque térmico (Figuras 12 a 14).

La membrana externa tiene por lo menos 10 proteínas consideradas como más abundantes y 50 que se presentan en menor cantidad, según hallazgos de análisis SDS-PAGE (Givskov, 1994). En este estudio se observaron patrones de OMPs para cada cepa, identificándose algunos cambios posterior al choque térmico. Al observar la electroforesis de las proteínas de la membrana previas al choque térmico (Figura 12), en la cepa Pz-6 se observó una banda de bajo peso molecular a nivel del marcador de 19 kDa, que no se identificó en las muestras de Pz-3 y Pz-5; esta banda es semejante a las descritas por Wang y Doyle (1998).

Los patrones de OMPs antes y después del choque térmico para las cepas de *E. coli* 0157:H7, y Pz-3 (Figura 13), muestran que aumenta la intensidad de las bandas de bajo peso molecular a nivel del marcador de 22 kDa en las cepas tratadas con choque térmico. Un resultado no esperado se observó con la banda de bajo peso molecular ( $\approx 20$  kDa) de la cepa de Pz-6, la cual se observa presente intensamente antes del tratamiento térmico y disminuye después del mismo.

Con respecto a los patrones de OMPs de las cepas ambiental, clínica y K12 no se observaron cambios después del tratamiento térmico (Figura 14). Se observa presencia de bandas de bajo peso molecular (alrededor de 20 kDa) en los carriles correspondientes a las muestras de pozol. Es de resaltar que las cepas clínica y ambiental que no expresan proteínas de membrana externa después del calentamiento, tampoco incrementan su resistencia a la acidez después de éste (Figura 14).

Para conocer con mayor exactitud el peso molecular de las proteínas de membrana identificadas, los geles obtenidos se analizaron con un densitómetro, mostrándose distintos perfiles entre 14 y 22 kDa (Tabla 14). Es importante mencionar que la fracción proteica observada en las cepas 0157:H7 y 088:H25 de Pz-3, con peso molecular alrededor de 20 kDa, es similar en ambas (Figura 13), lo

que permite considerar que se trata de la proteína relacionada con estrés térmico y aumento de resistencia al pH ácido identificada en *E. coli* 0157 por Wang y Doyle (1998). Son necesarios estudios posteriores para identificar estas proteínas y su función, presumiblemente similar a las halladas en la referencia.

Tabla 14. Análisis por densitometría de bandas de bajo peso molecular de electroforesis de geles de extractos de OMPs

Figura 12	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7	Carril 8
Muestra	0157:H7	K-12	clínica	ambiental	Pozol-1	Pozol-2	Pozol-3
PM bandas	17.85	18.25	18.53	18.01	18.97	18.91	20.51 18.93
Figura 13	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7	
Muestra	0157:H7	0157:H7*	Pozol-1	Pozol-1*	Pozol-3	Pozol-3*	
PM bandas	24.33 23.62 19.05	21.99 19.42	22.00 22.01 18.91	23.18 19.62	22.92 20.04	23.30 19.27	

\*choque térmico

Los resultados obtenidos confirman la existencia de mecanismos complejos relacionados con la resistencia a la acidez en las cepas estudiadas. Dichas propiedades al parecer dependen principalmente de su ambiente de aislamiento más que de otras características fenotípicas.

Aunque las cepas de pozol, clínica y ambiental presentan porcentajes de sobrevivencia similares, sus patrones de proteínas de membrana externa son distintos y también lo es su respuesta a un choque térmico subletal. Esto permite considerar la existencia de diversos mecanismos encargados de la protección bacteriana contra el estrés ácido. Aunque no es posible generalizar con los resultados obtenidos, es factible hacer consideraciones para el caso de algunas cepas concretas, como las estudiadas en este trabajo. Se puede afirmar que la cepa Pz-3, la cual presentó propiedades relacionadas con resistencia al pH, estrés térmico y expresión de OMPs semejantes a las referidas y obtenidas con la cepa 0157 reacciona de modo similar a la 0157:H7 ante el choque térmico, en cuanto a expresión de OMPs y en el incremento de la sobrevivencia a la acidez. Es necesario realizar más estudios y obtener cantidades mayores de las proteínas de membrana externa, para confirmar e identificar su naturaleza.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

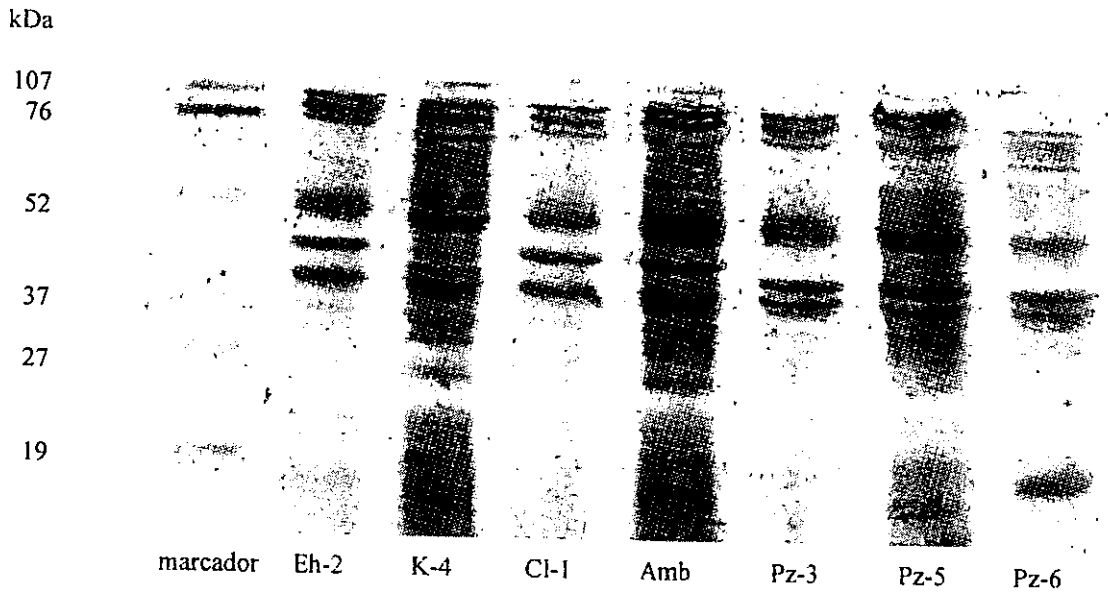


Figura 12. Patrón de OMPs de cepas de *E. coli* cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 a 30°C (Gel Poliacrilamida-SDS 15%)

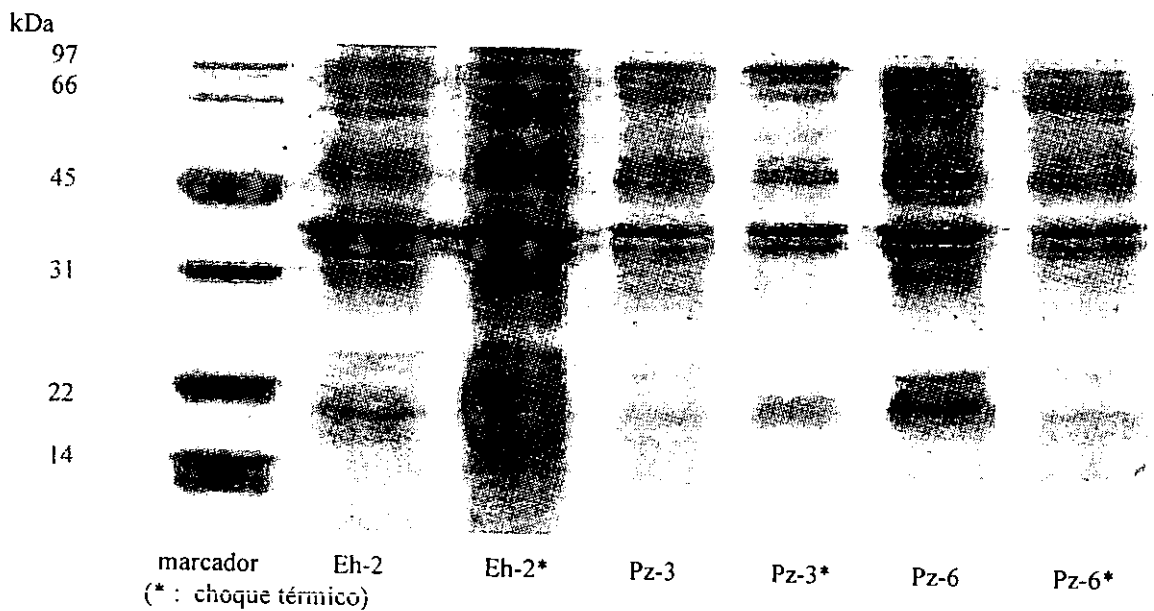
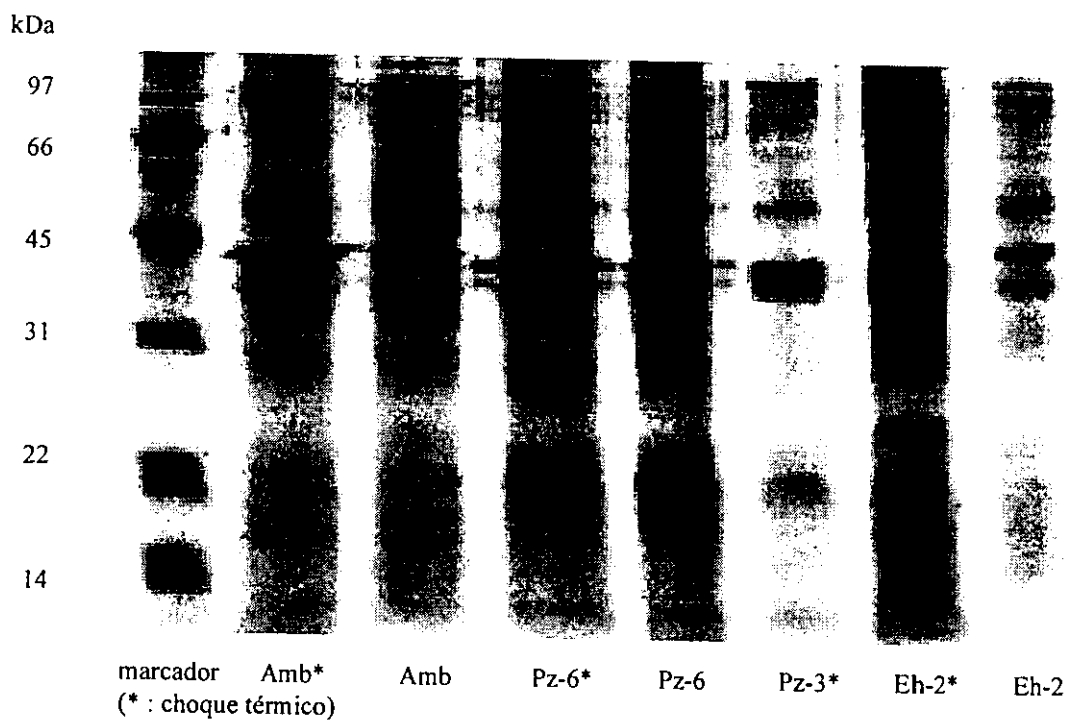


Figura 13. Patrón de OMPs de cepas de *E. coli* cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 antes y después de choque térmico (10 min a 48°C)





**Figura 14. Patrón de OMPs de cepas de *E. coli* cultivadas en caldo Luria a pH 7.0 con y sin choque térmico (10 min a 48°C)**

Fue notable encontrar resistencia a la acidez en todas las cepas, no sólo en la cepa procedente de un alimento ácido como el pozol, sino en la aislada en la atmósfera de Ciudad de México, e incluso en las cepas K12 que presentaron una resistencia a la acidez mayor a la esperable, en tres de las cuatro cepas analizadas. Al respecto es posible especular la potencialidad de estas bacterias de contaminar alimentos y huéspedes animales y humanos con alguna facilidad.

Se ha considerado que una de las características más importantes de los alimentos fermentados es la inhibición de los microorganismos patógenos durante su producción. Esto se ha atribuido tanto a la competencia por nutrientes, como a la producción de sustancias antimicrobianas por parte de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación. Las bacterias lácticas, que son responsables de la acidificación del pozol, ejercen acción antimicrobiana mediante la producción de los ácidos acético y láctico, de bacteriocinas, de diacetilo y de peróxido de hidrógeno (Daeschel, 1989).

Se ha hecho énfasis en la importancia de la acidez en la inhibición de enterobacterias (Östling y Lindgren, 1993, Yusof y col, 1993). En este trabajo se demuestra como factor de riesgo la presencia de microorganismos patógenos, como las cepas de *E. Coli* estudiadas, debido a su resistencia a la acidez. Es posible que en alimentos como el pozol la acidez producida por la fermentación no sea suficiente para controlar las bacterias patógenas. Sería interesante hacer pruebas de reto inoculando el pozol con estas cepas resistentes a la acidez y estudiar si es posible su inhibición por la microbiota natural.

Para asegurar la inocuidad de este tipo de alimentos sería primordial ejercer un mayor control en la higiene durante su producción, para evitar la contaminación con microorganismos patógenos. Se requiere también la búsqueda de alternativas, enfocar la mira hacia otros compuestos bacterianos con actividad antimicrobiana como el diacetilo, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas, seleccionando cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas con características antimicrobianas.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El presente trabajo se realizó con el fin de profundizar en el conocimiento de las características de resistencia a la acidez de las cepas de *E. coli* aisladas del pozol por Sainz (1998), comparándolas con otras de distintos ambientes. Es de interés práctico estudiarlas, por el peligro potencial que representan para la seguridad alimentaria, los tratamientos ácidos o térmicos de mediana intensidad y el desarrollo de resistencia o tolerancia de los microorganismos patógenos presentes en estas condiciones en los alimentos fermentados.

En este estudio se observó que además de *E. coli* 0157:H7, que por la gravedad de sus consecuencias al ser transmitida al hombre en distintos alimentos ha sido estudiada ampliamente, cepas del serotipo 088:H25 de diferente origen, tienen la capacidad para sobrevivir en un porcentaje mayor en medio de cultivo con valores de pH entre 2.0 y 3.0.

Como lo reporta la literatura se constató la variabilidad de características, en este caso de resistencia a la acidez, de cepas del mismo serotipo (M. Benjamin, 1995).

Las distintas comparaciones permiten determinar que para la cepa de *E. coli* aislada del pozol no existen diferencias significativas con la 0157, ni con la aislada de muestras clínicas a ningún valor de pH. Esto indica la potencialidad de su efecto como fuente de problemas gastrointestinales entre los consumidores de pozol por su permanencia en ambientes ácidos, mismo peligro de *E. coli* 0157:H7.

Se comprobó para las cepas de *E. coli* aisladas de pozol, que el tratamiento térmico subletal a 48°C incrementa sensiblemente la tolerancia a la acidez, tal y como se ha reportado anteriormente para la 0157:H7 (Wang y Doyle, 1998). No se observó este efecto sobre las cepas 088:H25 de origen clínico y ambiental.

El análisis del perfil electroforético de proteínas de membrana externa de las diferentes cepas posteriores al choque térmico, mostró que 0157:H7 y 088:H25 (Pz-3) presentan una proteína de entre 19 y 22 kDa semejante a la descrita previamente para 0157:H7, identificada como un componente de membrana encargada de regular la acidez intracelular (Wang y Doyle, 1998).

El incremento de la resistencia a la acidez posterior al choque ácido, se observó en las cepas de 0157 y pozol, no así en las obtenidas del ambiente o de origen clínico, que deben poseer mecanismos distintos de ácido-tolerancia. (Foster, 1999; Lin, 1996)

En la cepa 088:H25 (Pz-6) se observó la expresión de una proteína de entre 19 y 22 kDa, que fue aparente cuando la bacteria no fue sometida al tratamiento térmico y que disminuye después del mismo.

El conjunto de resultados muestra que cepas de serotipo diferente a 0157:H7 presentan la capacidad de resistir el pH bajo y de esta manera tolerar y sobrevivir en ambientes ácidos como el pozol.

## CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

Los comportamientos observados permiten considerar la necesidad de estudiar más profundamente los mecanismos desarrollados por las bacterias para sobrevivir bajo estrés ácido, con la finalidad de poder implementar medidas adecuadas para el tratamiento y distribución apropiadas de dichos alimentos.

Secuenciar las bandas de proteínas de membrana externas de bajo peso molecular encontradas en las cepas de *E. coli* aisladas pozol. Por sus características bioquímicas podría determinarse si tienen un papel en la ácido resistencia. Comparar los resultados obtenidos con los del trabajo de Wang y Doyle (1998).

Identificar y caracterizar la banda de OMP de bajo peso molecular expresada por la cepa de Pz-6 en caldo Luria a pH 7.0 y 30°C y compararla con las expresadas después del choque térmico por la cepa de Pz-3.

Estudiar la cepa de *E. coli* aislada del ambiente de Ciudad de México con las características de resistencia a la acidez tan significativas, compararla con muestras ambientales de otras ciudades y ambientes y definir sus mecanismos de adaptación y respuesta.

Realizar ensayos de virulencia para estudiar correlación con la resistencia a la acidez.

## REFERENCIAS

- Alexander R & Griffith J 1993 *Basical Biochemical Methods*. Wiley-Liss. 2 Ed. USA
- Bearson S, Bearson B & Foster J 1997 Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol.Lett* 147, 173-180
- Bearson S, Wilson L & Foster JW 1998 A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid-tolerance response protects *S. typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180: 2409-2417
- Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T & Mackey B 1999 Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* 0157:H7 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Appl Environ Microbiol* 65, 1564-1569
- Benjamin M & Datta A 1995 Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 61:1669-1672
- Berenson M 1996 *Estadística básica en administración*. 6 d. Prentice Hall. México
- Bhat JV & Reporter RN 1975 Fate of some intestinal pathogenic bacteria in dahi. *Indian Dairy Scienc* 2, 99-107
- Booth IR 1999 The regulation of intracellular pH in bacteria. En: *Bacterial responses to pH*. Novartis Foundation Symposium 221. John Willey & Sons 4-14
- Bouzari S, Jafari MN & Shokouhi F 2000 Virulence-related DNA sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 185, 89-93
- Bowra BJ & Dilworth MJ 1981 Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 126:231-235
- Cantey JR & Blake RK 1977 Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* 135, 454-462
- Cañas A.O, Barzana E, Owens JD & Wachter C 1993 La elaboración de Pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia*. 44, 219-229

Caso A 1961 Contribución de las culturas indígenas de México, a la cultura mundial. En: México y la cultura Secretaría de Educación Pública. 51-77

Casillas LE & Vargas LA 1984 La alimentación entre los mexicas. En: Historia General de la Medicina en México, Tomo I México Antiguo, F. Martínez Cortés (Ed.). Academia nacional de Medicina y Facultad de Medicina, UNAM. México, 133-156

Chart H 2000 VETEC enteropathogenicity. J Appl Microbiol Symp Suppl 88, 12-23

Cravioto RO, Cravioto OY, Massieu HG y Guzmán GJ 1955 El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. Ciencia México. 15, 27-30

Cravioto A, Gross AJ, Scotland SM & Rowe B 1979 An adhesion factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 3, 95-99

Cravioto A, Reyes R, Trujill F, Uribe F, Navarro A, De la Roca J, Hernández JM, Pérez G & Vazquez V 1990 Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol 131, 886-904

Cruz S & Ulloa M 1973 Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 24, 423-457

Daeschel MA 1989 Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol 43 (1), 164-167

Diez-González F & Russell J 1997a Effects of CCCP and acetate on *Escherichia coli* 0157:H7 and K-12: uncoupling versus anion accumulation. FEMS Microbiol Lett 151, 71-76

Diez-González F & Russell J 1997b The ability of *Escherichia coli* 157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. Microbiol 143, 1175-1180

Dilworth MJ & Glenn AR 1999 Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. En: Bacterial responses to pH. Novartis Foundation Symposium 221. John Wiley & Sons 4-14

Doyle M & Georgia V Ed. 1997 Food microbiology. Fundamentals and frontiers. ASM Press 13-16

- Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin J, Henderson I, Cravioto A & Nataro J 1998 Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66, 3155-3163
- Feng P, Lampel K, Karch H & Whittam T 1998 Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* 0157:H7. *The J Infect Dis* 177, 1750-1753
- Ferguson GP, Creighton RI, Nikolaev Y & Booth R 1998 The importance of RpoS and Dps in the survival of exposure of both exponential and stationary phase cells to the electrophile N-ethylmaleimide. *J Bacteriol* 180: 1030-1036
- Fields ML 1977 Laboratory Manual in food preservation. Avi Publishing Company USA
- Foster J & Hall HK 1991 Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173:5129-5135
- Foster J 1999 When proton attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* 2, 170-174
- Giron K, Ho ASY & Shoolnik GK 1991 An inducible bundle-forming pilus of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Science* 254:710-713
- Givskov M, Hansen BM, Jacobsen CS, Htargelund L & Poulsen L 1994 New methods in molecular microbial ecology. *Advanced Laboratory Course. Lab. Handbook. Copenhagen* 7.1-7.14
- Gomes TA, Vieira AM, Wachsmuth IK, et al 1989 Serotype-specific of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Pablo, Brazil. *J Infect Dis* 160:131-135
- Gorden J & Small PLC 1993 Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* 61:364-367
- Hall HK, Karem KL & Foster JW 1995 Molecular responses of microbes to environmental pH stresses. *Adv Microb Physiol* 37:229-272
- Hickey E & Hirshfield I 1990 Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 56, 1038-1045



Jordan K, Oxford L & Obyrne C 1999 Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* 0157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 65:3048-3055

Kamlakar UP & Pathak AA 1995 Enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea in children and in young adults. *Indian J Pathol Microbiol.* 153-158

Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-688

Leyer GJ & Johnson EA 1993 Acid adaptation induces cross-protection against environmental stress in *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* 59:1842-1847

Leyer GJ, Wang LL & Johnson EA 1995 Acid adaptation of *E. coli* 0157:H7 increases survival in acid foods. *Appl Environ Microbiol* 61:3752-3755

Lin J, Smith M, Chapin K, Suk H, Bennett G & Foster J 1996 Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 62:3094-3100

Lin J, Lee SJ, Frey J, Slonczewski JL & Foster J 1995 Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 177:4097-4104

Lucke FK. 1985 Fermented sausages. En: *Microbiology of fermented foods*, Brian, J.B. Ed. Elsevier. vol . 2, 41-79

Maniatis TE , Fritsch E. & Sambrook J 1989 *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Lab. Press, New York. 18.40-18-59

Mensah PPA, Tomkins AM, Drassar BS & Harrison TJ 1988 Effect of fermentation of Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of 4 strains of *Shigella flexneri*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 82:635-636

Mensah PPA, Tomkins AM, Drassar BS & Harrison TJ 1990 Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. *Lancet* 336:140-143

Moon HW, Whipp SC, Argenzio MM 1983 Attachment and effacement activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 41:1340-1351

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Brown P, Vial P & Levine MM 1987 Patterns of adherence of *Escherichia coli* diarrheagenic to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis* 6:829-831

Nuraida L, Wachter MC & Owens JD 1995 Microbiology of *pozol*, a Mexican fermented maize dough. *World J Microbiol & Biotechnol* 11:567-571

Östling CE & Lindgren SE 1993 Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *J App Bacteriol* 75:18-24

Pedroso MZ, Freymuller E, Trabulsi LR & Gomes AT 1993 Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect Immun* 61:1152-1156

Rosas I, Salinas E, Yela A, Calva E, Eslava C & Cravioto A 1997 *Escherichia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico City. *Appl Environ Microbiol* 63:4093-4095

Sainz T 1998 Estudios sobre la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química. UNAM

Salyers A & Whitt D 1994 En: *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*. ASM Press. Cap 16, 190-204

Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S & Guerry P 1993 Enteroadgregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Aca Sci USA* 90:3093-3097

Scaletsky I, Pedroso MZ & Fagundes-Neto U 1996 Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* 0118ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. *Infect Immun* 64:4876-4881

Snyder L & Champness W 1997 Molecular genetics of bacteria. American Society of Microbiology. 322-326

Ulloa M. 1974 Mycofloral succession in pozol from Tabasco. México Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 8:17-48

Ulloa M & Herrera T 1976-1982 Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche, y tepache. Anales del Instituto de Biología, UNAM, 47-53. Serie Botánica, 145-163

Ulloa M, Herrera T & Lappe P. 1987. Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales No. 16, Instituto Nacional Indigenista, México:13-20

Ulshen MH & Rollo JL 1980 Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man: another mechanism. N Engl J Med 302, 99-101

Vuyst L & Vandamme E 1994 Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of acid lactic bacteria. Luc de Vuyst and Erik Vandamme, ed. Blackie Academic Oxford

Wacher C, Cañas A, Cook PE, Barzana E & Owens JD 1993 Sources of microorganisms in *pozol*, a traditional Mexican fermented maize dough. World J Microbiol & Biotech 9, 269-274

Wacher C, Cañas A, Barzana E, Lappe P, Ulloa M & Owens D. 2000 Microbiology of Indian and mestizo pozol fermentations. Food Microbiol 17:251-256

Wang G & Doyle MP 1998 Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* 0157:H7. Lett Appl Microbiol 26:31-34

Watson N, Duniak DS, Rosey EL, Slonczewski JL & Olsen ER 1992 Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *E. coli cad* operon by external pH. J Bacteriol 174:530-540

Wolf MK & Agin T 1997 Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans and swine. Infect Immun 65:320-326

Wilmes-Riesenberg MR, Berason B, Foster J & Curtis R 1996 Roles of acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 64:1085-1092

Whittam T, Wolfe M, Wachmuth K, Orskov F, Orko Y & Wilson R 1993 Clonal relationship among *E. coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect Immun 61:1619-1623

Yusor RM, Morgan JB & Adams MR 1993 Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L-lactate and nisin. *J Food Protect* 56 (5):414-417

ANEXO 1

Serotipos de *E. Coli* identificados en muestras de pozol

MUESTRA	SEROTIPO	pH INICIAL	pH FINAL	PROCEDENCIA
1	088:H25	4.9	3.7	Nacajuca
3	092:H6	5.7		Mercado Pino Suárez Pozolería 3
	092:H11	5.7		
	07:10	5.7		
	030:H45		4.2	
	0R:H45		4.2	
4	022:H2	5.0	4.7	Pozolería "La Flor del Maíz"
	092:H11	5.0		
	0147:H7	5.0		
	0R:H17	5.0	4.7	
	08:H8		4.7	
5	033:H11	5.8		Mercado Atasta
	0139:H23	5.8		
6	09:H31	4.9		Nacajuca
7	01:H6	4.8		Nacajuca
	01:H10	4.8		
	023:H10	4.8		
	0104:H11	4.8		
	07:H-	4.8		
	0R:H41	4.8		
	07:H10	4.8	3.8	
07:H7		3.8		
8	01:H7	4.8		Nacajuca
	04:H16	4.8		
	08:H49	4.8		
	020:H-	4.8		
	033:H7	4.8		
	042:H-	4.8		
	073:H-	4.8		
	092:H19	4.8		
	092:H21	4.8		
10	08:H8	4.7		Mercado Pino Suárez Carnicería
	018:H53	4.7		
	022:H2	4.7		
	059:H5	4.7		
	081:H14	4.7		
	0108:H34	4.7		
	0147:H7	4.7		
	0173:H23	4.7		

Fuente: Sainz, 1998, Anexo 5

## ANEXO 2

Número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobrevivientes a distintos valores de pH, de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas

pH 3,0 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	7.34	6.75	6.61	6.61	6.61	6.53	5.51	0.0	0.0	0.0	0.0
Cl-1	7.80	7.10	6.79	6.86	6.86	6.55	6.24	0.0	0.0	0.0	0.0
Amb	7.08	6.58	6.30	3.96	3.40	3.12	2.97	2.83	2.83	0.0	0.0
Pz-3	7.48	5.98	5.83	5.83	5.76	5.68	5.54	0.0	0.0	0.0	0.0
K-4	7.15	5.43	4.50	4.08	1.79	1.79	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

pH 2,5 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	7.20	7.13	6.98	6.41	6.05	5.90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cl-1	7.04	7.04	6.97	6.90	6.55	6.55	6.27	*0	0.0	0.0	0.0
Amb	7.41	6.30	6.00	5.85	5.71	5.71	4.67	0.0	0.0	0.0	0.0
Pz-3	7.36	7.29	7.21	6.40	6.04	6.11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
K-4	6.80	6.05	5.71	3.60	3.40	3.40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\* 3.7 ufc a las 7 hr

pH 2,0 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	7.26	5.30	1.23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cl-1	7.28	6.26	6.26	5.46	5.31	2.69	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Amb	7.15	4.58	4.29	3.65	3.58	0.93	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pz-3	7.23	5.71	5.21	2.89	2.53	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
K-4	7.32	1.54	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

pH 3,0 con Ac. Láctico	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	7.45	5.74	3.20	1.49	1.12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cl-1	7.30	6.13	5.77	0.95	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Amb	7.32	5.71	4.76	1.17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pz-3	7.28	5.75	5.10	2.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
K-4	7.23	4.34	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ANEXO 3

Porcentaje de sobrevivencia a diferentes valores de pH de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas

pH 3.0 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	100	92	90	90	90	89	75	0	0	0	0
Cl-1	100	91	87	88	88	84	80	0	0	0	0
Amb	100	93	89	56	48	44	42	40	40	0	0
Pz-3	100	80	78	78	77	76	74	0	0	0	0
K-4	100	76	63	57	25	25	0	0	0	0	0

pH 2,5 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	100	99	97	89	84	82	0	0	0	0	0
Cl-1	100	100	99	98	93	93	89	*0	0	0	0
Amb	100	85	81	79	77	77	63	0	0	0	0
Pz-3	100	99	98	87	82	83	0	0	0	0	0
K-4	100	89	84	53	50	50	0	0	0	0	0

\* 53 % a las 7 hr

pH 2,0 con HCl	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	100	73	17	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl-1	100	86	86	75	73	37	0	0	0	0	0
Amb	100	64	60	51	50	13	0	0	0	0	0
Pz-3	100	79	72	40	35	0	0	0	0	0	0
K-4	100	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0

pH 3,0 con Ac. Láctico	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
Eh-2	100	77	43	20	15	0	0	0	0	0	0
Cl-1	100	84	79	13	0	0	0	0	0	0	0
Amb	100	78	65	16	0	0	0	0	0	0	0
Pz-3	100	79	70	28	0	0	0	0	0	0	0
K-4	100	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO 4

Porcentaje de sobrevivencia de las cepas de *Escherichia coli* a tratamientos con diferentes condiciones de acidez

*Escherichia coli* 0157:H7 (Eh-2)

	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
pH 3.0 (HCl)	100	92	90	90	90	89	75	0	0	0	0
pH 2.5 (HCl)	100	99	97	89	84	82	0	0	0	0	0
pH 2.0 (HCl)	100	73	17	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 3.0 (ac.lact.)	100	77	43	20	15	0	0	0	0	0	0

*Escherichia coli* 088:H25 de origen clínico (Cl-1)

	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
pH 3.0 (HCl)	100	91	87	88	88	84	80	0	0	0	0
pH 2.5 (HCl)	100	100	99	98	93	93	89	*0	0	0	0
pH 2.0 (HCl)	100	86	86	75	73	37	0	0	0	0	0
pH 3.0 (ac.lact.)	100	84	79	13	0	0	0	0	0	0	0

\* 53 % a las 7 hr

*Escherichia coli* 088:H25 (Amb)

	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
pH 3.0 (HCl)	100	93	89	56	48	44	42	40	40	0	0
pH 2.5 (HCl)	100	85	81	79	77	77	63	0	0	0	0
pH 2.0 (HCl)	100	64	60	51	50	13	0	0	0	0	0
pH 3.0 (ac.lact.)	100	78	65	16	0	0	0	0	0	0	0

*Escherichia coli* 088:H25 (Pz-3)

	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
pH 3.0 (HCl)	100	80	78	78	77	76	74	0	0	0	0
pH 2.5 (HCl)	100	99	98	87	82	83	0	0	0	0	0
pH 2.0 (HCl)	100	79	72	40	35	0	0	0	0	0	0
pH 3.0 (ac.lact.)	100	79	70	28	0	0	0	0	0	0	0

*Escherichia coli* 088:H25 K12 HB101 (K-4)

	Tiempo de exposición en horas										
	0	0.5	1	2	3	4	5	15	20	24	48
pH 3.0 (HCl)	100	76	63	57	25	25	0	0	0	0	0
pH 2.5 (HCl)	100	89	84	53	50	50	0	0	0	0	0
pH 2.0 (HCl)	100	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 3.0 (ac.lact.)	100	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



## ANEXO 5

### Variables para la prueba F ANOVA de una dirección

VARIABLES	
Cepas	1. <i>E. coli</i> 0157:H7 No.088267 2. <i>E. coli</i> 088:H25 No.097133, de origen clínico 3. <i>E. coli</i> 088:H25 No.096428, de procedencia ambiental 4. <i>E. coli</i> 088:H25 No.095217, aislada de pozol 5. <i>E. coli</i> K-12 HB101 No. 090054, usada como control negativo
Valores de pH	1. pH 3.0 con HCl 2. pH 2.5 con HCl 3. pH 2.0 con HCl 4. pH 3.0 con ácido láctico
Tiempos de exposición	1. 0.5 h 2. 1 h 3. 2 h: 4. 3 h 5. 4 h 6. 5 h
Respuesta	Porcentaje de sobrevivencia en cada ensayo, respecto al inicial.

## ANEXO 6

Títulos de las serologías de las cepas antes y después de la exposición a condiciones ácidas en caldo Luria a pH 3.0 acidificado con ácido láctico.

Muestra	Antígeno somático	Título inicial	Título posterior exposición acidez	Antígeno flagelar	Título inicial	Título posterior exposición acidez
Eh-1	0157	1:12800	1:6400	H7	1:3200	1:3200
Eh-2	0157	1:1600	1:800	H7	1:1600	1:1600
Eh-3	0157	1:1600	1:800	H7	1:1600	1:800
Pz-1	088	1:6400	1:1600	H25	1:12800	1:12800
Pz-2	088	1:1600	1:400	H25	1:12800	1:12800
Pz-3	088	1:1600	1:800	H25	1:12800	1:12800
097133: clínica	088	1:1600	1:1600	H25	1:6400	1:6400
096428: ambient.	088	1:1600	1:800	H25	1:6400	1:3200

ANEXO 7

Porcentaje de sobrevivencia de cepas de Escherichia coli a tratamientos ácidos, en caldo Luria ajustado con HCl, antes y después de choque térmico.

SIN CHOQUE TÉRMICO (pH 2,5)	Tiempo de exposición en horas			
	0	1	2	3
Eh-2	100	99	97	89
Cl-1	100	99	98	93
Amb	100	81	79	77
Pz-3	100	98	87	82
K-4	100	84	53	50

CON CHOQUE TÉRMICO (pH 2,5 )	Tiempo de exposición en horas			
	0	1	2	3
Eh-2	100	92	80	74
Cl-1	100	88	63	60
Amb	100	87	71	68
Pz-3	100	83	77	59
K-4	100	30	0	0

SIN CHOQUE TÉRMICO (pH 2,0)	Tiempo de exposición en horas			
	0	1	2	3
Eh-2	100	17	0	0
Cl-1	100	86	75	73
Amb	100	60	51	50
Pz-3	100	72	40	35
K-4	100	0	0	0

CON CHOQUE TÉRMICO (pH 2,0)	Tiempo de exposición en horas			
	0	1	2	3
Eh-2	100	92	89	88
Cl-1	100	57	44.9	38
Amb	100	66	35	28
Pz-3	100	83	77	59
K-4	100	31	0	0