



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Sobrevivencia de las mutantes Δcfa y $\Delta oIsB$ de *Brucella abortus* 2308 en el
modelo de leche cruda

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Victor Manuel Cortés Morales

Tutor principal:

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité tutorial:

Dr. Rigoberto Hernández Castro

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción animal

Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



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.

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento a mi tutor **Dr. Efrén Díaz Aparicio**, por todo su apoyo y por permitirme participar en este proyecto. Sus conocimientos, sus orientaciones, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.

A mi comité tutorial:

Dra. Beatriz Arellano Reynoso y **Dr. Rigoberto Hernández Castro**, personas de gran sabiduría que se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.

A los miembros de mi jurado:

Dr. Francisco Suárez Güemes, **Dr. Enrique Salas Téllez**, y **Dra. Ahíde López Merino**. Por brindarme su apoyo y valioso tiempo para hacer las sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la **Dra. Erika Gabriela Palomares Reséndiz**, por todo su apoyo, paciencia y dedicación en mi capacitación dentro del laboratorio.

A la **Dra. María del Rosario Santiago Rodríguez**, por todo su apoyo y por sus valiosos consejos tanto en el ámbito académico como en el personal, su ayuda fue fundamental para finalizar el trabajo.

A la **M. en C. Lucía Favila Humura** por el apoyo incondicional que me brindo. Muchas gracias Lucy.

A mi compañeros y amigos de laboratorio de bacteriología del INIFAP, quienes me brindaron su ayuda y amistad desinteresada. Monse, Magda, Ivonne, Ime, Alma, Carme y Sandra. Gracias estimados amigos.

Al **Dr. Rafael Segura Gámez** y a su esposa **Alina Olivares**, quienes me han apoyado en el ámbito profesional y personal durante catorce años.

Gracias a Dios que me permitió llegar hasta este punto con bien.

Dedicatorias

Dedico con mucho cariño esta tesis a:

Mi querido hijo **Manuel Sebastián Cortés Hernández** y a mi amada esposa **Yolanda Hernández Castro**, por ser el motor que me impulsa día a día.

A mi madre María del Carmen Morales Jiménez y a mi padre Francisco Cortés Xicohtencatl, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mi hermana Monserrat Cortés Morales y a mi cuñado José Luis Martínez Rivera por su apoyo durante este trayecto.

A mis tíos: Socorro Morales, Santiago Escobar, Elvira Días, Francisco Morales, Irma Morales, José Segura, Martha Morales, Marino García, Virginia Hernandez, Sergio Morales, Rosalba Morales y Daniel Ortega.

A mis amigos Germán Arguelles Martínez y a Gustavo Ramírez Paredes.

A la **Dra. Patricia Villalba**, gracias por tu apoyo y consejos.

Espero que consideren este éxito como suyo.

Contenido	Páginas
Resumen	7
1. Introducción	9
1.1. Antecedentes	9
1.2. Temperatura	12
1.3. PH	12
1.4. Actividad de agua	14
1.5. Lípidos de ornitina	16
1.6. Ácidos grasos de ciclopropano	17
2. Justificación	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivo general	19
4.1. Objetivos específicos	20
5. Material y métodos	20
5.1. Leche de vaca	20
5.2. Recolección de los datos	21
5.3. Cepas de <i>Brucella abortus</i>	21
5.4. Preparación de los inóculos	21
5.5. Inoculación de la leche	22
5.6. Determinación de pH y aw	23
5.7. Análisis estadístico	23
6. Resultados	23
6.1. Supervivencia en leche cruda de vaca a 4°C	23
6.2. Supervivencia en leche cruda de vaca a 24°C	25

6.3.Actividad de agua	26
7. Discusión	27
8. Conclusiones	33
9. Referencias	34

Índice de figuras	Páginas
Tabla 1. UFC/mL en leche cruda de vaca conservada a 4° C. durante 7 días.	24
Figura 1. Supervivencia de <i>Brucella abortus</i> 2308, Δcfa y $\Delta olsB$ en leche cruda de vaca a 4°C y su relación con el pH.	24
Tabla 2. UFC/mL en leche cruda de vaca conservada a 24° C. durante 7 días.	25
Figura 2. Supervivencia de <i>Brucella abortus</i> 2308, Δcfa y $\Delta olsB$ en leche cruda de vaca a 24°C y su relación con el pH.	26
Tabla 3. Valores aw obtenidos durante el experimento.	26

Resumen

Debido a la capacidad de *Brucella* spp. para sobrevivir en productos alimenticios, e infectar al humano, es indispensable conocer su comportamiento en los mismos. Se ha sugerido que los lípidos de ornitina (OL's) y el ácido graso de ciclopropano (CFA), presentes en la membrana externa de *Brucella abortus*, le confieren la capacidad de sobrevivencia en medios hostiles. Por ello es necesario conocer más detalles del efecto de la inactivación de los genes, responsables de la producción de CFA y OL's, en la sobrevivencia de la bacteria en leche cruda de vaca. El objetivo del trabajo fue comparar la sobrevivencia de la cepa parental de *B. abortus* 2308, con las mutantes Δcfa y $\Delta olsB$, en leche cruda de vaca conservada a 4° C y 24° C durante 7 días. Se utilizó leche cruda de vaca homogeneizada de un establo libre de brucelosis, cada cepa de *B. abortus*: 2308, Δcfa y $\Delta olsB$, fue inoculada en 10 ml de leche cruda de vaca a una concentración de 5×10^9 UFC/mL. Diariamente se realizó el conteo de UFC/mL en placas de agar TSA, se midió el pH y la actividad de agua (a_w). Los experimentos se realizaron por triplicado con tres repeticiones independientes; los datos fueron analizados mediante la prueba "T de student" utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.00 para Windows. En la leche conservada a 4°C no se encontraron diferencias significativas ($p \geq .05$) entre la sobrevivencia de la cepa 2308 y las mutantes Δcfa y $\Delta olsB$. En la leche conservada a 24°C se observó un descenso drástico de los valores de pH a partir del segundo día del experimento, lo que puso de manifiesto la diferencia existente entre la cepa parental y las mutantes ($p \leq .05$) tanto en tiempo, como en número de UFC/mL. La cepa parental sobrevivió

hasta el quinto día; mientras que las cepas mutantes solo se aislaron hasta el cuarto día del experimento. Cabe destacar que la mayor diferencia se presentó entre la cepa parental y la mutante Δcfa . Los genes que permiten la expresión de ácidos grasos de ciclopropano y lípidos de ornitina le confieren a *B. abortus* mayor resistencia ante medios extracelulares con pH ácido.

Palabras clave: *Brucella abortus*, gen *cfa*, gen *olsB*, leche cruda.

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La brucelosis es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial especialmente en los países en desarrollo (Acha, 2001, Luna, 2002). Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas en la ganadería, pero sobre todo, afecta a la salud humana provocando una disminución en la calidad de vida (Falenski, 2011; Luna, 2002).

Brucella es un cocobacilo Gram negativo, no móvil, no esporulado, no fermentador, de crecimiento lento y que no posee cápsula. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no degrada la gelatina y en general no fermentan los azúcares (Bargen, 2012; Castro *et al*, 2005; Díaz, 2001).

La organización microscópica de *Brucella* spp., es semejante a la estructura clásica de las bacterias Gram negativas. La membrana citoplásmica consiste de una bicapa de fosfolípidos y proteínas de diversos tipos. Entre la membrana citoplasmática y la membrana externa, se encuentra el espacio periplásmico y la capa de peptidoglucano (Vega, 2006).

El lipopolisacárido (LPS) liso que cubre a la bacteria, las proteínas involucradas en la señalización, la regulación de genes y la transposición trans-membranal son,

entre otros, factores que pueden estar involucrados en la virulencia de *Brucella* spp (Falenski, 2011).

El desarrollo de la enfermedad en humanos depende, en gran medida de la presencia de reservorios animales y de la tasa de infección por brucelosis en el ganado (Falenski, 2011; C. Rosenfeld, 2007; WHO, 1997). Méndez *et. al.*, en 2007 mencionaron que los factores predisponentes para contraer brucelosis son: el número de bacterias eliminadas por el animal infectado luego del parto o del aborto; el tiempo de sobrevivencia de las bacterias bajo las condiciones ambientales existentes; y la probabilidad de que un animal susceptible se exponga a una cantidad suficiente de bacterias para que se de la infección. *Brucella* no posee factores de virulencia clásicos como las toxinas, fimbrias y capsula (Vega, 2006; Castro, 2005); la bacteria puede entrar al hospedero a través de la ingestión o inhalación, por vía conjuntival o por abrasiones en la piel (Bargen, 2012; Castro, 2005); posteriormente es fagocitada por polimorfonucleares (PMN) y por monocitos, sobreviviendo intracelularmente, es así como evade los mecanismos de defensa celulares y humorales, ya que es secuestrada dentro de la células en el retículo endoplásmico; esto se logra a través de la alteración del tráfico intracelular para evitar la degradación y muerte en los lisosomas, también modula el ambiente intracelular para permitir la sobrevivencia y replicación por un largo periodo de tiempo (Bargen, 2012; Franco, 2007). De esta manera se asegura de un mecanismo de transporte dentro de los fagocitos, cuando destruye a sus células transportadoras produce bacteriemias características que definen el cuadro clínico (Baquero, 2007; Cevallos, 2010).

B. abortus tiene la capacidad de sobrevivir fuera del hospedero por periodos de tiempo que van de 1 a 110 días dependiendo del sustrato (Bargen, 2012; Vega, 2006). Esta característica le confiere una mayor capacidad para infectar tanto a humanos como animales.

Los factores que influyen en la presencia y en la sobrevivencia de *Brucella spp.*, en leche son: la temperatura de almacenamiento, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, la disponibilidad de agua (a_w), el número de microorganismos, entre otros (Doyle, 2001; ICMSF, 1998). De esta manera *B. abortus* puede sobrevivir por 42 días en crema a 4°C, 30 días en yogurt, en leche cruda de vaca a 8°C entre 3 y 4 días y en agua hasta 53 días (Falenski, 2011); Méndez en 2007, reportó que al final de la elaboración de quesos, de tipo fresco panela y semimadurado, la sobrevivencia de *B. melitensis* se observó durante 15 días de maduración.

El tiempo de sobrevivencia de los microorganismos en medios extracelulares depende en gran medida de la adaptación de la membrana a medios hostiles (Loffhagen, 2007; Pucci, 2006; Muñoz, 2004; Poolman, 2002). Esto se logra mediante ajustes de fluidez para compensar efectos de cambios térmicos, pH bajos, elevada osmolaridad y desecación debido a la capacidad para alterar la composición de la membrana (Loffhagen, 2007; Pucci, 2006).

1.2. Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores extrínsecos que influyen sobre el crecimiento microbiano (Doyle, 2001). Durante el crecimiento en un entorno frío es importante la adaptación homeoviscosa, la cual permite a las células mantener la fluidez de sus membranas a bajas temperaturas, ya que al disminuir la temperatura la célula incrementa la síntesis de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados (Moreno, 2014; Doyle, 2001; Zaritsky, 1985). Los plegamientos causados por los dobles enlaces previenen el empaquetamiento de los ácidos grasos en una estructura cristalina (Doyle, 2001).

1.3. pH

Cada microorganismo tiene un pH mínimo, óptimo y máximo, el cual va en función de su crecimiento. El pH óptimo para el crecimiento bacteriano tiene valores cercanos a la neutralidad, aunque existen algunas bacterias acidificantes que son estimuladas por un ligero grado de acidez, mientras que otras como las proteolíticas pueden crecer en medios con pH alcalinos (Chongde, 2012; Frazier, 2011; Doyle, 2001).

Frazier, en 2011 menciona que, en un medio con escasa capacidad amortiguadora se presenta un descenso del pH con producción de ácido por parte de las bacterias lácticas. Esta propiedad favorece la eliminación de microorganismos proteolíticos y pectolíticos de carácter competitivo.

A pesar de que un ambiente estresante tiene como resultado cambios en la organización, dinámica estructural y función de los lípidos de membrana, la integridad y fluidez de la membrana citoplasmática son factores claves en el

mantenimiento de la viabilidad de las bacterias y de sus actividades metabólicas (Chongde Wu, 2012; Zhang, 2008).

Se ha reportado en *Lactobacillus casei*, que cuando está en ambientes ácidos presenta una rigidez en la membrana con un alto grado de desorganización (Chongde Wu, 2012). El estado de rigidez de la membrana puede reducir el efecto de fluidificación de ácido de esta manera se minimiza el efecto nocivo del mismo ácido previniendo su entrada. Chu- Ky *et al* (2005) mencionan que el estado de desorganización de la membrana es causado por la desnaturalización de proteínas lo que da como resultado una alta mortalidad. Frazier (2011) menciona que la protonación y desprotonación de los aminoácidos inducida por el pH puede modificar la estructura secundaria o terciaria de las proteínas, alterando su función. Por lo tanto, el pH intracelular debe mantenerse siempre por encima del valor crítico al cual las proteínas intracelulares se desnaturalizan irreversiblemente.

La respuesta de tolerancia acida (ATR) se desencadena a valores de pH externos. (Álvarez, 2014; Edelson, 2006). Este mecanismo es sensible a los inhibidores de la síntesis de proteínas. La ATR parece implicar a la bomba de protones con actividad ATPasa unida a la membrana, y mantiene el pH intracelular por encima de 5.0 a valores de pH extracelular tan bajos como 4.0, la pérdida de la actividad ATPasa originada por mutaciones que provocan la disrupción génica o por inhibidores metabólicos anula la ATR (Álvarez, 2014).

1.4. Actividad de agua (a_w)

Los microorganismos tienen la necesidad absoluta de agua, ya que sin ésta no existe crecimiento. La cantidad precisa de agua para el desarrollo de distintos microorganismos es variable. Estos requerimientos de agua se deben expresar en términos de agua disponible o actividad de agua. La a_w estará en equilibrio con la humedad relativa (HR) de la atmósfera que rodea al alimento y que es 100 veces superior si la humedad relativa se expresa como porcentaje. Cuando la HR en torno al alimento corresponde a una a_w inferior a la del propio alimento, tenderá a desecar su superficie, y a la inversa, cuando la HR es mayor que la A_w del alimento, ésta tenderá a aumentar en la superficie de dicho alimento (Frazier, 2011; Costas, 2010; Mortel, 2004).

La reducción de la a_w por un soluto depende de la concentración total de iones y moléculas disueltas, cada una de las cuales está rodeada de moléculas de agua más o menos firmemente ligadas. La a_w varía con la temperatura, pero estas variaciones son ligeras en el rango de temperaturas que permiten el desarrollo microbiano. Las variaciones de temperatura son más importantes al aumentar la concentración de los solutos y de los efectos sobre la ionización. (Poolman, 2002)

Los solutos como las sales o azúcares disueltos en agua originan una presión osmótica que tiende a sustraer agua de las células si la concentración de las sustancias disueltas es mayor en el exterior que aquellas en su interior. Si, por el contrario, la HR del aire es menor que a_w del alimento, este perderá humedad en su superficie. Esta pérdida de humedad superficial causará la difusión del agua

desde del interior de alimento hacia su superficie, con lo que la humedad tiende a hacerse uniforme en todo el alimento. (Frazier, 2011; Poolman, 1998).

La membrana citoplasmática de las bacterias es permeable al agua, pero también forma una barrera efectiva para la mayoría de los solutos presentes en el medio y los metabolitos presentes en el citoplasma. Una actividad baja de agua externa en condiciones hiperosmóticas, causa una rápida pérdida de turgencia, en las bacterias gram (-), provocando que la membrana se retraiga de la pared celular. De igual manera, bajo condiciones hipoosmóticas el volumen citoplasmático se incrementa. Para sobrevivir al estrés osmótico las células necesitan adaptarse mediante la acumulación específica de solutos bajo condiciones hiper osmóticas y liberarlas bajo condiciones hiposmóticas. Tales solutos incluyen K⁺, glutamato, prolina, péptidos, carnitina, sacarosa, trealosa, tetrahidropirimidinas (Frazier, 2011; Méndez, 2007; Mortel, 2004).

Las enzimas y otras macromoléculas también son sensibles a la aw. La mayoría de las células microbianas experimentan cambios en la actividad de agua extracelular, lo cual tiene consecuencias directas para la actividad de agua del citoplasma (Costas, 2010; Poolman, 2002). A raíz de un aumento en la actividad de agua externa, la difusión pasiva de agua incrementaría la turgencia y eventualmente la célula se lisaría si no hubiera mecanismos que contrarresten el estrés. De igual manera durante el aumento osmótico el agua saldrá de la célula, la turgencia decaerá y al final la célula será plasmólisis. Para mantener la turgencia dentro de un rango específico y para proteger a las células de la lisis y la plasmólisis, los microorganismos ajustan las concentraciones osmóticas

intracelulares. Las bacterias Gram negativas y Gram positivas prefieren partículas covalentes tales como la glicina betaina, carnitina o ectoína como osmoprotectores (Mortel, 2004; Poolman, 2002).

1.5. Lípidos de ornitina

Se ha sugerido que la abundancia de lípidos de ornitina (LO) favorece la resistencia ante medios extracelulares (Palacios, 2011). Estos LO pertenecen a una clase de aminoácidos acilados grasos que no contienen glicerol o fosfato; un LO estándar se compone de un residuo de ornitina y de un ácido graso amidificado a la ornitina, así como de un segundo ácido graso esterificado al ácido graso amidificado (Palacios, 2011; Kawai, 2002). Los LO se han encontrado distribuidos en un gran número de bacterias Gram negativas y varias Gram positivas, existen diferentes proporciones de lípidos del total de la membrana, dependiendo de cada género bacteriano y su estadio de crecimiento (Zhang, 2009; Minnikin, 1974). Esta proporción de LO puede ir del 2%, en bacterias que crecen bajo condiciones normales, a ser casi el único lípido polar presente bajo condiciones de crecimiento deficientes de fosfato, este es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Sinorhizobium meliloti* (Zhang, 2009). Los LO también han sido implicados en la tolerancia a altas temperaturas y a medios ácidos en *Burkholderia cepacia* y *Bordetella pertussis* respectivamente. En *B. pertussis* y *Flavobacterium meningosepticum* los LO han mostrado distintas funciones biológicas incluyendo hemoaglutinación y estimulación de macrófagos. En *Rhodobacter capsulatus* los LO son necesarios para el óptimo funcionamiento de citocromo tipo C (Zhang, 2009). En *P. fluorescens* el incremento de LO la hace

más resistente a la acción de la polimixina B indicando una relación entre estos aminolípidos y la resistencia a los péptidos bactericidas (Palacios, 2011; Zhang, 2009). También se ha reportado que los LO en *B. pertussis*, *F. meningosepticum* y *Achromobacter xylosoxidans* muestran efectos antagonistas sobre la endotoxicidad del LPS así como la actividad pro inflamatoria e inflamatoria (Palacios, 2011; Kato, 1997).

Palacios en 2011, buscó en el genoma de *B. abortus* 2308 genes ortólogos involucrados en la síntesis de LO en otras alfa-2 *Proteobacterias*. En *Sinorhizobium meliloti*, la OlsB acila el grupo alfa amino ornitina con C18:0 (3-HO). Palacios *et al* en 2011, encontraron que el ORF 1_0174 de *B. abortus* (*BABolsB*) codifica para una proteína con 55% de identidad y 66% de similitud con OlsB de *S. meliloti*. Basados en estos datos construyeron la mutante de la cepa virulenta *B. abortus* 2308 Nal R (ahora conocida como BAB-Parental) carente de los aminoácidos consensos responsables de la actividad enzimática para la síntesis de LO. Para *BABolsB*, se removieron los aminoácidos 40 al 229, lo cual resultó en una proteína truncada de 107 aminoácidos (mutante *BABΔolsB*). El único lípido ninhidrina positivo generado por la mutante *BABΔolsB* fue fosfatidiletanolamina (PE). Cuando la mutante *BABΔolsB* fue complementada con el plásmido pLPI -6 (que llevaba *BABolsB*) la síntesis de lípidos de ornitina fue restaurada.

1.6. Ácidos grasos de ciclopropano

Los ácidos grasos de ciclopropano (CFAs por su siglas en ingles Cyclopropane fatty acid) son el resultado de la modificación de las cadenas acil insaturadas

mediante la adición de un grupo metilo a dobles enlaces C-C. Esta reacción es llevada a cabo por las sintasas de CFAs que usan metionina adenocil-s (SAM) como donador de metileno (Palacios, 2012; Loffhagen, 2007, Poolman, 2002).

Una gran variedad de bacterias inicia la ciclopropanación de ácidos grasos después de entrar a la fase de crecimiento o al exponerse a pH bajo, baja tensión de oxígeno, limitados nutrientes, peróxido de hidrógeno, desecación y una fuerza iónica y/o osmolaridad elevadas (Palacios, 2012; Loffhagen, 2007; Grogan, 1997). El genoma de *B. abortus* 2308 contiene un ORF (BAB1_0476) descrito como codificador de una metiltransferasa o CFA sintasa. A pesar de que se identificaron varias metiltransferasas homologas en *B. abortus*, solo el ORF BAB1_0476 tiene una homología significativa con la sintasa de CFA (Palacios, 2012). Observaron también el papel que jugaba el ácido lactobacílico (ácido graso de ciclopropano de cadena larga) en la virulencia de *B. abortus*. La mutante no demostró su atenuación en infecciones realizadas en macrófagos y en ratón (Palacios, 2012) lo que sugirió que los CFAs no son esenciales para *B. abortus* en su vida intracelular. Sin embargo, cuando la mutante fue puesta a prueba bajo condiciones de alta osmolaridad en agar y pH ácido; la mutante mostró una habilidad reducida para sobrevivir. Debido a que la síntesis de CFAs implica un alto gasto de energía (ATP) y *Brucella* spp., produce una gran cantidad de estos, se cree que la CFA sintasa ha sido conservada debido a su utilidad para la sobrevivencia extracelular (Palacios, 2012).

De esta manera se sabe que los lípidos de ornitina y ácidos grasos de ciclopropano son componentes de membrana externa en *Brucella* spp. y a pesar

de que se ha demostrado su importancia en otras bacterias (Palacios, 2012, 2011; Pucci, 2006; Kato, 1997) no han sido investigados en *Brucella* spp.

2. Justificación

Los mecanismos que intervienen en la sobrevivencia intracelular de *Brucella* han sido caracterizados, pero los procesos relacionados con la sobrevivencia extracelular son desconocidos. *Brucella* es capaz de sobrevivir en lácteos, por lo que, el consumo de estos productos no sometidos a control sanitario constituye un riesgo para la transmisión de la bacteria.

Trabajos recientes sugieren que los lípidos de ornitina, así como el ácido graso del ciclopropano de la membrana de *B. abortus*, intervienen en la sobrevivencia extracelular. Estos genes le confieren a *B. abortus* una mayor oportunidad de sobrevivir en un ambiente extracelular y esto aumenta la posibilidad de entrar en contacto con el hospedero y así infectarlo.

Conocer el efecto de la inactivación de dichos genes en la sobrevivencia de la bacteria en la leche, contribuirá a dilucidar el efecto de los lípidos de ornitina, y del ácido graso del ciclopropano en la sobrevivencia extracelular

3. Hipótesis

La inactivación de los genes $\Delta olsB$ y Δcfa , afectan la sobrevivencia de *B. abortus* en la leche cruda de vaca.

4. Objetivo general

Determinar la sobrevivencia de las mutantes *B. abortus* $\Delta olsB$ y Δcfa en leche cruda de vaca, comparándolas con la cepa parental de *B. abortus* 2308.

4.1. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la mutación de los genes $\Delta olsB$ y Δcfa sobre la sobrevivencia de *B. abortus*, en leche cruda de vaca conservada a 4°C y 24° C.
2. Medir a diferentes tiempos el pH y actividad de agua (aw) de la leche cruda de vaca conservada a 4°C y 24°C.

5. Material y métodos

5.1. Leche de vaca

Se utilizó leche cruda de vaca la cual se homogeneizó previamente. La leche se obtuvo del Centro de Enseñanza-Práctica e investigación en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEPIPSA-FMVZ-UNAM), ubicado en Av. Cruz Blanca Núm. 486, San Miguel Topilejo, Tlalpan. Este estable posee constancia de hato libre de brucelosis. Se utilizaron recipientes estériles los cuales fueron transportados en un empaque térmico hasta el laboratorio, el tiempo utilizado para dicha actividad no excedió de una 1 hora.

Una vez inoculada la leche con su respectiva cepa, el periodo de tiempo para realizar las diluciones no fue superior a 30 min para cada cepa.

Cada uno de los experimentos comenzaron el mismo día de la semana en el mismo horario.

5.2. Recolección de los datos

Los instrumentos empleados para la medición de los datos obtenidos fueron de calidad analítica y debidamente calibrados.

Los resultados para la sobrevivencia de las distintas cepas se expresaron en Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y/o log base 10.

5.3. Cepas de *B. abortus*

B. abortus 2308

B. abortus cepa 2308 NaIR es una mutante naturalmente resistente al ácido nalidixico, esta mutante deriva de la cepa 2308, la cual es frecuentemente utilizada para estudios en vacunas, y *B. abortus* RB51 que es una vacuna viva R comercial (Monreal, 2003).

Mutantes *BAB ΔolsB* y *BABΔcfa*

Las cepas mutantes fueron diseñadas y desarrolladas previamente por Palacios y col. en 2011 y 2012 respectivamente.

5.4. Preparación de los inóculos

Se realizó la preparación del inóculo creciendo las cepas de *B. abortus* cepa 2308 y la cepas mutantes *Δcfa* y *ΔolsB* en placas de agar tripticasa soya (TSA) con suplemento selectivo Farrell (Acido nalidixico, Bacitracina, metanosulfonato colistina, cicloheximida, sulfato de polimixina B, vancomicina, nistatina, nitrofurantoina), a 37°C durante 48 h, posteriormente se transfirieron de 4 a 6 colonias a 10 mL de Caldo Tripticasa Soya (TSB), a 37 °C en incubación orbital a 175 rpm durante 22 h; parámetros en los cuales alcanzó la densidad óptica de 0.8,

se realizó una dilución 1:50 en TSB y se incubó a 37° C de 22 -24 h (hasta que alcanzó la densidad óptica de 1.0) en incubación orbital a 175 rpm. Esto con la finalidad de obtener un inóculo homogéneo que contuviera la mayor cantidad de bacterias en fase log tardía. La muestra fue centrifugada a 4500 X g por 10 min y se lavó 2 veces con solución amortiguada de fosfatos (PBS). La pastilla fue resuspendida en 25 mL de TSB, glicerol y se distribuyó en viales de 1 mL. A partir de éstas alícuotas se hicieron nueve diluciones décuples (de 10^{-1} a 10^{-9}). Se colocaron 100µl de cada dilución en placas de TSA. Para distribuir de manera homogénea se extendió el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de "L") haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio. Este procedimiento fue realizado por triplicado, posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 5 días, a partir de ello se realizó el conteo de UFC/mL con la finalidad de establecer la concentración del inóculo inicial y partir de este para obtener la dosis requerida (5×10^9 UFC/mL). realizando diluciones decuples seriadas (Falenski, 2011).

5.5. Inoculación de la leche

Se utilizaron las cepas de *B. abortus*: 2308, Δcfa y $\Delta olsB$, cada cepa fue inoculada a una concentración de 5×10^9 UFC/mL. en 10 ml de leche cruda de vaca y conservadas en el laboratorio durante siete días a 24°C y a 4°C.,

Los experimentos se realizaron por triplicado con tres repeticiones independientes; Se colectaron muestras de cada leche cada 24 h durante siete días y después de hacer siete diluciones décuples con PBS, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM110 SSA1-1994, se inocularon por triplicado 100 µl de cada

dilución en placas de TSA con suplemento selectivo Farrell (Acido nalidixico, Bacitracina, metanosulfonato colistina, cicloheximida, sulfato de polimixina B, vancomicina, nistatina, nitrofurantoina). Las placas fueron incubadas por 4 días a 37°C en atmósfera húmeda y las colonias fueron contadas con la ayuda del contador de colonias (Zúñiga, 2005).

5.6. Determinación de pH y aw

El pH de la leche, inoculada con cada cepa, fue medido cada 24 h mediante tiras reactivas.

El aw fue determinado mediante la obtención de muestras provenientes de 10 ml de leche (no inoculada) para cada cepa. Las mediciones se realizaron cada 24 h durante el tiempo que duró el experimento con un medidor de actividad de agua.

5.7. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de “T student” utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, con una significancia de ($P \leq 0.05$).

6. Resultados

6.1. Supervivencia en leche cruda de vaca a 4°C

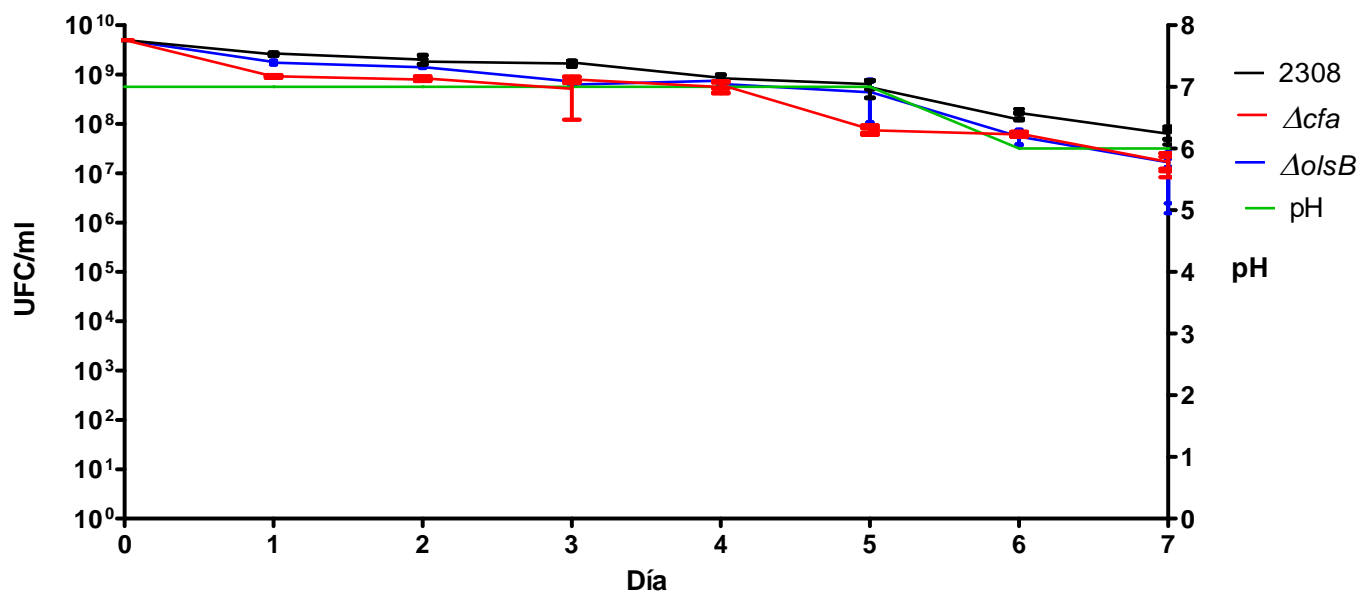
En la Figura 1. Se muestra la supervivencia en leche cruda de vaca a 4°C de la mutante Δcfa y la mutante $\Delta olsB$ con respecto a la cepa 2308 de *B. abortus*. Las tres cepas tuvieron un patrón de supervivencia semejante hasta el día 5 post-inoculación (Tabla 1). Hecho que coincidió con el descenso del pH de 7 a 6. A partir de este día se observó mayor supervivencia de la cepa parental con

respecto de las cepas mutantes, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$).

Tabla 1. UFC/mL en leche cruda de vaca conservada a 4 °C. durante 7 días.

Días	Cepas		
	2308	Δcfa	$\Delta olsB$
0	$5. \times 10^9$	5.0×10^9	5.0×10^9
1	2.6×10^9	9.2×10^8	1.8×10^9
2	2.0×10^9	8.3×10^8	1.4×10^9
3	1.7×10^9	6.7×10^8	6.9×10^8
4	$8.5 \text{ E}+08^8$	5.9×10^8	7.0×10^8
5	$5.8 \text{ E}+08^8$	7.5×10^7	5.0×10^8
6	$1.5 \text{ E}+08^8$	6.2×10^7	5.6×10^7
7	$6.2 \text{ E}+07^7$	1.7×10^7	1.5×10^7

Figura 1. Sobrevivencia de *Brucella abortus* 2308, Δcfa y $\Delta olsB$ en leche cruda de vaca a 4 °C y su relación con el pH.

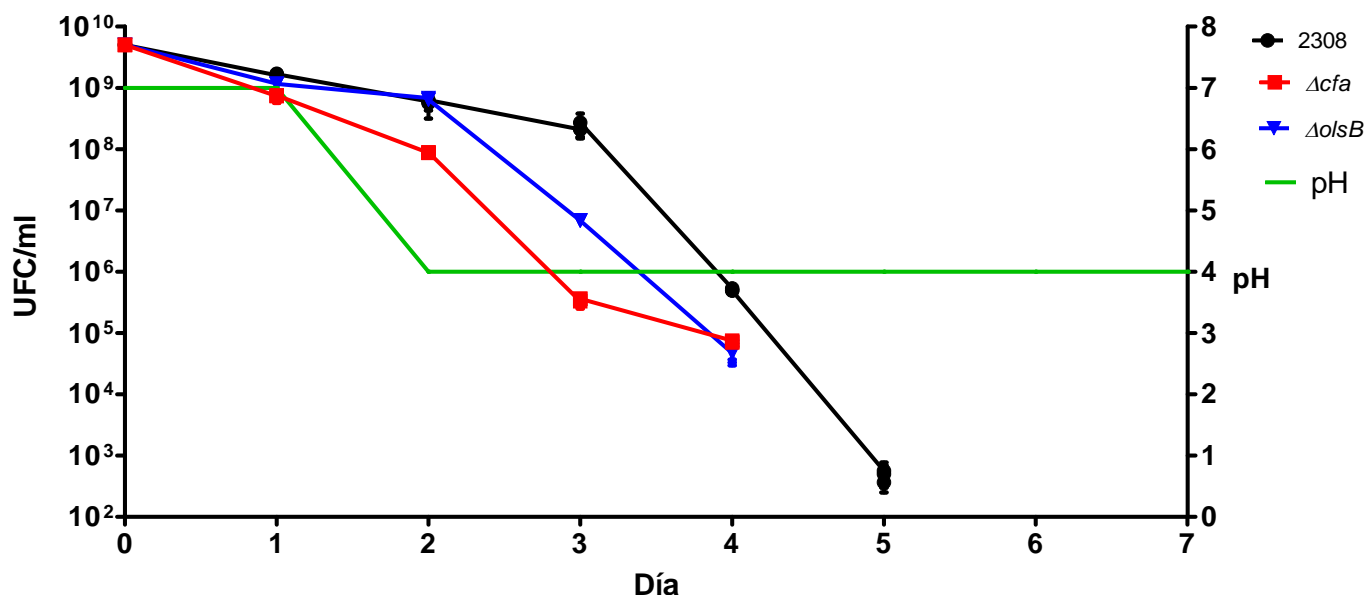


6.2. Supervivencia en leche cruda de vaca a 24°C

Al realizar la comparación en leche cruda de vaca mantenida a 24°C, entre las mutantes Δcfa , $\Delta olsB$ y la cepa parental, se puede observar cómo el descenso del pH influye de manera directa sobre el tiempo de supervivencia y en la cantidad de UFC/mL presentes en la leche, mostrando una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), entre las cepas mutantes (Δcfa y $\Delta olsB$) y la cepa parental a partir del día 2 lo cual coincidió con el descenso de pH (de 7 a 4). La cepa parental muestra mayor resistencia al sobrevivir un día más que las mutantes (Δcfa y $\Delta olsB$), al mostrar una diferencia de 2 logaritmo con respecto a la cepa $\Delta olsB$ en el día 3 post-inoculación y una diferencia de 3 logaritmos en el mismo día con respecto de la mutante Δcfa (Tabla 2). La diferencia de UFC's entre la cepa parental y las cepas mutantes en el día 4 post-inoculación fue menor, sin embargo en el día 5 post-inoculación no hubo supervivencia de las cepas mutantes encontrándose solo la cepa parental como se muestra en la Figura 2.

Tabla 2. UFC/mL en leche cruda de vaca conservada a 24° C. durante 7 días.			
Días	Cepas		
	2308	CFA	OLSB
0	5.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9
1	1.7×10^9	7.4×10^8	1.2×10^9
2	6.0×10^8	8.8×10^7	6.5×10^8
3	2.3×10^8	3.5×10^5	6.8×10^6
4	5.1×10^5	7.2×10^4	5.3×10^4
5	4.8×10^2	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0

Figura 2. Sobrevivencia de *Brucella abortus* 2308, Δcfa y $\Delta olsB$ en leche cruda de vaca a 24 °C y su relación con el pH.



6.3. Actividad de agua

En la tabla 3 se muestra los valores medidos de la actividad del agua (a_w) con respecto al tiempo, en leche cruda de vaca. Este parámetro fue medido durante los días que duro el experimento; iniciando con un valor de 0.99. Estos resultados muestran que el a_w no tuvo efecto en la sobrevivencia de la cepa 2308, y de las mutantes Δcfa y $\Delta os/B$, ya que ningún valor está por debajo de .80.

Tabla 3. Valores de a_w obtenidos durante el experimento

Días/°C	4°C	24° C
0	0.99	0.99
1	0.88	0.93
2	0.86	0.94
3	0.91	0.91
4	0.94	0.92
5	0.98	0.91
6	0.97	0.92
7	0.96	0.92

7. Discusión

En el presente estudio se observó una marcada diferencia entre los experimentos realizados con leche cruda de vaca a 4°C y a 24°C. En los estudios realizados a 4°C se observó un descenso en las UFC de todas las cepas a partir del día 5, el cual coincide con una ligera disminución del pH, producido por la fermentación ácida de carbohidratos y la supresión de las bacterias proteolíticas (Solomon, 2014; Chongde Wu, 2012; Frazier, 2011). Esto ocurrió debido a que las bacterias a temperatura de refrigeración, tienen un metabolismo más lento que cuando se encuentran a temperatura ambiente. El evento hace suponer que los microorganismos fermentadores presentes en la leche disminuyen la velocidad de crecimiento al encontrarse a 4°C, retardando así la producción de los ácidos. (Trejo, 2014; Doyle, 2001). De esta manera, las distintas cepas de *B. abortus* sobrevivieron durante los primeros cinco días en pH de 7 y al descender a 6 las cepas de *B. abortus* también disminuyeron en número, sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las tres cepas. Frazier en 2011, menciona que si la temperatura óptima de crecimiento es rebasada, la velocidad de crecimiento disminuye, mientras que por debajo de la temperatura óptima las tasas de crecimiento decaen de una manera gradual. Aune y colaboradores, en 2011 mencionan que *B. abortus* a bajas temperaturas tiene la capacidad de persistir en ambientes extracelulares por más de dos meses. Zuñiga y col. en 2005 observaron que *B. abortus* fue capaz de sobrevivir en leche fermentada con un cultivo iniciador de yogurt hasta 22 días a 4°C.

Los resultados de los experimentos realizados a 24°C tuvieron diferencia significativa ($P \leq 0.05$), entre la cepa parental y cepas mutantes, esta diferencia se incrementaba en una proporción directa al aumento del tiempo de exposición al ambiente ácido generado por las bacterias presentes en la leche. Este descenso de pH se debe a que a 24° C (temperatura óptima de crecimiento para las bacterias presentes en la leche) sufre primero una fermentación ácida causada por *Streptococcus lactis* y las bacterias coliformes, hasta que éstas son inhibidas por el mismo ácido que han producido. A continuación, los lactobacilos ácido tolerantes, incrementan la acidez hasta que su desarrollo se detiene (Trejo, 2014; Frazier, 2011). Los gérmenes que sucesivamente toman parte en esta fermentación son en primer lugar la flora bacteriana mixta compuesta principalmente por coliformes; en segundo lugar *Leuconostoc mesenteroides*; y en tercero *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus brevis* (Chongde Wu, 2012; Frazier, 2011; Rodríguez, 2011).

Esta diferencia es más evidente en las cepas carentes de ácidos grasos de ciclopropano (Δcfa) y de lípidos de ornitina ($\Delta o/sb$), las cuales presentaron una disminución en la población a partir del día 2 posterior a la inoculación, hecho que coincide con el descenso del pH (pH 4). Cabe señalar que la cepa parental también presentó un declive en la población, sin embargo no fue tan evidente como el que manifestaron las dos mutantes. El descenso en el pH se debe a que la temperatura (24°C) favoreció el desarrollo de los microorganismos presentes en la leche debido a que estos utilizan de manera más eficiente los carbohidratos que contiene la misma (Trejo, 2014; Frazier, 2011; Guinot, 1995), dando como

resultado el aumento de ácidos en el medio, ej. ácido láctico y ácido acético. Dicha acidificación influye de manera significativa sobre la membrana externa ya que esta representa la primera barrera entre el ambiente extracelular y el medio intracelular (Alvarez,2014).

La membrana celular juega un papel importante en el crecimiento, en el metabolismo, en el transporte de energía y en el mantenimiento de un ambiente intracelular constante, siendo también el blanco primario de los daños inducidos por el estrés ambiental (Chu-Ky, 2005).

Las bacterias utilizan la regulación de ácidos grasos de membrana para disminuir el efecto del estrés ambiental, ya que se ha observado que *Streptococcus mutans*, *S. gordonii* y *S. salivarius* incrementan los niveles de cadenas largas de ácidos grasos insaturados, sugiriendo que la modulación de la composición de ácidos grasos es necesaria para que se presente la sobrevivencia de la bacteria en ambientes con pH bajo (Frazier, 2011; Ying-Ying, 1999). Por lo tanto, se puede pensar que la mutante Δcfa de *B. abortus*, al carecer del gen que codifica para la sintasa de ácidos grasos de ciclopropano, disminuye su capacidad de regular los cambios en la fluidez e impermeabilidad, producidos por el pH extracelular por lo que deja de crecer y multiplicarse. Esto concuerda con lo mencionado por Pucci en 2004, quien afirma que estos ácidos grasos están presentes en otras bacterias en las que también tienen funciones de mantenimiento de la homeoviscosidad de membrana, ya que existen reportes de modificaciones en los porcentajes de ácidos grasos de ciclopropano en bacterias como *Pseudomonas putida*,

Pseudomonas fluorescens, *E. coli*, *S. mutans*, como respuesta a variaciones de pH.

Valderrama y col. en 1998, encontraron que *Halomonas salina* modifica su porcentaje de ácidos grasos de ciclopropano en detrimento de los ácidos grasos monoinsaturados, produciendo un notorio incremento cuando estos ácidos grasos se determinan en la fase exponencial de crecimiento.

La cepa GNP-OH-3 de *Pseudomonas fluorescens* tiene un comportamiento en la modificación de ácidos grasos como respuesta a las variaciones de temperatura que comparte con otros integrantes de su género. Aumenta sus ácidos grasos saturados y disminuye los ácidos grasos insaturados con el aumento de la temperatura (Pucci, 2004). Estos datos ponen de manifiesto, el papel que juegan los ácidos grasos de ciclopropano para la adaptación de algunas bacterias entre las que podría estar *B. abortus* como se pudo evaluar en el presente trabajo, ya que al carecer de los genes que codifican para la sintasa de ácidos grasos evitan la sobrevivencia de la mutante, mientras que la cepa 2308 logra sobrevivir un día más bajo estas condiciones. Pucci en 2004, pone de manifiesto que la ciclopropanación de ácidos grasos puede ser un factor que sirva para soportar pH's bajos, ya que halló diferencias entre aislamientos de *Helicobacter* identificados como colonizadores gástricos, los cuales tienden a generar mayor cantidad de ácidos grasos de ciclopropano (CFA's), y los colonizadores intestinales que no lo hacen. Paula y colaboradores 1996, demostraron que la permeabilidad de los protones en la bicapa lipídica es inversamente proporcional al grosor de la misma sugiriendo así que si la conversión de ácidos grasos

insaturados a CFA's tiene el mismo efecto de incrementar el grosor de la bicapa lipídica, esto pudiera producir la resistencia a los ambientes ácidos.

La cepa $\Delta olsb$ de *B. abortus*, inoculada en leche, también sufrió un decremento en cantidad y tiempo de supervivencia, siendo estos cambios estadísticamente significativos en comparación con la cepa parental 2308 de *B. abortus*. Al respecto se ha sugerido que, debido a la naturaleza polar de los lípidos de ornitina, proveen una barrera permeable y de una estructura fluida que sirve como matrices para las proteínas asociadas a la membrana (Gao, 2004). Por lo tanto las interacciones lipoproteicas pueden ser críticas para su localización, doblado, estabilidad, ensamble y actividad enzimática; por lo que perturbaciones en los lípidos de ornitina pueden llevar a un decremento y/o degradación de citocromo C y otras proteínas de membrana (Gao, 2004).

En el presente estudio también se midió la actividad de agua, ya que una deshidratación extensa puede causar una transición de las membranas de la bicapa laminar a una fase II hexagonal invertida en que hay fosfolípidos que forman una micela que se intercala entre la bicapa (Raivio,2005; Cronan, 1975). Las bacterias que se exponen a bajos valores de A_w deben ajustar la composición de ácidos grasos de su membrana o efectuar otras adaptaciones para minimizar los efectos de solidificación de los lípidos por efectos de la deshidratación, que sería análogo a la adaptación homeobiscosa de la fluidez de la membrana al presentarse cambios de temperatura o presión hiperbárica (Zhang, 2008). Se han demostrado cambios de los perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos durante condiciones de inanición y desecación en medios porosos, pero es difícil separar

los efectos de ambos (Frazier, 2011; Zhang, 2008; Muñoz, 2006). Sin embargo este factor no influyó en la sobrevivencia de las tres cepas ya que sus valores estuvieron por encima de 0.90. Esto debido en gran medida a la cantidad de agua presente en la leche cruda.

Las cepas de *B. abortus* 2308, Δcfa y $\Delta oslB$ fueron sometidas a cambios abruptos (descenso del pH a 24°C) en el ambiente extracelular que requirieron de la modificación de los componentes de membrana existentes para adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones. Sin embargo las mutantes no realizaron dichas modificaciones debido a la carencia de los genes que codificaban para lípidos y ornitina y ácidos grasos de ciclopropano mostrando una menor capacidad de sobrevivencia en leche cruda de vaca.

Debido al costo en tiempo y la extensión de dichas modificaciones más su amplia distribución en *B. abortus* y otras bacterias, se sugiere un importante rol fisiológico de los lípidos de ornitina y de los ácidos grasos de ciclopropano.

La formación de ácidos de ciclopropano y el aumento de lípidos de ornitina pueden ser importantes para la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente, debido a su aumento pudiera disminuir pasivamente la permeabilidad de protones o incrementar activamente el flujo de salida de protones (Zhang, 2008; Gao, 2004; Raivio, 2005).

8. Conclusiones.

Se determinó que las cepas mutantes Δcfa y $\Delta oslB$ tuvieron menor capacidad de sobrevivencia en leche cruda a 24° C, en comparación con la cepa parental 2308, ya que la cepa parental sobrevivió 1 día mas que ambas.

No se observó diferencia significativa ($P \geq 0.05$), en la sobrevivencia en leche cruda de vaca a 4° C., entre las cepas mutantes $\Delta oslB$ y Δcfa con respecto a la cepa parental 2308.

El pH ácido es un factor que influye en la sobrevivencia de *B. abortus* en leche cruda.

La temperatura de 24°C influye de manera indirecta en la sobrevivencia de *B. abortus*, ya que favorece el crecimiento de otros microorganismos provocando el descenso del pH.

Ninguno de los valores de aw obtenidos, estuvo por debajo de .80, por lo que no fue un factor que alterara la sobrevivencia de las cepas de *B. abortus* en leche cruda de vaca.

9. Referencias

- Acha PN, Boris S. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, Bacteriosis y Micosis. Volumen I Tercera edición. Washington, D.C. Organización Panamericana De La Salud. Washington, DC, EUA; 2001.
- Alvarez OA, Conor C, Therese D, Begley M, Hill C. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*. International Journal of Food Microbiology 2014; 178: 21–28.
- Aune K, Jack C, Russell RJ, Corso B. Environmental Persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. The Journal of Wildlife Management 2011 :1–9.
- Baquero CE, Chaves OE, Weiss S, Guzmán VC, Chacón DC, *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. PLoS ONE 2007; 2: 1-9.
- Bargen VK, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. FEMS Microbiology Reviews 2012; 36: 533–562.
- Castro HA, Raquel GS, Inés PM. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005; 39 (2): 203-16.
- Cevallos FO, Carranza PM, Saucedo AS, Romero GD, Ramos GL, *et al.* Diagnóstico Serológico (Rosa de Bengala) y Molecular (PCR) de Brucelosis En Humano. Ciencia y Tecnología 2010; 3 (1): 27-32.

- Chongde W, Zhang J, Wang M, Guocheng D, Chen Jian. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2012; (39): 1031–1039.
- Chu-Ky S, Tourdot M R, Maréchal PA, Guzzo J. Combined, cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1717: 118–124.
- Costas MJ, Pinto RM, Martín CP, Cabezas A, Alvez PI, Cameselle CC, Meireles R. CGDEase, a *Pseudomonas fluorescens* protein of the PLC/APase superfamily with CDP-ethanolamine and (dihexanoyl) glycerophosphoethanolamine hydrolase activity induced by osmoprotectants under phosphate-deficient conditions. *Molecular Microbiology* 2010, 78 (6): 1556–1576.
- Cronan JE, Bell RM. Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis. Phenotypic suppression of sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase Km mutants by loss of feedback inhibition of the biosynthetic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 1975; 250 (18):7153-7158.
- Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. *Brucellosis*. INIFAP, IICA, OPS. México.2001.
- Doyle MP. *Microbiología de los alimentos; fundamentos y fronteras*. American Society for Microbiology. Washington, DC. 2001.
- Edelson MS, Porteous MK, Buchanan RL. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acidic environment. *Journal of Food Science* 2006; 71: 201-207.

- Falenski A, Mayer SA, Filter M, Göllner C, Appel B, Nöckler K. Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 145: 326–330.
- Franco MP, Mulder M, Gilman R, Smits H. Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* 2007; 7: 775–86.
- Frazier, WC. *Food microbiology*. McGraw-Hill Interamericana 2011. 1978 – 540.
- Gao JL, Weissenmayer B, Taylor MA, Oates JT, López L, Otto Geiger. Required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Molecular Microbiology* 2004; 53 (6): 1757–1770.
- Guinot PT, Al AM, Laurent F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. *International Dairy Journal* 1995; 5 (2) :211–223
- Grogan DW, Cronan JE. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 1997; 61(4) :429–441
- ICMSF. *Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios*. España. Acribia.1998.
- Kato H, Goto N. Adjuvanticity of an ornithine-containing lipid of *Flavobacterium meningosepticum* as a candidate vaccine adjuvant. *Microbiology and Immunology* 1997; 41:101–106.
- Kawai Y, Watanabe M, Matsuura M, Nishijima M, Kawahara K. The partially degraded lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* and ornithinecontaininglipids derived from some Gram-negative bacteria are

useful complex lipid adjuvants. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2002; 34:173–9.

- Loffhagen N, Härtig C, Geyer W, Voyevoda M, Harms H. Competition between *cis*, *trans* and Cyclopropane Fatty Acid Formation and its Impact on Membrane Fluidity. Engineering in Life Sciences 2007; 7 (1): 67–74.
- Luna MJE, Mejía TC. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Veterinary Microbiology 2002; 90: 19–30.
- Méndez GKY. Evaluación de la sobrevivencia de *Brucella melitensis* en quesos de cabra durante su elaboración y maduración. Tesis de Maestría, México D.F. 2007.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H. Abdolrahimzadeh H. The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens*. Federation of European Biochemical Societies Letters 1974; 43 (3): 257–260.
- Moreno Renata. Features of *pseudomonads* growing at low temperatures: another facet of their versatility. Environmental Microbiology Reports. 2014. 10.1111/1758-2229.
- Mortel M, Grillo MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López GI, *et al.* Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. Molecular Microbiology 2004; 52 (3): 735–750.

- Muñoz MS. Factores de riesgo asociados a la seropositividad a *Brucella abortus* en ranchos de gado bovino de pie de cría o ciclo completo del municipio de Tizimín, Yucatán, México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Producción Animal Tropical. Universidad Nacional Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yucatán, México. 2003.
- Palacios CL, Conde AR, Gil RY, Zúñiga RA, Baquero CE, Chacón DC, *et al.* *Brucella abortus* Ornithine Lipids Are Dispensable Outer Membrane Components Devoid of a Marked Pathogen- Associated Molecular Pattern. PLoS ONE 2011; 6: 1-12.
- Palacios CL, Zúñiga RA, Gutiérrez A, Gil RY, Conde AR, Iriarte M, *et al.* Identification and functional analysis of the cyclopropane fatty acid synthase of *Brucella abortus*. Microbiology 2012; 158: 1037-1044.
- Paula S, Volkov AG, *et al.* Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid properties of Escherichia coli mutants defective in the synthesis of cyclopropane fatty acids. Journal of Bacteriology 1996; 125: 518-523.
- Poolman B, Blount P, Joost HA, Robert HE. How do membrane proteins sense water stress?. Molecular Microbiology 2002; 44 (4): 889–902.
- Pucci GN, Pucci OH. Changes in Membrane Fatty Acids of *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 with Changes of Temperature and Osmolarity. Acta Biológica Colombiana 2006; 11 (2): 61-73.
- Raivio LT, Envelope stress responses and Gram negative bacterial pathogenesis. Molecular Microbiology 2005; 56 (5): 1119–1128.

- Rodríguez, GO, Walklin RM, Jayaram S, Griffiths WM. Cross-protective effects of temperature, pH, and osmotic and starvation stresses in *Escherichia coli* O157:H7 subjected to pulsed electric fields in milk. *International Dairy Journal* 2011; 21: 953-962.
- Rosenfeld C, Blas I, Ernst S, Ramírez C, Rivera A, Silva E, Rojas H. Population dynamic in herds participating of the bovine brucellosis eradication program in the X Region of Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2007; 39 (1).
- Solomon HM. Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within Laboratory-Fermented bovine milk. *Biomed Central* 2014; 7:175.
- Suárez F, Arellano RB, Díaz AE. Brucellosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; CENID–Microbiología, INIFAP SAGARPA, 2009. Disponible en:
<http://www.zoonosis.unam.mx/contenido/publicacion/archivos/libres/Brucellosis.pdf>.
- Trejo R, Corzo MS, Wilkinson K, Higginbotham. Effect of a low temperature step during fermentation on the physico-chemical properties of fat-free yogurt. *International Dairy Journal* 2014; 36: 14-20.
- Valderrama, M.J. Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Research in Microbiology* 1998; 149 (9): 675–679.

- Vega Medellín D. M. *Brucella abortus*: antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera De Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D.C. 11 de Agosto del 2006.
- World Health Organization. Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control; The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines; Report of WHO Meeting. Food and Agriculture, Organization of the United Nations (FAO), Office International des Epizooties (OIE) Geneva, Switzerland 11-12 December 1997.
- Ying YC, Cronan JE. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1999; 33(2): 249-259.
- Zhang YM. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews/ Microbiology* 2008; 6: 222-233.
- Zaritsky A, Parola AH, Abdah M, Masalha H. Homeoviscous adaptation, growth rate, and morphogenesis in bacteria. *Journal of Biophysical Society* 1985; 48: 37-339.
- Zúñiga EA, De la Garza M, Sánchez MM, Santos LEM, Filardo KS, López MA. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2005; 47 (3-4): 88-91.