

T
498

90854

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A ESTRÉS ÁCIDO EN CEPAS
DE *Escherichia coli* AISLADAS DE POZOL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

M. en C. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

Dra. Julia Pérez Ramos

ASESOR

Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores

México D.F.



Mayo 2005

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

El día 11 de Mayo de 2005

Jurado:

Co-Director: Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

Ma. del Carmen Wachter

Co-Director: Dra. Julia Pérez Ramos

Julia Pérez R.

Asesor: Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores

Jorge Mateo Villaseca Flores

Sinodal: Dr. Alejandro Azaola Espinosa

Alejandro Azaola Espinosa

Sinodal: Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Guillermo Mendoza Hernández

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Biología Experimental G-007 del Departamento de Sistemas Biológicos, División de CBS de la UAM-Xochimilco, de los Departamentos de Salud Pública y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como en el laboratorio 324 de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

DEDICATORIAS

A mi amadísimo esposo, Javier, por llenar toda mi vida con su amor, cariño y comprensión, por recorrer siempre a mi lado, todos los caminos que nos hemos trazado.

A mis hijos Santiago y José Ignacio, que son la razón de mi vida y cuyo amor y alegría me estimularon para llegar a esta meta.

A la memoria de mi padre Celedonio, quien con su luz siempre alumbra mi camino.

A mi querida madre Herminia, por su amor, dulzura y apoyo.

A mis hermanos y sobrinos con fraternal cariño.

A mis amigos.

A mis compañeros de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco por esta gran oportunidad de superación académica.

A la Dra. Carmen Wachter, por brindarme su confianza y apoyo incondicionales y sobretodo por la amistad y el cariño que nos une.

Al Dr. Carlos Eslava, por su gentileza, apoyo, dedicación y por su gran amistad.

A la Dra. Julia Pérez por su apoyo y amistad a través de tantos años.

Al Dr. Jorge Villaseca, por su interés y oportunas observaciones, por su amistad.

Al Dr. Guillermo Mendoza por su apoyo y amistad.

Al M. en C. Ulises Hernández por su cariño, apoyo y dedicación.

A la M. en C. Elisa Drago y M. en C. Cristina Fresán por compartir juntas esta meta y una amistad.

A la Dra. Marisol López por su cariño y apoyo de tantos años.

A Raúl Gutiérrez y a mis alumnos de servicio social por su generosa ayuda.

A mis compañeros de seminario, especialmente a Gloria Díaz y Sandra Bolaños.

A todos mis compañeros de trabajo y amigos de la UAM-Xochimilco sin cuya participación este trabajo no hubiera sido posible.

A la UNAM.

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN	8
ABSTRACT	11
MARCO TEÓRICO	13
Pozol	13
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	16
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	19
Respuesta a estrés por ácido en <i>Escherichia coli</i>	21
Proteínas de membrana externa	26
OmpX	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
Bacterias	31
Reto ácido	31
Extracción de proteínas de membrana externa (OMP's)	31
Perfil Electroforético	33
Transferencia a membranas PVDF	
(difluoruro de polivinilideno) para secuenciación	
N-terminal de proteínas	34
Extracción de ADN	35
Diseño de los iniciadores del gene de la proteína OmpX para PCR	36
PCR	36
Secuenciación de los productos de PCR	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Determinación de la sobrevivencia a diferentes	
valores de pH ácido de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas	
de pozol resistentes a la acidez	38
Perfiles electroforéticos y secuenciación de bandas	
de proteínas de interés	43
PCR	50
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	56

RESUMEN

El pozol es una bebida ácida que se prepara diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado. Es de origen maya y se ha consumido en el sureste de México desde épocas prehispánicas hasta la fecha por grupos indígenas y mestizos.

En este trabajo se estudiaron la sobrevivencia y los cambios en el perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de dos cepas de *E. coli* aisladas de pozol y se compararon con las de una cepa O157:H7 y otra cepa K12. Se estudió también la presencia del gene de la proteína de membrana externa OmpX en todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas de dicho alimento.

En la primera parte de esta investigación se determinó la sobrevivencia de las cepas de *E. coli* aisladas de pozol, resistentes a la acidez, a diferentes valores de pH ácido, bajo dos diferentes condiciones: a) sin fase adaptativa, b) con previa fase adaptativa a pH 5, y se comparó con cepas de *E. coli* K12 y con otra de serotipo O157:H7 consideradas respectivamente como controles.

Los resultados obtenidos muestran claramente que las cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) aisladas de pozol, aumentan significativamente su sobrevivencia en condiciones ácidas, como las que se presentan en este alimento, en el que los valores de pH disminuyen gradualmente como resultado del proceso de la fermentación.

Estudios realizados con cepas de *E. coli* O157:H7 señalan que esta bacteria presenta mecanismos de protección a la acidez tal y como lo muestran los resultados obtenidos y, además, también se observa como las cepas patógenas aisladas del pozol resisten igualmente este estrés ácido.

El perfil electroforético muestra que existen cambios en el patrón de bandas obtenidas en cepas no adaptadas al ácido previamente y retadas con los diferentes ácidos, comparadas con el control, que es la cepa no adaptada y no retada con los diversos ácidos.

Se seleccionaron algunas de estas proteínas de membrana externa y se determinó su secuencia amino terminal. Los resultados mostraron que las porinas principales como la OmpC y la OmpA disminuyen en las cepas retadas con ácido, y la OmpF no aparece en estas cepas de pozol, tanto en las adaptadas como en las no adaptadas al ácido y además, tampoco está presente en las cepas control no adaptadas y no retadas con ácidos. Es de notarse que la OmpF no aparece en la cepa O157:H7, y solamente se pudo identificar en la cepa control (K12) no retada y no adaptada. Esto nos habla de que una vez que las cepas se exponen a ambientes ácidos como las del pozol, los cambios que se presentan permanecen aunque se las aisle y se las conserve en congelación.

Una banda proteica que desaparece en la cepa de pozol 95217 retada con ácidos clorhídrico y láctico fue secuenciada y se identificó como producto de degradación de OmpA, que es una de las porinas que se encuentra en mayor número de copias, por lo que fue posible identificarlo en el perfil electroforético de esta cepa.

Se secuenció otra banda de aproximadamente 22 kDa, la cual correspondió a OmpW. Su expresión decreció en las cepas de pozol no adaptadas y retadas con ácido clorhídrico y ácido láctico y permaneció sin cambios en las cepas no adaptadas y retadas con ácido acético, cuando se compara dicha banda con la cepa no adaptada y no retada con ácidos.

Una proteína secuenciada que resultó de gran interés fue la OmpX, que se expresó cuando las cepas de pozol se retaron con los ácidos orgánicos. Se realizó un monitoreo con el fin de determinar si esta proteína estaba presente en todas las cepas de pozol aisladas en un trabajo previo (Sainz y col., 2001) y se encontró que en 70 de las 73 cepas, el gene de la

OmpX estaba presente, y que con excepción de dos de ellas, todas las que portaban el gene pertenecían a cepas reportadas como patógenas de algunas de las clases de *E. coli*, o tenían algún factor de virulencia como toxinas o fimbrias etc., o habían sobrevivido a valores de pH por debajo de 4.8, por lo que sugerimos que esta proteína OmpX, está involucrada con situaciones de estrés a las que se ven sometidas las células bacterianas.

ABSTRACT

In this study, the acid resistance and the changes in outer membrane protein (OMP) profiles of *E. coli* strains isolated from pozol, an acid-fermented maize beverage consumed in Southeastern Mexico, were determined. Results showed that adaptation to acid by these *E. coli* strains significantly enhances their survival in acid conditions, suggesting that each strain possesses different strategies to face the different challenges. Changes in OMP profiles were found in non-adapted acid challenged cells compared with non-challenged cells that had not been adapted to acid. Adapted cells showed no significant changes in these profiles when compared with the acid adapted non-challenged strains. N-terminal sequences of some of the Omps were determined. A 220 kDa fraction was identified in the *E. coli* strains isolated from pozol and in the *E. coli* O157:H7 strain. This protein, which was not possible to sequence, was not present in K12 strain. The intensity of the main porins OmpC and OmpA was lower in the acid challenged strains, than in the non-challenged ones. The OmpF porin was only identified in non-challenged K12 strain, but did not appear in adapted or non-adapted pozol strains nor in *E. coli* O157:H7. A band with a molecular mass of 27 kDa approximately that disappeared in pozol strain 95217 challenged with HCl and lactic acid was sequenced, and it showed to be a degradation product of the same OmpA.

A protein band with an approximate molecular mass of 22 kDa corresponds to OmpW, its expression decreased in pozol strains challenged with HCl and lactic acid, and remains without changes in the non-adapted strains challenged with acetic acid when compared with the same non-challenged strain.

Because it was one of the main proteins expressed when strains were acid challenged with organic acids, it was decided to investigate if OmpX was present in all the strains isolated

from pozol samples. Seventy out 73 *E. coli* strains isolated from pozol in a previous work (Sainz et al., 2001) carry this gene. Strains that carry the *ompx* gene, belong to a reported pathogenic class of *E. coli* strains, or have virulence factors or survived at pH values less than 4.8. The rest do not belong to any pathogenic reported serotype and do not have any virulence factor or survived at low pH values. We suggest this protein could be involved in survival to stress conditions.

Keywords: *Escherichia coli*; Acid resistance; Outer membrane proteins; OmpX; virulence genes; acid-fermented foods; Pozol

MARCO TEÓRICO

Pozol.

El pozol es una bebida ácida que se prepara diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado. Es de origen maya y se ha consumido en el sureste de México desde épocas prehispánicas hasta la fecha por grupos indígenas y mestizos (Ulloa y col. 1983). El proceso de fermentación es efectuado por una microbiota muy compleja, que incluye bacterias, levaduras y hongos y ocurre de manera natural, sin inoculación, como en la mayoría de los alimentos de origen antiguo. Al fermentarse de forma semisólida, presenta heterogeneidad en cuanto al grado de aereación y a la composición química, lo cual posiblemente da lugar a la formación de diversos microambientes.

La palabra pozol viene de la palabra nahuatl *pozolli*, que significa espumoso. El pozol es una masa de nixtamal fermentada moldeada en forma de bolas de diferentes formas y tamaños que van de 10 a 12 cm de longitud y de 5 a 8 cm de amplitud, con un peso entre 70 y 170 g, aunque puede pesar 1 kg o más. Este producto es elaborado en los Estados de Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, y en menor escala Veracruz y Oaxaca (Cañas Urbina y col, 1993). Es consumido por diferentes grupos étnicos, como los chontales, choles, mayas, lacandones, tzeltales, zoques, tzotziles, tojolabales, chamulas, mames, zoques y zapotecos del sur y sureste de México, con fines alimenticios, ceremoniales y medicinales (Ulloa y col. 1983). El pozol constituye la principal fuente de energía para sus consumidores, así como un importante aporte de proteínas y vitaminas (Wacher y Santillana, 1990).

Para su consumo, las bolas de pozol son diluidas con agua, obteniéndose una bebida no homogénea de sabor ácido, refrescante, a la cual se le puede adicionar sal, azúcar, miel o chiles secos, y se toma como refresco a cualquier hora del día, durante las

jornadas de trabajo. Los chamulas y lacandones consumen el pozol cuando realizan viajes largos a la selva, debido a su alto grado de conservación (Ulloa y col. 1996).

De acuerdo con Ulloa y col. (1983), la técnica de preparación del pozol se ha transferido de una generación a otra para el consumo familiar, o para una escala comercial pequeña. El pozol se elabora a partir de granos de maíz (0.5-1 kg), de preferencia blanco, que se hierven en agua con cal (aproximadamente 10% de Ca(OH)_2), durante 1 hora, o hasta que los granos se hinchan y los pericarpios se separan fácilmente, posteriormente se enfrían y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se le conoce como nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se obtiene una masa martajada a la que se le da forma de bola manualmente. Estas bolas se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días, dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevalecientes.

En función de los factores sociales y culturales del productor, existen dos tipos básicos de pozol: el mestizo y el indígena. La diferencia entre éstos consiste en que el pozol mestizo recibe una segunda cocción o “reventado” de los granos de maíz después de la nixtamalización (Ulloa y col., 1996; Cañas Urbina y col. 1993).

El pozol fermentado tiene un pH inferior a 5 después de 20 horas de incubación, que es lo suficientemente bajo como para evitar la proliferación de algunas bacterias patógenas, incluso mantenido a temperatura ambiente. Sin embargo, y a pesar del bajo valor de pH, diversas bacterias entéricas han sido aisladas de este alimento y los números de las mismas no disminuyeron aún después de 30 horas de incubación (Wacher y col., 1993).

En un trabajo previo (Sainz y col., 2001), no obstante establecerse una fermentación láctica, algunos de los serogrupos de *Echerichia coli* patogénicos sobrevivieron y pudieron

aislarse inclusive a valores de pH de 3.7, como el serotipo O88:H25 reportado como perteneciente al grupo de las *E. coli* enteropatógenas, que presentaba genes implicados con propiedades de virulencia. La respuesta adaptativa a ambientes ácidos y su impacto en la sobrevivencia a estos ambientes ha sido estudiada para el serotipo O157:H7 de *E. coli*. La expresión de sistemas adaptativos probablemente aumenta la sobrevivencia de estas bacterias en la presencia de ácidos láctico y acético en productos alimenticios acidificados.

La ingestión de estas bacterias patógenas puede ser causa de cuadros clínicos de gastroenteritis de distinta gravedad, dependiendo de la especie, la cepa, de la dosis ingerida y de la predisposición del individuo. Además, enterobacterias patógenas pueden sobrevivir a valores de pH bajos, por el hecho de que poseen mecanismos de defensa en contra de estos ambientes ácidos, como son: la presencia de procesos homeostáticos por la inducción de descarboxilasas de aminoácidos, mecanismos de reparación de DNA, chaperoninas y otros que aún no están bien definidos (Bearson y col., 1997).

Escherichia coli

Bacterias de forma bacilar, gramnegativas, anaerobios facultativos, no esporulados, oxidasa negativos, móviles o inmóviles, fermentan la glucosa con producción de ácido y gas (algunas cepas no producen gas), producen indol a partir de triptófano, no producen acetoina, y no pueden utilizar citratos como única fuente de carbono. Forman parte de la microbiota intestinal y tienen un papel nutricional importante ya que producen vitaminas, en especial la vitamina K (Brock y Madigan, 1993).

Escherichia coli es de los microorganismos anaerobios facultativos más importantes del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente. Coloniza al recién nacido horas después de su nacimiento y juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal.



Esta bacteria permanece confinada dentro del lumen intestinal como un saprófito inocuo, pero en huéspedes debilitados o inmunosuprimidos, causa infecciones oportunistas. También existe un conjunto de cepas de *E. coli* que poseen un arreglo específico de propiedades de virulencia que les permite contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped y causar enfermedad. Estas cepas pueden ser agentes etiológicos de diferentes enfermedades entre las que incluyen: diarrea, disentería, síndrome urémico hemolítico, infecciones del riñón y vejiga, septicemia y meningitis neonatal. Por tal motivo se han agrupado en tres categorías de acuerdo al tipo de infecciones que producen: infecciones del tracto urinario, enfermedades diarreicas y meningitis/sepsis neonatal (Nataro y Levine, 1994).

E. coli fue originalmente descrito como patógeno intestinal por Bray en 1945, tras demostrar que una cepa era la responsable de producir diarrea en hospitales durante el verano, causando brotes de diarrea infantil (Levine, 1987). En México, en 1946 se reportó el aislamiento de *E. coli* en un caso mortal de diarrea infantil, esta cepa presentaba un antígeno común con *Salmonella adelaide* y fue denominada *E. coli* Gómez (Varela y col., 1946).

La clasificación serológica de *E. coli* se basa en tres diferentes antígenos constituidos por: 174 somáticos (O), 80 capsulares (K) y 56 flagelares (H) (Doyle y col. 1997).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).**

La capacidad patógena de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea se comprobó experimentalmente en la década de los años 40 del siglo pasado, cuando, al inocular oralmente voluntarios con dosis elevadas (10^8 - 10^{10} bacterias / ml) de estos microorganismos, éstos presentaban diarrea y desarrollaban una respuesta inmunológica

sistémica contra el antígeno somático. Neter propuso el término de enteropatógena para designar a estas bacterias aisladas de niños con diarrea y confirmadas como virulentas en los estudios con voluntarios humanos adultos (Levine, 1987).

En países subdesarrollados las cepas EPEC son la causa principal de diarrea infantil, sobre todo en niños menores de 6 meses de edad. La sustitución de la alimentación materna por leche de fórmula aumenta el riesgo de contraer diarrea y agrava los problemas de malnutrición (Law, 1994).

Desde los años cuarenta estudios de necropsias de niños que habían fallecido a consecuencia de diarreas asociadas con cepas EPEC indicaban que el intestino delgado presentaba lesiones de esfacelamiento (Varela y col., 1946). El primer estudio realizado en el laboratorio sobre la capacidad de EPEC para adherirse en forma íntima a células eucariontes fue publicado por Cravioto y col., en 1979. Estos autores encontraron que aproximadamente el 80% de una colección importante de cepas EPEC formaba microcolonias sobre el citoplasma de células HEp-2 en cultivo. Esta característica no la compartían otros grupos de *E. coli* con o sin capacidad para producir diarrea. Estudios posteriores, incluyendo algunos con microscopía electrónica, han demostrado que existen cuando menos tres tipos de adherencia de *E. coli* a células HEp-2 y HeLa: la llamada **localizada** con formación de microcolonias en el citoplasma celular, la denominada **difusa** donde hay adhesividad de bacterias en todo el citoplasma celular, y la **agregativa** donde existe agregación bacteriana tanto al citoplasma celular como al vidrio de la preparación (Scaletsky y col., 1984, Vial y col., 1988). La evidencia epidemiológica publicada indica que existe asociación estadística entre colonización con cepas de adherencia localizada y la presencia de diarrea aguda y entre colonización con cepas de adherencia agregativa y la diarrea persistente (Nataro y col., 1987, Cravioto y col., 1991).

Se ha propuesto que la adherencia de tipo localizado de las cepas EPEC al enterocito tiene tres fases; en la primera la asociación entre la bacteria y la célula huésped esta mediada por adhesinas de tipo fimbriado, en la segunda, la unión de la bacteria con la célula huésped dispara un evento de transducción de señales, que está asociado con la activación de tirosín-cinasas, y un aumento en los niveles de calcio intracelular; y por último, en la tercera fase, la bacteria se asocia íntimamente con la célula huésped y ocurre un amplio rearrreglo de las fibras de actina en la vecindad de la bacteria. Histológicamente la segunda y la tercera fase se observan como esfacelamiento del epitelio (deformación y destrucción de algunas microvellosidades), así como la formación de una estructura de pedestal (formada por una capa densa de fibras de actina) en el citoplasma de la célula huésped, justo abajo de donde está la célula adherida. A este proceso se le conoce como adherencia y esfacelamiento (AE).

Los genes identificados en este proceso se denominan *eae* y están localizados en una región del cromosoma de la bacteria. Este *loci* está formado por los genes *eaeA* y *eaeB*, el primero es el que codifica para una proteína de membrana externa de 94 kDa denominada intimina, relacionada con la adherencia íntima a la célula del huésped. Tanto *eaeB* como otros genes *sep* están relacionados con la regulación y la secreción de ésta y otras proteínas. La adherencia en la fase inicial parece estar mediada por haces de fimbrias (Bfp) parecidos a los que elabora *V. cholerae*, y es posible que medie también la unión bacteria-bacteria que presentan estas cepas (microcolonias). La codificación genética para una subunidad de estos haces de fimbrias esta dada por un gene *bfpA* localizado en un plásmido denominado EAF, relacionado tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada a células HEp-2, como para causar diarrea en voluntarios.

Este plásmido también codifica para ciertos genes que regulan la expresión de los genes cromosomales *eae*.

Se ha señalado que la adherencia íntima de las cepas EPEC da lugar a que se polimerice la actina del citoesqueleto, como respuesta al incremento en los niveles de calcio intracelular y a la activación de la proteína cinasa C. Estos cambios bioquímicos intracelulares son los que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. La diarrea subsecuente es consecuencia de este incremento, aunado a la falta de absorción adecuada, por la ausencia de micro-vellosidades en segmentos grandes del epitelio intestinal. Los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se han podido evidenciar *in vitro* mediante un sistema de marcaje fluorescente (sistema de faloidina actina fluorescente FAS), de la actina polimerizada en los pedestales que forman las células epiteliales, asociados con lesiones de adherencia y esfacelamiento.

El sistema de secreción Tipo III compuesto por proteínas como EspC, EspD, EspF y otras aún desconocidas, también media la entrega de una proteína a la membrana plasmática de la célula huésped. Esta proteína se denomina Tir por sus siglas en inglés *translocated intimin receptor* (receptor translocado para intimina) y por lo tanto, es el receptor de la intimina lo que da la unión íntima entre la bacteria y la célula huésped (Nataro y Kaper, 1998).

No se ha demostrado la existencia de exotoxinas en EPEC (Law, 1994; Sears y Kaper, 1996; Eslava y col., 1994; Levine, 1987).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).**

En 1982 se presentó un brote de colitis hemorrágica en varios lugares de los Estados Unidos, y se identificó el serotipo O157:H7 (considerado el prototipo) como el

causante de estos brotes. Este grupo propuesto por Levine, incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características epidemiológicas y patogénicas. Una característica general que las distingue es su incapacidad para fermentar el sorbitol, su incapacidad para producir β -glucuronidasa y su gran tolerancia a valores de pH bajos, no obstante, la cepa O157:H- que si fermenta el sorbitol se asoció con diarrea hemorrágica. Estudios epidemiológicos realizados con la cepa O157:H7 indican que las infecciones ocurren con mayor frecuencia en países desarrollados de Europa (principalmente Gran Bretaña), Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) y Japón entre otros. También se le asocia como uno de los agentes etiológicos del síndrome urémico hemolítico (HUS).

Las citotoxinas que producen reciben dos nombres de acuerdo con sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares, uno es citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), por la propiedad que tiene una de las variedades de cruzar antigénicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y el segundo verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero (rifión de mono verde).

Son en realidad una familia de citotoxinas que se divide en tres grupos antigénicos: SLT-I o verotoxina 1, SLT-2 o verotoxina 2 que afectan específicamente a humanos y SLTIIv que es una variedad antigénica de VT2 y afecta a animales, dichas citotoxinas están codificadas por bacteriófagos lisogénicos. Su acción es semejante a la de la toxina Shiga, es decir, terminan con la síntesis de proteínas, dando lugar a la muerte de la célula intoxicada.

Otros factores de virulencia están relacionados con la alteración histológica del colon denominada adherencia y esfacelamiento (AE). Un *locus* cromosomal de 35 kb denominado LEE (*locus of enterocyte effacement*) contiene el gene *eaeA* cuya expresión está regulada por un plásmido de 60 MDa, el cual además codifica para una estructura

fimbrial. El gene *eaeA*, cuya homología con respecto al gene *eaeA* de las cepas EPEC es del 86% (Yu y Kaper, 1992), codifica para una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, la cual confiere a la bacteria la capacidad para adherirse e inducir el efecto de destrucción de las microvellosidades (esfacelamiento). Otros genes como *espA* y *espB* (antiguamente *eaeB*), codifican para otros polipéptidos que se requieren para la transducción de señales, necesaria para la formación de la lesión –AE. También existe dentro del *locus* LEE un sistema de transporte codificado por genes *sep* para secretar factores de virulencia.

Los brotes más recientes se relacionan frecuentemente con la ingesta de alimentos contaminados, como hamburguesas de carnes de res, leche, agua, etc., y también por contacto con animales y de persona a persona.

En México los serogrupos EHEC reportados son: O55, O26 y O111 entre otros, los cuales se relacionan con diarreas leves o moderadas (Doyle y col., 1997; Sears y Kaper, 1996; Eslava y col., 1994; Levine, 1987).

Los serogrupos O comúnmente reportados incluyen: 26, 46, 48, 55, 91, 98, 111, 113, 117, 118, 119, 125, 128, 145, 157 y 172 (Lior, 1994).

Respuesta a estrés por ácido en *Escherichia coli*.

Escherichia coli y otras enterobacterias como *Salmonella* y *Shigella*, enfrentan muchas situaciones de estrés ambiental físico y químico, siendo la acidez uno de ellos. Como resultado de esto, las bacterias han desarrollado estrategias adaptativas para minimizar los daños inducidos por el ácido o los álcalis.

Las bacterias gram negativas, así como las positivas utilizan sistemas diferentes, así como redundantes, para lidiar con el estrés ácido. Se inducen algunos sistemas para alcalinizar el pH interno.

En el cuerpo humano la acidez del estómago reduce el número de organismos viables, tanto inocuos, como patógenos, que pasan a través de él, donde son comunes valores de pH entre 2 y 3. La presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta presentes en el intestino y en heces, tienen el mismo efecto. La resistencia a la acidez contribuye a la virulencia de patógenos entéricos (Sato y col., 2000).

Patógenos intracelulares facultativos como *Salmonella*, toleran valores bajos de pH dentro de los fagosomas de los macrófagos, y el pH ácido de la orina y de la vagina debe ser resistido por patógenos urinarios como *E. coli* uropatogénica

Los microorganismos entéricos se enfrentan también a diversas condiciones de estrés ácido, por ejemplo, el que existe en los desechos industriales, el drenaje ácido de las minas que se descarga a ríos y lagos y por la propia degradación de material orgánico. Por lo tanto, la capacidad para monitorear y responder a cambios de pH potencialmente letales, es crucial para la sobrevivencia de estos microorganismos (Goodson y Rowbury, 1989, Bearson y col., 1997, Baik y col., 1996).

El estrés ácido se define como el efecto biológico combinado de pH bajo y de ácidos orgánicos débiles presentes en el ambiente. Estos ácidos débiles incluyen ácidos grasos volátiles como el butírico, propiónico y acético. Los efectos letales de estos ácidos no sólo son dependientes de su concentración, sino del pH ambiental y de sus constantes de disociación. Estos ácidos en su forma protonada (sin carga) pueden difundir a través de la membrana y disociarse dentro de la célula, reduciendo el pH interno (pHi) en el proceso. Mientras más bajo sea el pH externo (pHo) más ácidos débiles no disociados atravesarán la membrana y afectarán el pH interno de la célula (Baik y col., 1996, Bearson y col., 1997).

Términos como “resistencia a la acidez”, “tolerancia a la acidez” y “habitación a la acidez”, se usan para describir la sobrevivencia a valores bajos de pH, en diferentes

condiciones de crecimiento de los diferentes microorganismos. En medios de cultivo complejos *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* sobreviven a valores de pH entre 2 y 2.5 (resistencia a la acidez), mientras que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lo hace en medio mínimo a valores de pH de 3 (tolerancia a la acidez) (Lin y col., 1995).

Cuando se expone *E. coli* a valores moderadamente bajos de pH_o (externo) (5.5-6.0) se induce un proceso que protege a la célula de un cambio subsecuente a pH más bajos (3.4-4.0), esta respuesta se denomina “respuesta a tolerancia de ácido” o tolerancia a la acidez (ATR) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, y “habitución a la acidez” en *Escherichia coli* (cuando se trata de células en fase exponencial) (Foster y Hall, 1990., Hickey y Hirshfield, 1990).

El hecho de que una condición de estrés confiera protección contra otros estreses se denomina protección cruzada. Leyer y Johnson (1993), encontraron que si adaptaban *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a la acidez haciéndola crecer en condiciones ligeramente ácidas (pH 5.8) por dos o tres generaciones, ésta también había aumentado su tolerancia a otros tipos de estreses como el calor, salinidad, agentes superficiales activos como el cristal violeta y a la polimixina B. Este resultado sugiere que el paso de enterobacterias por el estómago, las prepara para soportar otros estreses ambientales que pudieran existir en el intestino. Otro hallazgo importante de los autores mencionados es que no encontraron diferencias entre la composición de los lipopolisacáridos de las cepas adaptadas a la acidez y las no adaptadas, después de digerirlos con proteinasa K y visualizarlos por tinción de plata después de ser sometidos a electroforesis SDS-PAGE.

En *E. coli* y *Shigella spp.* se habla de resistencia a la acidez, porque las mediciones se llevan a cabo durante la fase estacionaria de las células crecidas en medio completo (Luria) (Bearson y col., 1997).

Estudios realizados por Gorden y Small en 1993, demostraron que el 75% de sus aislados de *Shigella* y el 80% de *E. coli* eran resistentes a condiciones ácidas, mientras que todas las especies de *Salmonella* que probaron eran sensibles. Sin embargo, en un estudio subsecuente realizado por Lin y col., (1995), usando medio mínimo, ninguna de estas especies sobrevivieron al ser expuestas a un pHo de 2.5, aún a valores de pH de 3, *Shigella* fue la mas sensible. *E.coli* y *Salmonella* presentaron tolerancia a la acidez. En este trabajo se demostró que la composición del medio Luria Bertani y las células en fase estacionaria son importantes para el fenómeno de resistencia a la acidez (AR) a valores de pHo de 2.5.

Una explicación para estas observaciones es que se presentan tres sistemas AR dependientes de medio completo, en *E. coli* pero no en *Salmonella*. Dos de estos sistemas también están presentes en *Shigella*. (Lin y col., 1995). La actividad de estos sistemas depende, en parte, de que el metabolismo de las células sea oxidativo o fermentativo. Dos sistemas AR fermentativos involucran a las descarboxilasas inducibles, arginina descarboxilasa y glutamato descarboxilasa. Se presume que su acción sea muy parecida a la de lisina descarboxilasa presente en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, en que la descarboxilación del aminoácido consume un protón a valores bajos de pH_i, y un antiporte de membrana cambia este producto (cadaverina), por más aminoácido (lisina) presente en el medio. Se requiere del operón *adiA* que codifica para la arginina descarboxilasa de *E. coli*, y su recientemente descrito antiporte *adiC* (Gong y col., 2003), que se induce por pH ácido, anaerobiosis y medios ricos (Stim-Herndon y col., 1996). Se ha descrito un gene regulador *adiY* que se encuentra después del inicio de la transcripción (downstream) del *adiA*, y presenta gran homología con la familia de reguladores transcripcionales, la cual incluye al EnvZ y otros. En este sistema también se requiere

gadC, que es un gene que presuntamente codifica para un antiporte glutamato/ γ -amino butirato para el sistema AR dependiente de glutamato en *E. coli* (Hersh y col., 1996), y en *Shigella flexneri*, donde está regulado positivamente por σ^S (Waterman y Small, 1996). El factor σ^S de la fase estacionaria es codificado por el gene *rpoS* y desempeña un papel protector cuando *E. coli* se expone a estreses ambientales y de otro tipo (Stuart B., 1999).

El tercer sistema, llamado oxidativo, es inducido por el crecimiento a fase estacionaria en medio LB, reprimido por glucosa, y una vez inducido, no requiere de la presencia de aminoácidos en el medio durante un cambio subsecuente a un pH de 2.5 (Bearson y col., 1997).

La habituación al ácido (AH) ocurre en *E. coli* cuando crece en fase exponencial en medio nutritivo a un pH de 5. Esta habituación permite su sobrevivencia al ser transferida a un medio con valores de pH entre 3 y 3.5. La habituación al ácido aparentemente involucra síntesis de proteínas que, como un evento clave, reparan daños en el ADN. El ión fosfato y la porina dependiente de fosfato **PhoE**, parecen estar implicados, ya que los iones fosfato inhiben la habituación al ácido, y las mutantes *phoE* son resistentes al ácido (Rowbury y col., 1992). Se propone que **PhoE** proporciona un canal para la salida de H^+ al espacio periplásmico estimulando a una proteína de membrana que monitorea la acidez e induce la AH, mientras que el ión fosfato bloquea el acceso de los H^+ a la **PhoE** e interfiere con la transducción de señales.

Usando células de *E. coli* en fase exponencial, Guilfoyle y Hirshfield en 1996 demostraron que los ácidos orgánicos (ampliamente utilizados como conservadores de alimentos, como el acético, propiónico y butírico) podían inducir resistencia al ácido en medio completo. *E. coli* adaptada con 0.1% de butirato o propionato a pH de 6.5, sobrevivió treinta minutos, y entre 50-200 veces mejor que las células no adaptadas, al ser

cambiada a un pH de 3.5. Se sugiere entonces, que la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta puede disparar respuestas de sobrevivencia adaptativa que pueden ser de gran importancia para la sobrevivencia de patógenos de origen alimentario.

Estudios realizados con cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157:H7, mostraron la capacidad que tiene esta bacteria para sobrevivir en ambientes con valores ácidos de pH a 37°C. Benjamin y Datta en 1995, demostraron lo anterior al observar que bacterias de dicho serotipo se mantenían viables en medios de cultivo con valores de pH de 3.0 y 2.5 hasta 5 h, refiriendo además, que la mayoría de las cepas aisladas de este serotipo, presentan un nivel de tolerancia al ácido muy alto, similar al que previamente determinaron en cepas de *Shigella flexneri*. Así mismo, mostraron que la tolerancia al ácido era dependiente de la fase de crecimiento (estacionaria, o de hambruna en la fase log) y del medio de cultivo empleado. Arnold y Kaspar en 1995, obtuvieron resultados similares utilizando fluido gástrico sintético. Todos estos autores relacionan la baja dosis infectiva de estos microorganismos con las propiedades de sobrevivencia al ácido que presentan.

La permeabilidad de la membrana a los protones es de importancia crucial. Las células de *E. coli* adaptadas al ácido muestran una significativa reducción en la permeabilidad de los protones y esto correlaciona muy bien con el aumento a la tolerancia asociada con estas células (Jordan y col., 1999b). La sobrevivencia después de la exposición a pH 3 de células adaptadas de *E. coli* O157 ha sido relacionada con el aumento de los ácidos grasos de ciclopropano en la membrana (Brown y col., 1997).

Proteínas de membrana externa

Las bacterias responden y se adaptan a cambios ambientales a través de múltiples mecanismos que van desde un cambio rápido en la apertura o clausura de canales iónicos, a

la más lenta síntesis y regulación de la expresión de genes. Las proteínas de membrana externa (OMPs) de las bacterias gram negativas son moléculas clave que se encuentran entre la célula y el medio ambiente (Samartzidou y col., 2003).

La pared celular de las bacterias gram negativas comprende tres capas morfológicamente definidas. La capa más interna es la membrana citoplasmática que regula el paso de metabolitos dentro y hacia fuera del citoplasma. Después, encarándola, se encuentra una capa delgada de peptidoglucano que le confiere rigidez a la membrana citoplasmática. Finalmente, la capa exterior, la membrana externa (OM) constituida por lípidos, polisacáridos y proteínas.

Estudios de la membrana externa han revelado la presencia tanto de proteínas integrales de membrana, como de proteínas asociadas unidas a lípidos. En un estudio realizado por Ames y Nikaido, en 1976 reportaron 150 proteínas en la membrana de *E. coli*.

La membrana externa de bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, contiene principalmente porinas, denominadas OmpC y OmpF que forman generalmente canales de difusión a través de la membrana y permiten el acceso de moléculas hidrofílicas pequeñas. La expresión de proteínas de membrana externa de *E. coli* está afectada por el pH del medio, por ejemplo, si las células crecen a un pH bajo se aumenta la expresión de la proteína OmpC y decrece la de la OmpF. El control de la expresión de ambas porinas, está dado por proteínas denominadas EnvZ y OmpR. Una mutación en *envZ* no interfiere con la expresión de OmpF y OmpC en condiciones ácidas; no obstante, ésta se ve reprimida al agregar al medio NaCl, lo que conlleva una regulación por la osmolaridad, considerándolo un sistema *envZ* independiente en la expresión de porinas funcionando a un pH ácido (5.5) (Heyde, 1987; Sato y col., 2000). EnvZ es una proteína localizada en la periferia de la

membrana citoplasmática, por lo que actúa como un sensor, autofosforilándose en His 274, posteriormente transfiere el grupo fosfato a un grupo Asp 55 de OmpR. Bajas cantidades de OmpR fosforilado (OmpR-P), estimulan la transcripción de OmpF uniéndose a un sitio del gen con gran afinidad; por el contrario, OmpR-P en altas concentraciones reprime OmpF a través de una unión al gen de baja afinidad. OmpC es estimulada por OmpR-P uniéndose a un sitio del gen con baja afinidad, en ambos niveles de concentración.

Se pueden postular por lo tanto, dos mecanismos para la regulación de estas porinas a pH ácido: (i) la actividad de este sistema regulatorio de dos componentes se modifica por el pH y (ii) *E. coli* utiliza diferentes sistemas a diferentes valores de pH para la expresión de sus porinas (Sato y col., 2000).

En 1999 Jordan y col., en estudios con mutantes de OmpA, una de las porinas que se encuentran en mayor número de copias por célula, consideraron que la proteína mantiene la integridad de la estructura de la envoltura celular protegiéndola de las condiciones ácidas.

Se conocen otras proteínas transportadoras de nutrientes específicos, tales como, PhoE, paso de fosfato; LamB, difusión de maltosa y maltodextrinas; Tsx, paso de nucleósidos; FepA y FhuA, transporte de hierro; BtuB, vitamina B12 y; FadL, ácidos grasos. Otras proteínas más, son receptores de bacteriófagos y colicinas (Mohillo y col., 2000).

OmpX

En *E. coli* está identificada una proteína de membrana externa que incrementa la actividad $E\sigma^E$. Esta proteína es un 83% idéntica a la OmpX de *Enterobacter cloacae*. Muchas de estas proteínas como, Ail de *Yersinia enterocolitica* y Rck y PagC de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, tienen propiedades que le permiten a la bacteria adherirse a

células de mamífero, sobrevivir al suero humano y dentro de macrófagos. Por lo tanto, se consideran como factores de virulencia. El gen está regulado por un operón monocistrónico con dos promotores y un terminador dependiente de *rho* (Mecsas y col., 1995). La sobreproducción de OmpX disminuye las cantidades de las porinas OmpF y OmpC, aumentando la resistencia a β -lactámicos.

La estructura cristalina de la OmpX fue determinada por Vogt y Shulz (1999) y consiste de una estructura de β -barril configurada por ocho hebras antiparalelas, y dos cordones de residuos de aminoácidos aromáticos y un listón de residuos no polares unido a la membrana interior. El corazón del barril consiste en una red de enlaces de hidrógeno de residuos altamente conservados. Estructuralmente está muy relacionada con la proteína OmpA.

Maisnier-Patin et al., (2003) especifican que la OmpX de *E. coli* es reconocida por las células de la respuesta inmune innata, pero que no las activa, por lo que no provee de una señal de peligro para las células presentadoras de antígenos.

HIPÓTESIS

Las cepas de *Escherichia coli* que resisten ambientes ácidos de alimentos fermentados y que portan genes de virulencia, presentan cambios en la expresión de proteínas de membrana externa que contribuyen a su resistencia y probablemente a su patogenicidad.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los mecanismos de la resistencia a la acidez y de otros factores relacionados con la sobrevivencia a estrés ácido en cepas de *E. coli* aisladas del pozol.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la sobrevivencia a diferentes valores de pH ácido de las cepas de *E. coli* aisladas de pozol resistentes a la acidez, bajo dos diferentes condiciones: a) sin fase adaptativa, b) con previa fase adaptativa a pH 5.
2. Analizar el perfil electroforético de proteínas de membrana externa obtenidas en las dos condiciones anteriores.
3. Identificar las proteínas de membrana externa que se expresan bajo estrés ácido.
4. Secuenciar las proteínas de estrés ácido de interés, expresadas por las cepas estudiadas para la posible determinación de su función.
5. Identificar por PCR, en otras cepas bacterianas resistentes a la acidez, los genes que codifican para las proteínas de interés seleccionadas en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias:

Cepas de *E. coli* (EPEC) 95215 y 95217 con serotipo O88:H25 aisladas de pozol a pH 4.9 con genes de virulencia *eae*.

Cepa de *E. coli* (EPEC) 95222 con serotipo O88:H25 aislada de pozol a pH 3.7 con genes de virulencia *eae* y adherencia localizada.

Cepa de *E. coli* (EPEC) 95223 con serotipo O88:H25 aislada de pozol a pH 3.7

Cepa de *E. coli* (EHEC) 088267 con serotipo O157:H7. (Control).

Cepa de *E. coli* K 12. (Control).

Reto ácido.

Las cepas se crecieron toda la noche en medio Luria-Bertani (LB) amortiguado con 100 mM de MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico Cat. No. M-1254 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.), a pH 7 (cepas no adaptadas) y con 100 mM de MES (ácido morfolinethanosulfónico Cat. No. M-5287 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.) (cepas adaptadas) a pH 5 con agitación en una incubadora ORBIT Labline-incubator-shaker (Labline Instruments, Inc., Melrose Park, IL, USA) a 37°C. Estos cultivos se diluyeron a 10^7 o 10^8 ufc/ml y se sembraron en matraces que contenían 200 ml de medio LB acidificado con HCl a pH 2.5 o con ácido acético a pH 4 o ácido láctico a pH 4 para los retos ácidos y se incubaron con agitación (150 rpm) a 37°C durante 6 h. Para realizar la cuenta viable de cada uno de los matraces se hicieron diluciones en agua peptonada al 1% y se sembraron en placas de agar LB pH de 7. Las cuentas viables se determinaron en los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, y 6 horas incubando las placas a 37°C por 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Extracción de proteínas de membrana externa (Omp's).

De acuerdo a Debroy y col., (1995) se aplicó la siguiente técnica para la extracción de proteínas de membrana externa (Omp's).

Se inoculó la cepa correspondiente en 5mL de caldo Luria Bertani (LB) y se dejó incubar a 37°C, durante 6 horas con agitación a 150 rpm.

Se tomó 1mL del tubo y se sembró en 50mL de caldo LB con amortiguador MOPS [100mM] con un pH de 7, o con amortiguador MES [100mM] con un pH de 5. Se incubó de 18-24 hrs con agitación de 150 rpm.

Se tomaron 10mL de cada matraz y se depositaron para el reto con ácido, en 4 matraces con 200mL de LB previamente acidificados con ácido acético (pH 4), ácido láctico (pH 4) y ácido clorhídrico (pH 2.5). Se dejaron en agitación constante de 150 rpm, durante 6 horas.

Para la obtención del paquete celular, el cultivo se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C (rotor JA-14, Beckman).

Se resuspendió la pastilla con 3mL de HEPES (ácido *N*-2- hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanosulfónico Cat. No. H-3375 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.) 10mM (pH 7.4), adicionándose PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro), MEM (metil-maleimida) y EDTA (etilén dinitrotetraacetato disódico); asegurando una concentración final de 5mM para cada inhibidor de proteasas.

Las células resuspendidas se sometieron a sonicación (Ultrasonic Processor GE 130PB, Hielscher Systems GmbH, Teltow, Germany; 60 s, 30% output) en hielo durante 1 minuto.

Para la separación de las células no lisadas, se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 min a 4°C (Rotor JS24-15, Beckman).

El sobrenadante se adicionó con 1 ml de 2% N-lauroilsarcosinato (Sarkosyl) (Cat. No. L-9150 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.) y se incubó a temperatura ambiente por 1 h.

Las proteínas de membrana externa se obtuvieron después de centrifugar a $100\,000 \times g$ por una hora a 4°C (Rotor JA 18.1, Beckman). El botón obtenido se lavó con H₂O desmineralizada, dos veces. Se resuspendió en 200µL de HEPES 10mM y se almacenó a -20°C.

Para la determinación de la concentración de proteínas se aplicó el método de Bradford (Bradford, 1976).

Perfil Electroforético.

Para establecer el perfil electroforético las proteínas de membrana externa obtenidas se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1971) al 12.5% (acrilamida /bis, 10.83mL; tris-HCl 1.5M pH8.8, 6.51mL; H₂O desionizada, 8.225mL; Dodecil sulfato de sodio SDS 10%, 260.4µL; PSA Persulfato de amonio 10%, 130.2µL; TEMED N, N, N, N'- Tetra-metil-etilendimina, 13.02µL); utilizando un gel concentrador al 6% (acrilamida/bis, 1.8mL; tris HCl pH6.8, 2.225mL; H₂O desionizada, 4.781mL; SDS 10%, 88.935µL; PSA 10%, 88.935µL; TEMED, 17.785µL). De acuerdo a la concentración de proteína en µg/µl se utilizó el volumen que equivaliera a 15µg y se mezclaron con un volumen igual de solución reductora de Laemmli (amortiguador de carga) que contiene Tris-HCl 0.05M pH 6.8, SDS (1.6%), glicina (25%) y azul de bromofenol (0.003%) y se adicionó 1µL de 2-mercaptoetanol. Las muestras se aplicaron al gel de poliacrilamida y se corrieron a 200V/4°C. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie R250 (Bio-Rad 161-0400, Bio-Rad Laboratories, CA., USA.) y desteñido con

una mezcla de metanol al 30% y ácido acético al 10% para identificar las diferentes bandas de proteína. El gel se escaneó con ayuda del software SYNGENE.

Transferencia a membranas PVDF (difluoruro de polivinilideno) para secuenciación N-terminal de proteínas.

Después de haber realizado la electroforesis, se procedió a aplicar la transferencia de las proteínas para la secuenciación N-terminal (Towbin, A., y col., 1979). Las bandas separadas en un gel sin tefir, se transfirieron a membranas de PVDF, Millipore Immobilon-P (Cat. No. IPV400010 pore size 0.45µm, Millipore Corporation, Bedford, Ma., USA), de la siguiente forma:

Se preparó la membrana humedeciéndola en metanol, posteriormente en agua desionizada y por último, 1 minuto en amortiguador de transferencia (glicina 23 g, trizma-base 4.8 g, metanol 320 ml, agua desionizada 1.6 L y SDS 0.01%).

Se colocó la rejilla de la cámara, más la fibra (previamente humedecida en amortiguador de transferencia), más el papel filtro humedecido; para poder colocar el gel sobre el papel filtro, de manera que quedara el primer carril del lado derecho. La membrana se colocó sobre el gel, más papel filtro, más fibra, más la rejilla.

Se colocó la preparación del gel para la transferencia en la cámara, quedando el gel hacia el polo negativo y la membrana hacia el polo positivo, para lograr la migración de las proteínas a la membrana. Se corrió a 200 mA por 3 horas. La cámara contiene un amortiguador de transferencia preparado con trizma-base, 14.4g; glicina, 69g; metanol, 960mL; y H₂O desionizada, 4.8 L.

Finalizada la transferencia se tifieron con una solución de azul de brillante de Comassie, al 0.025% disuelto en metanol al 40%. Se destifieron con solución destefidora y las bandas de interés se cortaron con bisturí para su posterior secuenciación.

La secuenciación se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, por degradación de Edman en un secuenciador automático de proteínas en fase gaseosa (LF3000, Beckman Instruments Inc, Fullerton, California, USA).

Extracción de ADN.

La extracción de ADN de las cepas de pozol, se llevó a cabo utilizando un Kit para aislamiento de ADN siguiendo la metodología para bacterias gramnegativas (WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION KIT, Promega, Cat. A1120, Promega Corporation, Madison WI, USA).

Se preparó un inóculo de la cepa correspondiente en 5mL con medio LB y se incubó toda la noche a 37°C, con agitación constante de 150rpm.

Se adicionó 1mL del inóculo a 4 microtubos.

Se centrifugó durante 15 minutos en un microcentrífuga (Beckman, Microcentrifuge E) para obtener el paquete bacteriano.

Una vez decantado el sobrenadante, se agregó al paquete bacteriano 1mL de solución salina estéril para su lavado. Se centrifugó 15 minutos.

Se decantó la solución salina y se juntaron los paquetes bacterianos en un solo microtubo.

Se adicionaron 600µL de la solución para lisis de nucleicos.

Se incubó a 80°C durante 5 minutos en un baño María, para lisar las células. Se enfrió colocando unos minutos a 4°C.

Se agregaron 3µL de la solución de RNAasa a las células lisadas, invirtiendo el microtubo de 2 a 5 veces para mezclar.

Se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente.

Se agregaron 200µL de la solución para la precipitación de proteínas a las células lisadas tratadas con RNAasa, mezclando vigorosamente. Se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó durante 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo limpio de 1.5mL, y se agregaron 600µL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló invirtiendo el microtubo hasta observar una masa parecida a hilos en la solución, la cual es el ADN. Se centrifugó durante 2 minutos.

Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y se secó el microtubo colocándolo sobre papel absorbente. Se agregaron 600µL de etanol 70% a temperatura ambiente, mezclando por inversión para lavar el pellet de ADN. Se centrifugó durante 2 minutos.

Se decantó el etanol y se secó el microtubo en papel absorbente, permitiendo que el etanol se evaporara durante 15 minutos.

Finalmente, se agregaron 100µL de la solución para rehidratar el ADN y se incubó toda la noche a 4°C. Para su conservación se colocó a -20°C.

Diseño de los iniciadores del gene de la proteína OmpX para PCR.

Utilizando la secuencia completa del gene de OmpX de *E. coli* K 12 (no. Acceso L 37088) y un programa de computadora DNASTAR (Madison, WI) se diseñaron las siguientes secuencias de nucleótidos: S1 5'AATTGCATGTCTTTCAGC3' (*forward*) y para S2 5'GTAACCAACACCGGCAATCCA 3' (*reverse*) ((Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

PCR

La técnica de PCR se llevó a cabo utilizando un equipo para PCR QIAGEN Kit (TAq PCR Core Kit, Cat. No. 2012223, QIAGEN Inc., Valencia CA, USA). La mezcla de reacción estuvo compuesta de amortiguador PCR 1 ×, solución Q 1 ×, 0.5 µM de cada uno de los iniciadores, 200 µM de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados y 2.5 U de

Taq polimerasa. El volumen total de cada mezcla de reacción fue de 25 µl, utilizándose 1µl de ADN como templado.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes:

Un ciclo inicial a 94°C, durante 4 minutos para la desnaturalización del material genético y la activación de la *Taq* polimerasa. Posteriormente 30 ciclos de 94°C, 30 segundos., 42°C, 60 segundos, 72°C, 60 segundos y un paso para extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se sometieron a una electroforésis en agarosa al 1% y se visualizaron después de teñirlos con bromuro de etidio bajo luz UV en un equipo SYNGENE (Synoptic Ltd., Cambridge, UK.).

Secuenciación de los productos de PCR.

Los productos de PCR se purificaron para su secuenciación utilizando un equipo QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos purificados se secuenciaron en un secuenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Foster City, CA., USA), en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la sobrevivencia a diferentes valores de pH ácido de las cepas de *E. coli* aisladas de pozol resistentes a la acidez.

En un trabajo previo (Sainz y col., 2001), se aislaron cepas de *E. coli* con serotipo O88:H25 reportadas como enteropatógenas, que presentaban genes implicados con propiedades de virulencia, al principio y al final de la fermentación del pozol cuando los valores de pH eran de 3.7.

En la primera parte de esta investigación y cubriendo el primer objetivo específico de este proyecto se determinó la sobrevivencia a diferentes valores de pH ácido de dos cepas de *E. coli* (95217 y 95222) aisladas de pozol resistentes a la acidez bajo dos diferentes condiciones: a) sin fase adaptativa, b) con previa fase adaptativa a pH 5, y se comparó con cepas de *E. coli* K12 y con otra de serotipo O157:H7 consideradas respectivamente como controles.

Cuando el reto se llevó a cabo con HCl, las dos cepas de pozol sobrevivieron por más de 3 h. La cepa no adaptada de pozol 95222 sobrevivió por 6 h con una cuenta viable de 10^6 ufc/mL, que permaneció prácticamente sin cambios durante toda la exposición a valores de pH de 2.5. La cepa de *E. coli* O157:H7 no se detectó después de una hora de exposición a ese valor de pH y la cepa de *E. coli* K12 no se detectó después de media hora de exposición (Figura 1A).

Como se esperaba, las células adaptadas de todas las cepas sobrevivieron durante más tiempo al reto ácido que las no adaptadas. Cuando las cepas adaptadas se retaron con el mismo ácido, las cepas de pozol sobrevivieron por 6 h. Las cuentas viables de la cepa 95217 permanecieron prácticamente sin cambio y las de la cepa de pozol 95222 decrecieron 1.5 unidades logarítmicas después de 2 h de exposición. Las cepas de *E. coli*

O157:H7 sobrevivió por 3 h; la cuenta viable disminuyó de 10^5 ufc/ml durante la primera hora pero permaneció sin cambios hasta las 3 h. Esto sugiere que una subpoblación de células fue resistente durante ese tiempo, sin embargo, no se detectó cuenta viable después de 6 h de exposición. La cuenta viable para la cepa K12 se redujo más rápidamente que la de las otras tres cepas y no fue detectada después de una hora de transcurrido el reto ácido. (Figura 1B).

Por otro lado, al retarse las cepas no adaptadas con ácido acético se encontró que la sobrevivencia disminuía dramáticamente, sólo la cepa de pozol 95222 logró sobrevivir por 3 h, las cuentas viables para las cepas O157:H7 y K12 disminuyeron rápidamente y la primera sobrevivió por una hora y la segunda sólo 30 minutos después del reto ácido. (Figura 2A). Sin embargo, al retarse las cepas adaptadas, fue K12 y la cepa de pozol 95222 las que sobrevivieron por 6 h. Esto hace suponer que cada cepa se enfrenta al reto ácido de distintas maneras, siendo la cepa de *E. coli* K12 la mejor adaptada (Figura 2B).

Cuando el experimento se llevó a cabo retando a las cepas con ác. láctico, los resultados mostraron que las células no adaptadas de K12 sobrevivieron por 1 h, y las de 95222 por 3 h. La cepa O157:H7 y la cepa de pozol 95217, lo hicieron por 6 h. (Figura 3A). En cuanto a las cepas adaptadas y retadas con ác. láctico, no obstante que las cuentas disminuyeron de 10^8 a 10^6 UFC/ml después de 6 h, todas sobrevivieron satisfactoriamente (Figura 3B).

Estos resultados sugieren que cuando las cepas son retadas con ácido acético la sobrevivencia se ve más comprometida que cuando se lleva a cabo el reto con ácido láctico, y se puede especular que esto se deba a que la constante de disociación para el ácido acético (4.76) a pH de 4 forma más ácido protonado que para el ácido láctico a ese mismo pH y por lo tanto, penetra más ácido acético a la célula y el pH interno disminuye más rápidamente.

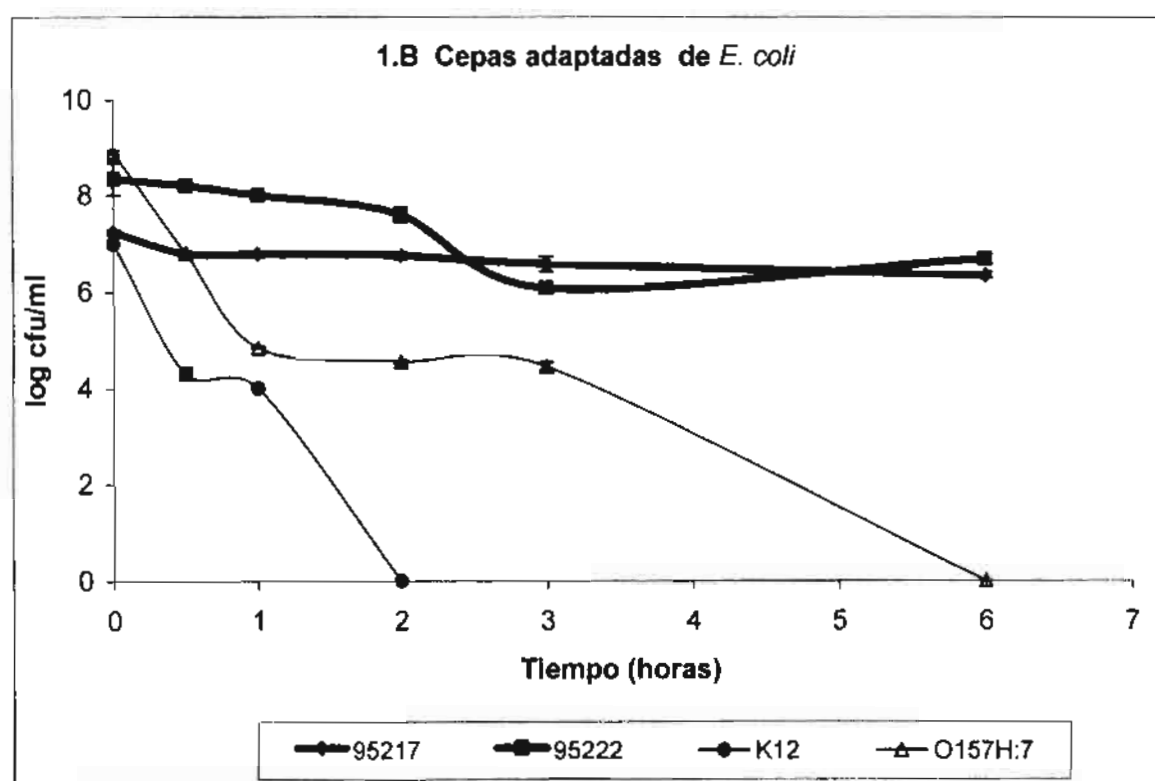
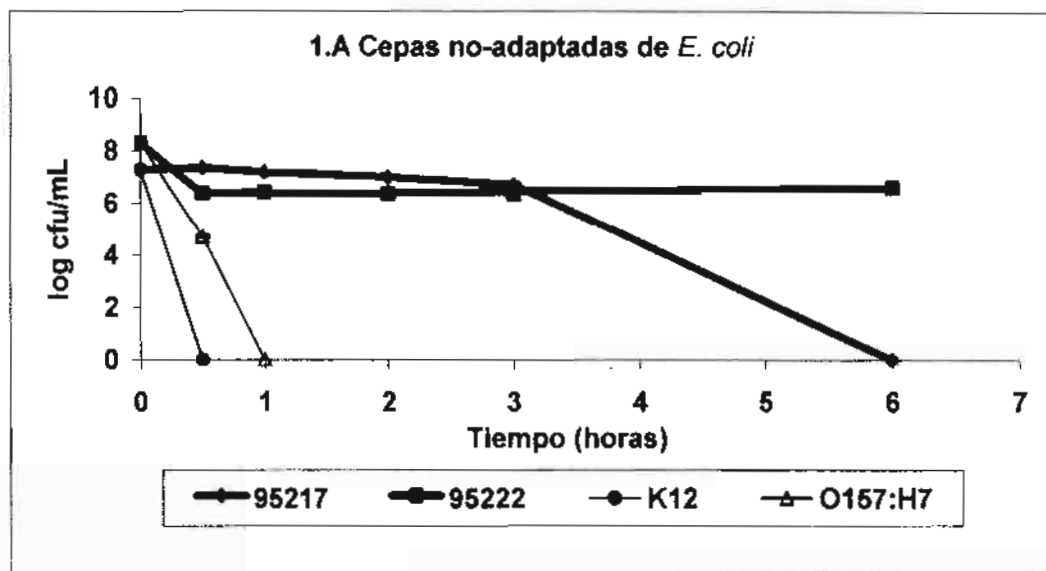


Figura 1. Supervivencia de cepas no-adaptadas (A) y adaptadas (B) de *E. coli* después del reto ácido en medio LB acidificado con HCl a pH 2.5. 95217 y 95222 (O88:H25) cepas de pozol, K12 y O157:H7 cepas control. DS indicada con barras.

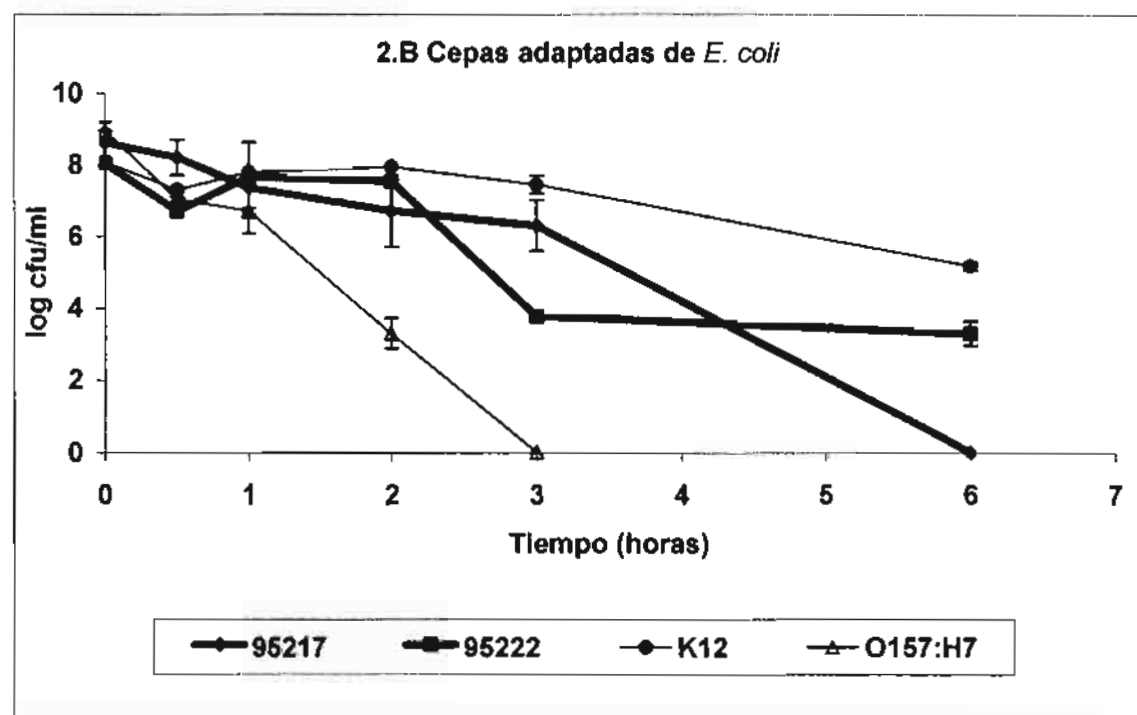
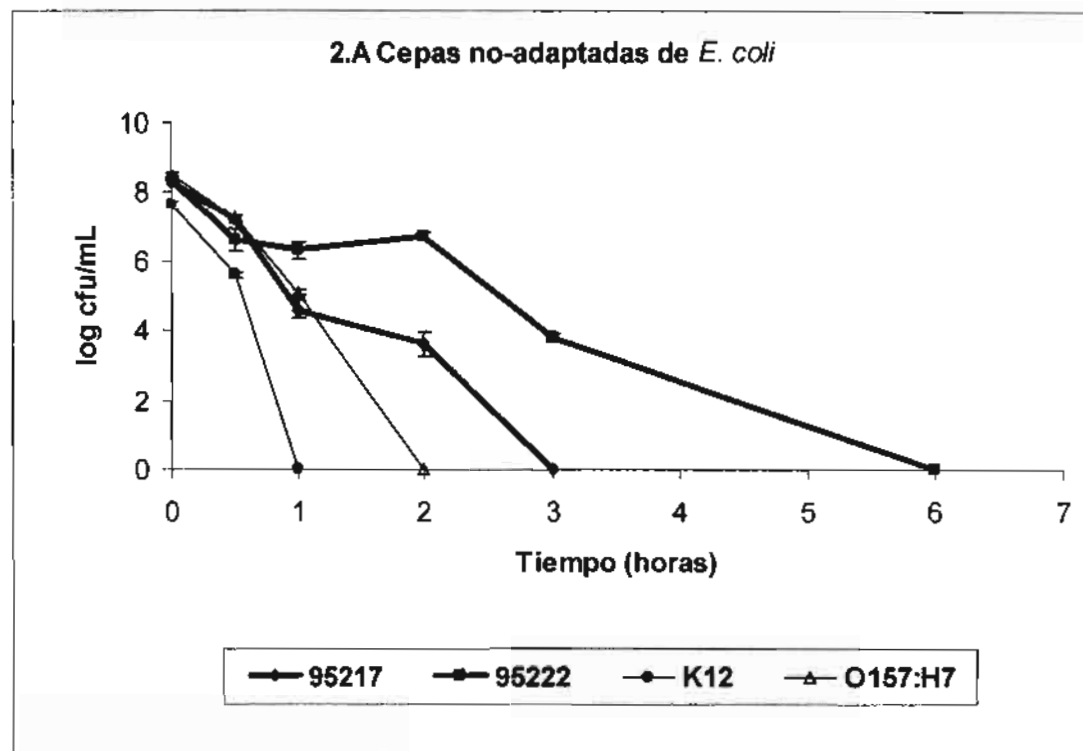


Figura 2. Supervivencia de cepas no-adaptadas (A) y adaptadas (B) de *E. coli* después del reto ácido en medio LB acidificado con ácido acético a pH 4. 95217 y 95222 (O88:H25) cepas de pozol. DS indicada con barras.

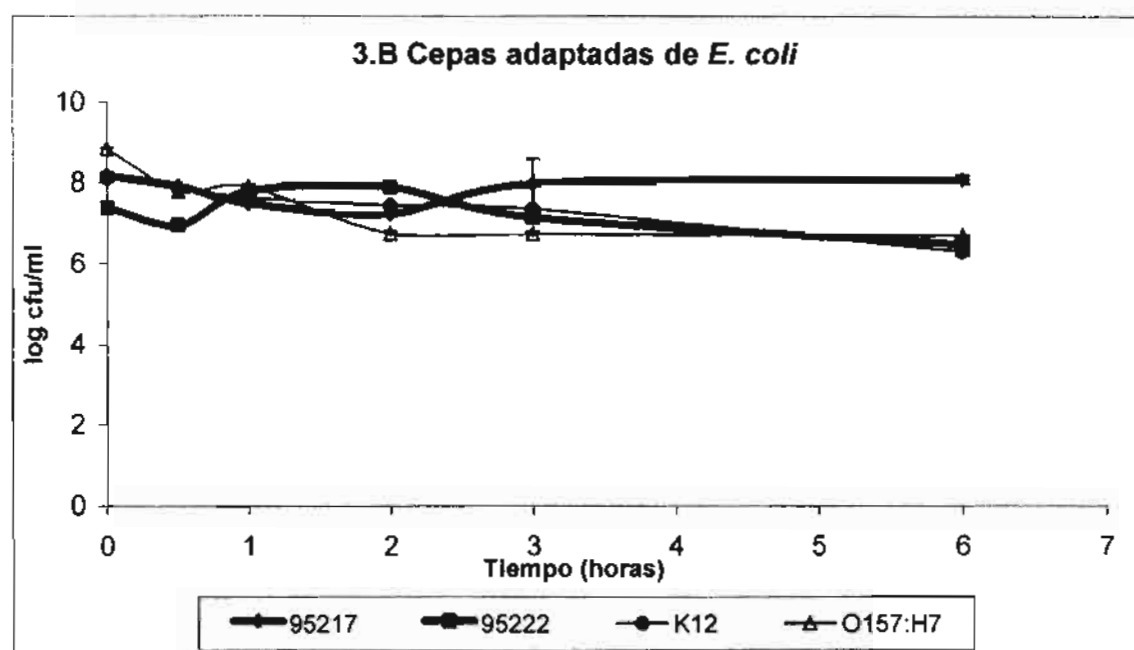
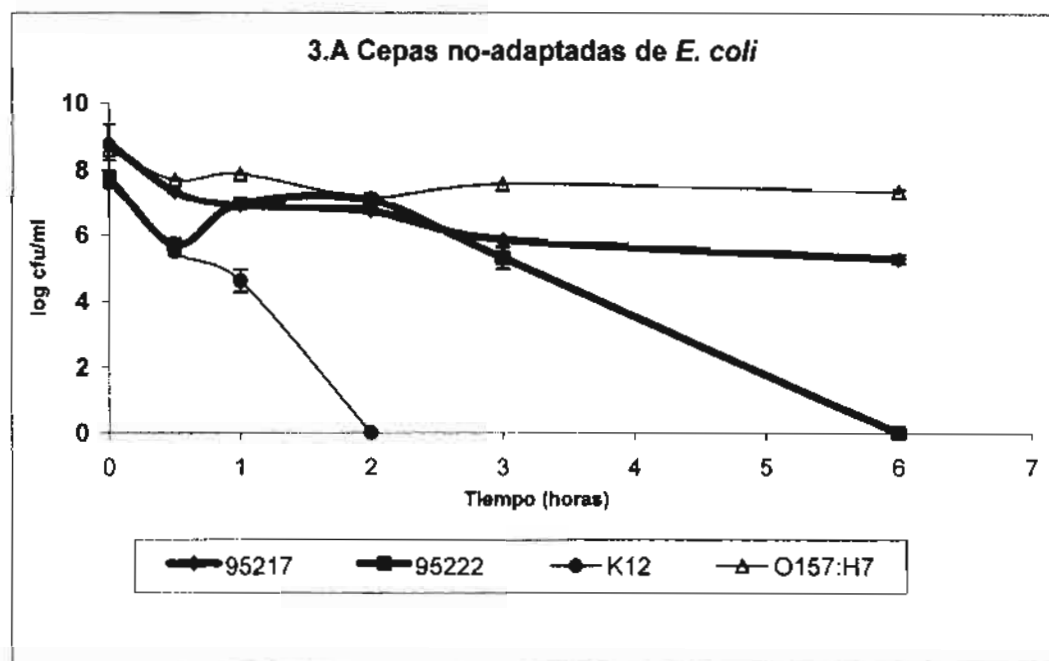


Figura 3. Supervivencia de cepas no-adaptadas (A) y adaptadas (B) de *E. coli* después del reto ácido en medio LB acidificado con ácido láctico a pH 4. 95217 y 95222 (O88:H25) cepas de pozol. K12 y O157:H7 cepas control. DS indicada con barras.

Estos resultados muestran claramente que las cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) aisladas de pozol aumentan significativamente su sobrevivencia en condiciones ácidas, como las que se tienen en este alimento ácido donde los valores de pH disminuyen gradualmente como resultado del proceso de la fermentación.

La habilidad de patógenos de origen alimentario para adaptarse a ambientes ácidos ha llamado la atención en la industria de los alimentos, sobre todo para la cepa O157:H7.

Estudios realizados por Yuk y Marshall (2004) con cepas de *E. coli* O157:H7 señalan que esta bacteria presenta mecanismos de protección a la acidez y que esta adaptación ocurre durante los procesos de fermentación. Los resultados obtenidos muestran cómo las cepas patogénicas aisladas del pozol se comportan de igual manera.

Perfiles electroforéticos y secuenciación de bandas de proteínas de interés.

Los resultados de los perfiles electroforéticos fueron los siguientes (Fig. 4):

Para la cepa 95217 no adaptada y retada con HCl (pH 2.5) comparada con la misma cepa no adaptada y no retada (C), se observa que aparece una banda de proteína con un peso molecular aprox. de 100 kDa y por otro lado, se observa que en lugar de la banda de 47 kDa aparece un doblete de bandas con pesos moleculares de 47 y 45 kDa respectivamente, en la lista que aparece en SWISS-PROT release 37 aparecen dos proteínas con pesos moleculares similares que podrían corresponder a dichas bandas, AG43(beta) con un peso de 49.7 kDa y LAMB con un peso de 47.8. Así mismo observamos que desaparece una banda de aprox. 35 kDa que corresponde según secuenciación a un producto de degradación de la proteína Omp A.

Es notorio que prácticamente desaparece la expresión de la proteína OmpX cuando dicha cepa se enfrenta a dicho reto y por otro lado se observa que la expresión de la proteína

inducible de inanición Dps (15 kDa) está aumentada, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura acerca de que dicha proteína recubre el ADN protegiéndolo de diversos estreses a los que se someten las células bacterianas.

En lo referente al estrés producido por ácidos orgánicos observamos que para el ác. acético la degradación de la OmpA aparece nuevamente y hay una expresión aumentada de proteína OmpW, aparece la expresión de la proteína OmpX nuevamente y la expresión de Dps se ve aumentada, no se observan bandas de degradación de OmpA.

Al analizar las bandas obtenidas para la cepa 95222, una banda de aproximadamente 20 kDa aumenta su expresión y aparece una banda de 13 kDa aproximadamente en el control que, sin embargo, desaparece en todos los retos con los diferentes ácidos. Es notorio también que para esta cepa los productos de degradación de OmpA se manifiestan en todos los retos. Al comparar los resultados obtenidos con las cepas control, lo más sobresaliente es que en la cepa K12 control (crecida en condiciones de un pH de 7 sostenido), aparece expresada la porina Omp F, sin embargo en todas las otras cepas probadas, tanto en las aisladas de pozol, como en la O157:H7, la expresión de dicha proteína es nula o demasiado baja para ser detectada por este método (Figura 4).

Existe un reporte en la literatura (Sato M. y col., 2000) que refiere que la expresión de proteínas de membrana externa OmpC y OmpF está regulada por la osmolaridad, y que, a valores bajos de pH la síntesis de OmpC aumenta y disminuye la de OmpF. Los hallazgos en este trabajo concuerdan con lo expresado en dicho reporte para la cepa control K12, sin embargo, las cepas aisladas de pozol y crecidas a pH 7 no expresan la porina OmpF, por lo que pensamos que una vez que se ha disparado este mecanismo de regulación, se preserva en las cepas resistentes a la acidez, sin importar el pH al cual se desarrollen nuevamente después de su aislamiento. Lin, J. y col., 1996 reportan que es de suma importancia para la

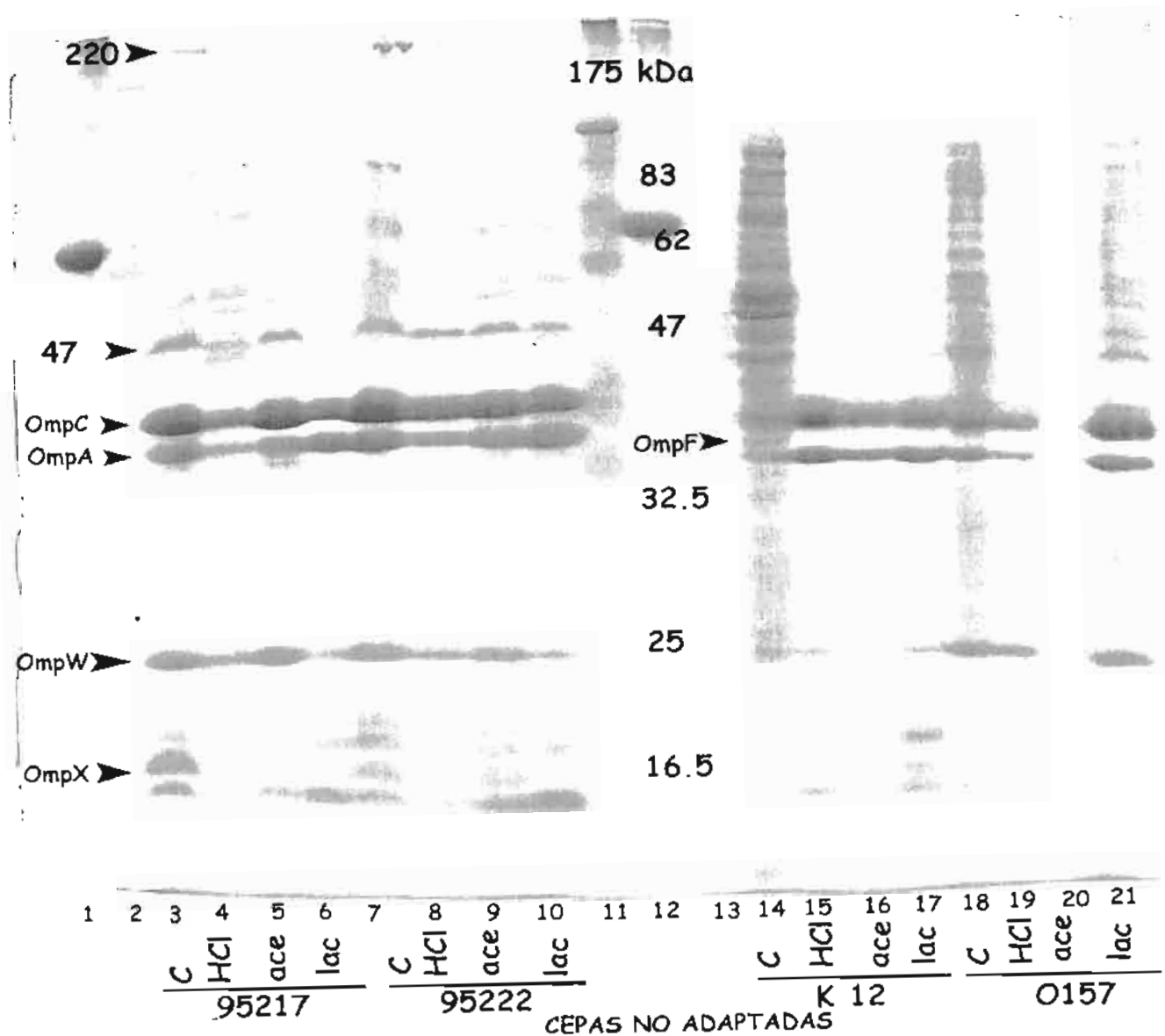


Figura 4. Perfiles electroforéticos de proteínas de membrana externa de cepas no adaptadas EPEC de pozol 95217 y 95222 y cepas no adaptadas de *E. coli* K12 y O157:H7. C control (cepa no retada), HCl, retada con HCl, ace, retada con ác. acético, lac, retada con ác. láctico. Carriles 1, 2, 11, 12, 13 marcadores de peso molecular.

industria alimentaria el hallazgo de que, una vez inducidos los sistemas de resistencia a la acidez, permanecen activos por periodos prolongados de almacenaje a 4°C.

También observamos que hay cambios en la expresión de muchas proteínas cuando esta cepa control se somete a retos de acidez. Es interesante hacer notar que aunque la proteína Dps es una proteína citosólica, aparece en la preparación de proteínas de membrana externa, por lo que se piensa que debe estar asociada a membrana. Esto concuerda con los reportes de Mohillo, y col., (2000), ya que proteínas que se consideran como marcadores de proteínas citosólicas por su abundancia como la DnaK y EF-TU no aparecen. Además, se ha reportado que esta proteína contribuye a la tolerancia a la acidez y al estrés oxidativo en *E. coli* O157:H7 (Choi, y col., 2000), recubriendo al ADN y protegiéndolo del daño causado por la depuración.

Por lo que se refiere a la OmpA, se reporta que pueden aparecer varias isoformas con múltiples cargas, y no es de sorprender, por lo tanto, sus múltiples apariciones, además de ser una de las porinas con mayor número de copias presentes (10^5 copias por célula) (Nikaido, 1996).

Se considera de sumo interés la banda de proteína que aparece con un peso molecular de alrededor de 200 kDa. Se observa en todas las cepas EPEC aisladas de pozol y no está presente en ninguna de las cepas control, tampoco se ha reportado en la literatura la existencia de una proteína de membrana externa con ese peso molecular. En las bases de datos consultadas, la de mayor peso molecular corresponde a una proteína hipotética con un peso molecular de 162.7 kDa denominada YPJA. La posibilidad de secuenciarla dará luz a este respecto y se sabrá si se trata de una nueva proteína.

Una banda de 92 kDa aproximadamente corresponde a la producción de intimina, una proteína de membrana externa que es un factor de virulencia necesario para la producción de las lesiones de adherencia y esfacelamiento características de las cepas EPEC y EHEC, Ésta se observa en las cepas EPEC aisladas de pozol, así como en la O157:H7.

Al observar las bandas obtenidas para las cepas adaptadas a pH 5 y retadas posteriormente (Figura 5) observamos que hay muy pocos cambios en el patrón de bandas de proteínas por lo que podemos concluir que los cambios en la expresión de proteínas se efectúa cuando las cepas crecen a pH 5 que les permiten adaptarse y de ahí su sobrevivencia a pH más bajos.

Dos cepas más de pozol, la 95215 y la 95223 se sometieron a los mismos procedimientos de estrés que las originalmente seleccionadas y podemos observar que el patrón de bandas es muy semejante a lo descrito anteriormente, aunque podemos decir que cada cepa presenta su propia respuesta a dicho estrés.

Una de las proteínas de membrana externa que llamó nuestro interés y de la que no se conoce de una manera cierta su función es la OmpX. Ésta presenta homología con las proteínas Ail de *Yersinia enterocolitica* y con Rck y PagC de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, (Mecsas, y col., 1995, Vogt y Schulz, 1999), las cuales presentan propiedades que permiten a las bacterias adherirse a células de mamífero, sobrevivir a la exposición de suero humano y/o sobrevivir dentro de macrófagos. Una vez determinada su secuencia se procedió al diseño de los iniciadores adecuados para, mediante el uso de la técnica de PCR, determinar su presencia en otras cepas de pozol y poder investigar su función dentro de la resistencia a la acidez, como por ejemplo, si el gene es idéntico al de la cepa K12.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

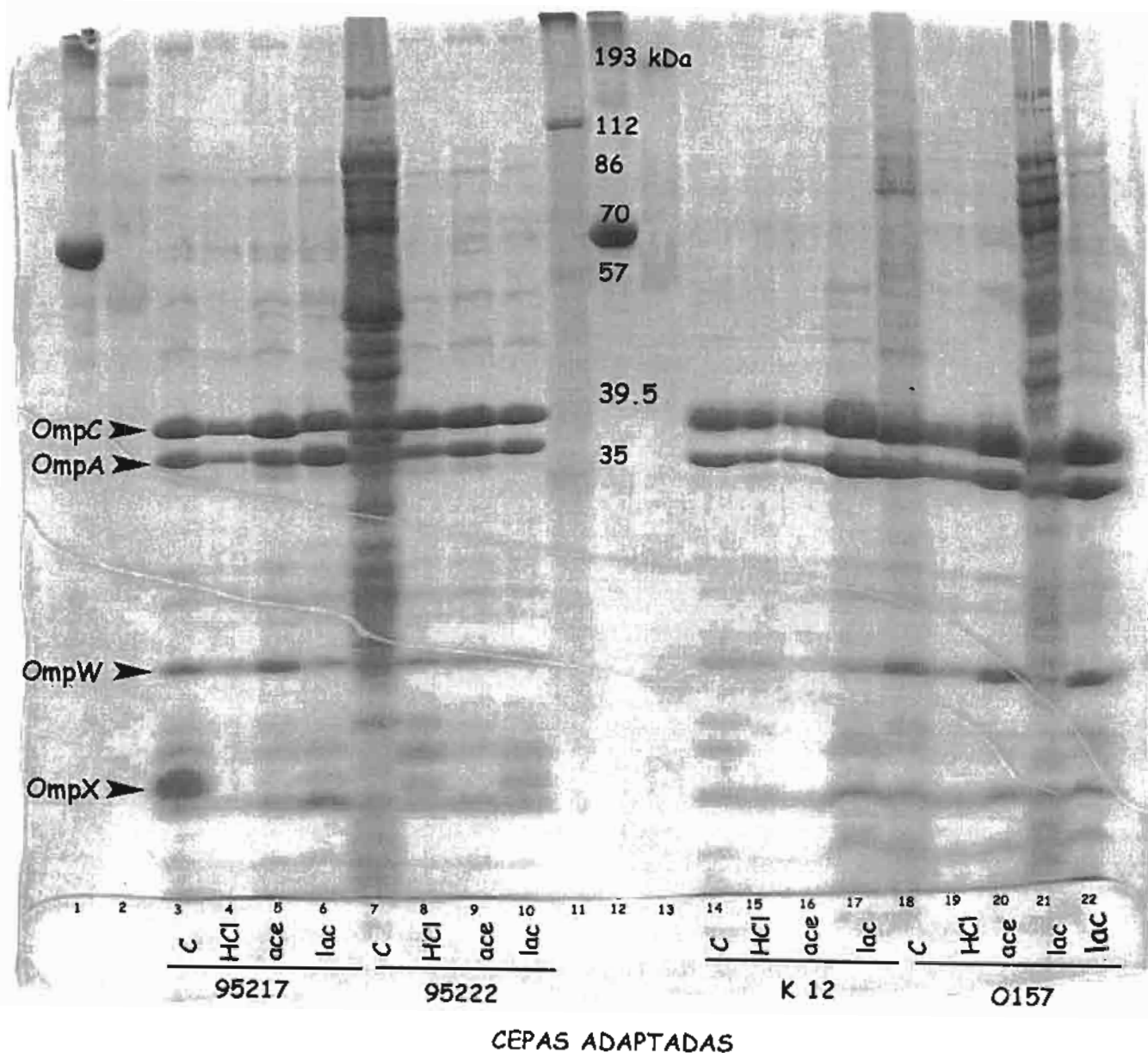


Figura 5. Perfiles electroforéticos de proteínas de membrana externa de cepas adaptadas EPEC de pozol 95217 y 95222 y cepas adaptadas de *E. coli* K12 y O157:H7. C control (cepa no retada), HCl, retada con HCl, ace, retada con ác. acético, lac, retada con ác. láctico. Carriles 1, 2, 11, 12, 13 marcadores de peso molecular.

Por último mencionaremos a la proteína OmpW, Pilsel y col., (1999) la describieron por primera vez como el receptor de la colicina S4 o como una parte esencial de dicho receptor y la situaron dentro de una familia nueva de proteínas de membrana externa de función desconocida. Presenta similitud de secuencias significativa con la proteína OmpW de *Vibrio cholerae* que es altamente inmunogénica. Sería de gran utilidad investigar la función biológica de esta proteína, aparte de ser el receptor de la colicina S4.

Tabla 1. Secuencias N-terminal de proteínas de membrana externa de la cepa 95217 no adaptada (MOPS) control pH 7.

Pesos moleculares aproximados (kDa) de proteínas de interés	Secuencia encontrada (Base de datos NCBI) BLAST
220	No se puede secuenciar por estar bloqueada, parece aglomerado de proteínas (no se encuentra en cepas control K 12 ni O157:H7).
47	Triptofanasa (MENFKHLPEPFRIRV)
38	OmpC (AEVYNKDGNK)
35	Omp A (APKDNTWYTGA)
27	Fragmento OmpA (APKDNTXY)
22	Omp W (HEAGEFFMRAG)
16	Omp X (ATSTVTGGYAQSDAQ)
15	Secuencia interna de la proteína inducible Dps (SKATNLLYTRNDVSD)

PCR

Se realizó la PCR para todas las cepas de pozol con el fin de determinar la presencia del gene *ompx* (Figura 6), y se encontró que 70 de las 73 cepas contienen dicho gene. Todas estas 70 cepas pertenecen a un patotipo reportado, presentan factores de virulencia o sobreviven a valores de pH menores de 4.8 (Sainz y col., 2001), con excepción de dos. Para las tres cepas que no presentan el gene, ninguna de ellas pertenece a un patotipo reportado o presenta factores de virulencia o sobrevivió a valores de pH por debajo de 5. Es posible que esta proteína pueda estar relacionada con situaciones de estrés.

El producto de PCR de la cepa de *E. coli* 95217 se secuenció y comparó la secuencia con la reportada en la literatura para el gene de *ompx* de *E. coli* K 12, encontrándose cambios sólo en tres de las bases y además que no afectaron al aminoácido codificado (Figura 7).

Otras 34 cepas de *E. coli* enteroagregativa también se sometieron a la búsqueda del gene *ompX*. Se encontró en todas las cepas reportadas como ambientales, aisladas de alimentos o de pacientes con diarrea, y no en las aisladas de pacientes asintomáticos.

Estos resultados concuerdan y demuestran que la proteína OmpX se sintetiza en grandes cantidades en situaciones de estrés tal y como refiere Schulz (2002) al analizar su estructura tridimensional.

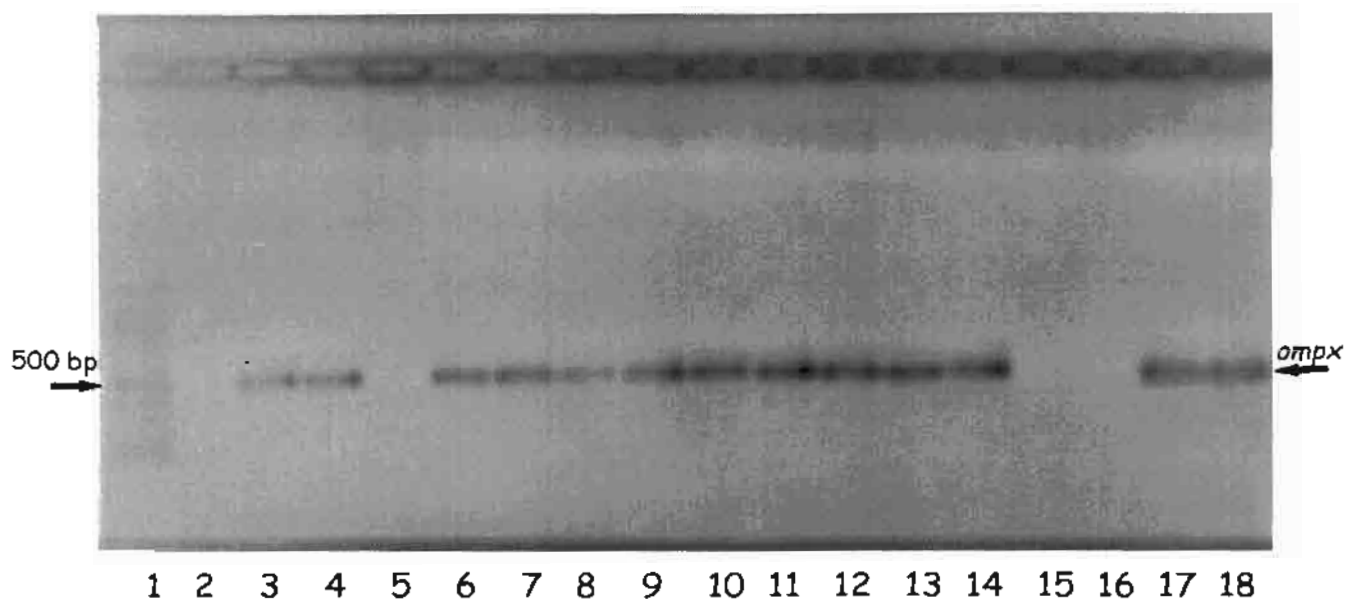


Figura 6. Búsqueda del gen *ompx* por PCR. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control de reactivos de la PCR. Carriles 3 a 18 productos de PCR amplificados. Carriles 5,15 y 16 cepas negativas para el gene de *ompx*.



Figura 7. Secuenciación del gene *OmpX* de la cepa de pozol de *E. coli* 95217 a partir del producto de PCR.

CONCLUSIONES

En un trabajo previo (Sainz et al., 2001) se aislaron de muestras de pozol 73 cepas de *E. coli*, algunas de ellas resistentes a valores bajos de pH. Se seleccionaron dos cepas (EPEC) 95215 y 95217 con serotipo O88:H25 con genes de virulencia *eae*. Una cepa de *E. coli* (EPEC) 95222 con serotipo O88:H25 con genes de virulencia *eae* y adherencia localizada, y una cepa de *E. coli* (EPEC) 95223 con serotipo O88:H25, que se aislaron de las muestras de pozol a valores bajos de pH entre 4.9 y 3.7. Dichas cepas estuvieron en contacto con ácidos orgánicos (acético y láctico) en el pozol, por lo que es importante la determinación de su resistencia a esos ácidos. Se compararon con la cepa de *E. coli* O157, que se reconoce como una cepa muy resistente a valores bajos de pH.

Las cepas de *E. coli* mostraron diferencias en cuanto a su resistencia a los diferentes ácidos. Cuando el reto ácido se llevó a cabo con HCl, sin haber adaptado previamente las cepas a pH bajo, las cepas de pozol fueron las que mejor soportaron dicho reto, obteniéndose cuentas viables hasta las 3 horas de reto. Las cepas de pozol adaptadas y retadas con el mismo ácido, fueron las que sobrevivieron por más tiempo, obteniéndose cuentas viables hasta las 6 horas de reto. Las cepas de pozol están mejor adaptadas a la acidez si se comparan con la cepa O157:H7, la cual sin adaptación previa no logró sobrevivir una hora, y adaptada, no más de tres horas al reto con HCl.

Las cepas aisladas del pozol presentaron resistencia a la acidez, ya que sobrevivieron a retos ácidos, sobre todo con ácidos orgánicos como los hallados en este alimento.

Cuando el reto ácido se llevó a cabo con ácido acético, las cepas de pozol fueron también las más resistentes. Estas cepas mostraron gran resistencia cuando se retaron con ácido láctico, inclusive en algunos casos mejor que la cepa O157:H7, cuya resistencia a la acidez está bien documentada (Benjamín y Datta, 1995; Yuk y Marshall, 2004). Se puede concluir

que las cepas de pozol retadas en este estudio, resisten de mejor o de igual manera que la cepa de *E. coli* O157:H7 a los retos ácidos.

Las proteínas de membrana externa (OMPs) de las bacterias Gram negativas son moléculas importantes, ya que se encuentran entre la célula y el medio ambiente (Samartzidou y col., 2003). Al observarse los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa de las cepas no adaptadas y adaptadas a condiciones ácidas, sometidas a retos ácidos, los cambios más significativos se presentaron en las cepas no adaptadas y retadas con los diferentes ácidos. El perfil de OMPs de cepas de pozol retadas con HCl es diferente del que se obtiene después de retarlas con ácidos orgánicos. Sin embargo, las cepas adaptadas a pH 5 y retadas no muestran cambios significativos en su perfil electroforético, comparadas con la cepa control adaptada pero no retada. Esto sugiere que una vez disparados los sistemas de protección, permanecen en las cepas.

Se demostró que existe un cambio importante en la composición de las porinas de la membrana externa. La OmpF no aparece en el perfil de proteínas de membrana externa de las cepas de pozol ni de la O157:H7 que resisten a la acidez y sólo se localizó en la cepa de *E. coli* K 12. Esto sugiere que en dichas cepas (las del pozol y la O157:H7), la composición de las proteínas de membrana externa se vio alterada. Estos resultados coinciden con lo reportado por Jordan y col., (1999), quienes observaron que cambios en la permeabilidad de los protones correlacionaban con alteraciones en la composición de las proteínas de la membrana externa de cepas de *E. coli* O157:H7.

Una banda identificada como un producto de degradación de OmpA, que es una de las porinas que se encuentra en mayor número de copias. Otra banda de aproximadamente 22 kDa, la cual correspondió a OmpW. Su expresión decreció en las cepas de pozol no adaptadas y retadas con ácido clorhídrico y ácido láctico y permaneció sin cambios en las

cepas no adaptadas y retadas con ácido acético, cuando se compara dicha banda con la cepa no adaptada y no retada con ácidos.

De todas las OMPs estudiadas, resultó de particular importancia la OmpX, ya que además de presentar homología con otras OMPs consideradas como factores de virulencia (Meccas y col., 1995), se sabe que no activa a las células presentadoras de antígeno del sistema inmune (Maisnier-Patin y col., 2003), y tiene estructura semejante a OmpA. Los resultados en este trabajo muestran que esta proteína no se encuentra en cepas que no se sometieron a estrés ácido, o a estrés ambiental o que no se reportan como patógenas. OmpX se sintetiza en condiciones de estrés, por lo que se puede considerar que dicha proteína puede estar implicada en la resistencia de las cepas a situaciones de estrés.

Aunque Dps es una proteína citosólica, se encuentra asociada a membrana y se reporta como muy importante para la protección del DNA. En este trabajo se determinó su presencia en las cepas retadas con los diferentes ácidos, sobre todo en el caso del reto con ácido láctico donde la sobrevivencia de las cepas fue notable.

REFERENCIAS

- Ames, G.F. y Nikaido, K. 1976. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*, 15, 616-623.
- Arnold K.W. y Kaspar C. 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2037-2039.
- Baik H. S., Bearson S., Dunbar S. y Foster J.W. 1996. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology*. 142, 3195-3200.
- Bearson S., Bearson B., y Foster J.W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 147, 173-180.
- Benjamin M.M. y Datta A.R. 1995. Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1669-1672.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, J.I., Ross T., McMeekin, T.A., Nichols P.D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 37, 163-173.
- Brock T.D. y Madigan M.T. 1993. *Microbiología*. Sexta Edición. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México.
- Cañas Urbina, A.O., Bárzana García, J.D. Owens y Wachter Rodarte M.C.. 1993. La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia*. 44, 219-229.
- Choi, S. H., Baumler D.J., and C. W. Kaspar. 2000. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escheichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3911-3916.
- Cravioto A., Gross R.J., Scotland S.M. y Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, 3, 95-99.
- Cravioto A., Tello A., Navarro A., Ruiz J., Villafán H. y Eslava C. 1991. Association of *Excherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoeae. *The Lancet*. 337, 262-64.
- Debroy, C. J. Yealy, R. A. Wilson, M. K. Bhan and R. Kumar. 1995. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63, 2873-2879.

- Doyle M.P., Zhao T., Meng J. y Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle M. P., Beuchat L. R. y Montville T. J. Editores. ASM Press. Washington, D.C. U.S.A.
- Eslava C., Villaseca J.M. y Cravioto A. 1994. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Cerezo S.G., Escobar G. A. y Valdespino G.J.L. Editores. Secretaría de Salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Baez". México. Capítulo III-6. pp.251-265.
- Foster J.W. y Hall H. K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, 172, 771-778.
- Gong, S., Richerd, H., Foster, J.W., 2003. YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 185, 4402-4409.
- Goodson M., y Rowbury R.J. 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at sub-lethal acid pH value. Letters in Applied Microbiology., 8, 77-79.
- Gordon J. y Small P.L.C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infection and Immunity, 61, 364—367.
- Guilfoyle D.E. y Hirshfield I.N. 1996. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology, 22, 393-396.
- Hersh B.M., Farooq F.T., Barstad B.N., Blankenshorn D.L. y Slonczewski J.L. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 178, 3978-3981.
- Heyde, M., Portalier, R. 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. Molecular and General Genetics, 208, 511-517.
- Hickey E.W., y Hirshfield I.N. 1990. Low pH induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology, 56, 1038-1045.
- Jordan, K.N., Oxford, L., O'Byrne, C.P. 1999b. Survival of low-pH stress by *E. coli* O157:H7 correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. Applied and Environmental Microbiology, 65, 3048-3055.
- Laemmli, U.K. 1971. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-683.

- Law D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 152-173.
- Levine M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases*, 155, 377-389.
- Leyer G. J., y Johnson E. A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1842-1847.
- Leyer G.J., Wang L., y Johnson E. A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3752-3755.
- Lin J., Lee I.S. Frey J., Slonczewski J.L. y Foster J.W. 1995. Comparative Analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 4097-4104.
- Lin, J., Smith M.P., Chapin K.C. Baik H.S., Bennett G. N. and J. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3094-3100.
- Lior H. 1994. Classification of *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Gyles C.L. Editor. CAB INTERNATIONAL. Ontario, Canada. pp 31-72.
- Maisnier-Patin K., Malissard M., Jeannin P., Haeuw J.F., Corbiere J.C., Hoeffel G., Gauchat J.F., Nguyen T., Saez J.M, Delneste, Y. 2003. The outer membrane X from *Escherichia coli* exhibits immune properties. *Vaccine* 21, 3765-3774
- Mecsas, J. Welch, R., Erickson J.W., and C. A. Gross. 1995. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 177, 799-804.
- Molloy M. P., Herbert B. R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A., Williams K.L. and A.A Gooley. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2871-2881.
- Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P. y Levine M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, 6, 829-831.

- Nataro J.P. y M.M. Levine. 1994. *Escherichia coli*. Diseases in Humans. En: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Gyles C.L. Editor. CAB INTERNATIONAL. Ontario, Canada. pp.285-334.
- Nataro J.P. y Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11, 142-201
- Nikaido, H. 1996. Outer membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Celular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., ed.). pp. 29-47. ASM Press. Washington, D C, USA.
- Pilsel, H., Smajs, D. and V. Braun. 1999. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of *Escherichia coli* outer membrane. Journal of Bacteriology, 181, 3578-3581.
- Pedroso M.Z., Freymüller E., Trabulsi L.R. y Gomes T.A.T. 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 *E. coli* serogroups. Infection and Immunity, 61, 1152-1156.
- Rowbury R.J., Goodson M. y Wallace D.A. 1992. The PhoE porin and transmission of the chemical stimulus for induction of acid resistance (acid habituation) in *Escherichia coli*. Journal of Applied Bacteriology, 72, 233-243.
- Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurion, D., Navarro, A., Molina, J., Cravioto, A., Eslava, C., 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. International Journal of Food Microbiology 71, 169-176.
- Sato, M. Machida K., Arikado E., Saito H., Kakegawa T., and H. Yashi. 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. Applied and Environmental Microbiology, 66, 943-947.
- Scaletsky I.C.A., Silva M.L.M. y Trabulsi L.R. 1984. Distinctive Patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infection and Immunity, 45, 534-536.
- Schulz G.E. 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 1565, 308-317.
- Sears C.L. y Kaper J.B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiological Reviews, 60, 167-215.
- Smartzidou, H. Mehrazin, M., Xu, Z., Benedik, M.J., Delcour A.H. 2003. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. Journal of Bacteriology, 185, 13-19.



- Stim-Herndon K., Flores T. M., y Bennett G.N. 1996. Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 142, 1311-1320.
- Stuart, B.P., Chong-Ming. 1999. Role of *rpos* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology*, 181, 3525-3535.
- Towbin, A., Staelin T., and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National. Academic of Sciences. USA*, 76, 4350-4354.
- Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. 1983. Mexican pozol. En *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. pp.226-237. Editor K.H. Steinkraus, Vol 9. *Microbiology Series*. Marcel Dekker, Inc. New York y Basilea.
- Varela G., Aguirre A. y Carrillo J. 1946. *Escherichia coli* "Gomez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 3, 623-627.
- Vial P.A., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J.B., Nataro J.P. Maneval D., Elsayed A. y Levine M.M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 158, 70-79.
- Vogt J. and G. E. Schulz. 1999. The structure of outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure*, 7: 1301-1309.
- Wachter R. M.C., y Santillana H.R. 1990. Cuadernos de Posgrado No. 32. Alimentos y Biotecnología. Carmen Durán de Basúa Ed. Facultad de Química. Div. de Estudios de Posgrado. UNAM. 101-110.
- Wachter M. C., Cañas A., Cook P.E., Bárzana E. y Owens J.D. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 226-274.
- Yu J. y Kaper J.B. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*. 6: 411-417.
- Yuk, H-G., and Marshall, D.L. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3500-3505.

ANEXO I

**Texto del manuscrito aceptado para su publicación en la revista internacional
“International Journal of Food Microbiology”, con fecha 18 de abril de 2005.**

Title:

**SURVIVAL TO DIFFERENT ACID CHALLENGES AND OUTER MEMBRANE
PROTEIN PROFILES OF PATHOGENIC *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED
FROM POZOL, A MEXICAN TYPICAL MAIZE FERMENTED FOOD.**

Authors:

Teresita Sainz,^{a,b} Julia Pérez,^b Jorge Villaseca,^c Ulises Hernández,^c Carlos Eslava,^c
Guillermo Mendoza,^d Carmen Wachter.^{e,*}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco-Iztapalapa, México D.F., México.

^b Departamento de Sistemas Biológicos, División de CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Coyoacán, 04960 México D. F., México.

^c Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-433, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F., México.

^d Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F., México.

^e Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F., México.

* Corresponding author. Tel./ Fax (52) 55 5622-5309.

E-mail address: wachter@servidor.unam.mx

Address: Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F., México.

Abstract

In this study, the acid resistance and the changes in outer membrane protein (Omps) profiles of *E. coli* strains isolated from Pozol, an acid-fermented maize beverage consumed in Southeastern Mexico, were determined. Results showed that adaptation to acid by these *E. coli* strains significantly enhances their survival in acid conditions, suggesting that each strain possesses different strategies to face the different challenges. Changes in Omp profiles were found in non-adapted acid challenged cells compared with non-challenged cells that had not been adapted to acid. Challenged adapted cells showed no significant changes in these profiles when compared with the acid adapted non-challenged strains. N-terminal sequences of some of the Omps were determined. The intensity of the main porins OmpC and OmpA was lower in the acid challenged strains, than in the non-challenged ones. The OmpF porin was only identified in non-challenged K12 strain, but did not appear in adapted or non-adapted pozol strains nor in *E. coli* O157:H7.

A protein band with an approximate molecular mass of 22 kDa corresponds to OmpW and its expression decreased in pozol strains challenged with HCl and lactic acid.

OmpX was one of the main proteins expressed when strains were acid challenged with organic acids. Seventy out of 73 *E. coli* strains isolated from pozol in a previous work (Sainz et al., 2001) carry this gene and belong to a reported pathogenic class of *E. coli* strains, or have virulence factors or survived at pH values less than 4.8. We suggest this protein could be involved in survival to stress conditions.

Keywords: *Escherichia coli*; Acid resistance; Outer membrane proteins; OmpX; virulence genes; acid-fermented foods; Pozol

1. Introduction

An important property of microbial pathogens associated with oral-fecal routes of transmission is the ability to survive in extremely acidic as well as moderately acidic environments (Giannella et al., 1972). Resistance to low pH is important to food-borne pathogens for survival in specific foods and in the gastrointestinal tract. Acid resistance (AR) is perceived to be an important property of *Escherichia coli*, enabling the organism to survive gastric acidity and volatile fatty acids produced as a result of fermentation in the intestine (Peterson et al., 1989).

Detailed studies of AR mechanisms in *E. coli* have exposed three systems that can protect cells against pH values of 2 to 2.5 (Lin et al., 1995; Lin et al., 1996; Hersh et al., 1996). The first is a glucose-repressed system, also designated as the oxidative system, induced in Luria-Bertani broth (LB) and is dependent on the alternative sigma factor σ^S , encoded by the *rpoS* gene. The other two clearly defined systems are induced following growth in LB containing 0.4% glucose (LBG). One system requires glutamic acid during acid challenge to survive pH 2 and is thought to utilize an inducible glutamate decarboxylase, and the other requires arginine and an inducible arginine decarboxylase encoded by *adiA* and its recently described antiporter *adiC* (Gong et al., 2003). All the three systems were identified and work best in stationary-phase cells. How the oxidative system protects cells against acid stress is unknown. However, the two decarboxylase systems are believed to consume protons that leak into the cell during acid stress by decarboxylation of glutamate or arginine, which are transported into the cell in exchange for their respective decarboxylated products. These systems overlap in ways that protect both growing and non-growing cells from acid across a broad range of environmental conditions.

Of critical importance is the permeability of the membrane to protons. Indeed *E. coli* acid-adapted cells show a significant reduction in proton permeability and this correlates well with the increase in low pH tolerance associated with these cells (Jordan et al. 1999b). Survival after exposure to pH 3 in acid habituated *E. coli* O157 cells (in broth at pH 5) has been correlated with the increase in cyclopropane fatty acids in the membrane (Brown et al., 1997).

The membrane protein complexes pose the greatest threat to the H⁺ permeability of the cell. It has been demonstrated that *E. coli* cells shifted to pH 3.6 in combination with mild hypoosmotic shock die very rapidly (Levina et al., 1999). Neither pH 3.6 alone, nor hypoosmotic shock are sufficient to cause rapid cell death. However, the hypoosmotic shock causes the opening of mechanosensitive channels in the cytoplasmic membrane (Booth et al., 2002).

Outer membrane proteins (Omps) of Gram-negative bacteria are important molecules that interface the cell with the environment. Studies on the outer membrane have revealed the presence of both integral and lipid-linked membrane proteins. These include the porins (e.g. OmpC, OmpF) a family of Omps that form a hydrophilic channel, allowing nonspecific diffusion of small molecules across the outer membrane barrier (Molloy et al., 2000). Expression of outer membrane proteins is affected by medium pH; growth at low pH increases OmpC expression and decreases the level of OmpF (Heyde and Portalier, 1987). The mechanism for pH-dependent porin expression is still enigmatic.

Two possible mechanisms for acid pH regulation can be postulated: (i) the activity of a two-component regulatory system (OmpR/EnvZ) is modified by pH, and (ii) *E. coli* uses different systems at different pH values for porin expression, as proposed previously for Na⁺ extrusion systems (Sakuma et al., 1998).

Pozol is a traditional acid beverage prepared from a fermented maize dough (Wacher et al., 1993). This product is highly consumed by ethnic groups in South-eastern Mexico. Although a lactic fermentation is established and pH values lower than 4.5 are attained, pathogenic serotypes of *Escherichia coli* survive through this fermentation process (Sainz et al., 2001). The acid adaptation response and its impact on resistance to environmental stresses have been examined for *E. coli* strains of O157:H7 serotype (Arnold and Kaspar, 1995; Leyer et al., 1995). It is possible that because of the expression of these adaptative systems, *E. coli* strains isolated from pozol survive in the presence of lactic and acetic acids. In a previous work (Sainz et al., 2001), strains with serotype O88:H25 were isolated from acidified pozol. It is important to control growth of these pathogens in order to ensure the safety of this popular beverage.

The aim of this work was to analyze the resistance of these strains to different inorganic and organic acids and to compare this response with that of *E. coli* O15:H7, considered to be an acid resistant prototype. Variations in outer membrane protein profiles of the acid resistant strains were investigated. OmpX was considered especially relevant, due to its homology with Omps like Ail from *Yersinia enterocolitica* and PagC of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Mecenas et al., 1995), both considered as virulence factors.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

Two *E. coli* strains with O88:H25 serotype (95217 and 95222) were isolated from pozol samples, 6 and 48 h after the fermentation process had started, when pH values were 4.9 and 3.7 respectively. Both strains carry *eae* virulence genes and the 95222 strain also exhibits a typical localized adherence pattern for enteropathogenic *E. coli* pathotype (Sainz et al., 2001). Both *E. coli* O157:H7 and K12 strains were used as controls. Strains were

grown overnight with shaking at 240 rpm in an ORBIT Labline-incubator-shaker (Labline Instruments, Inc., Melrose Park, IL, USA) and 37°C in Luria-Bertani (LB) broth buffered with either MOPS (morpholinepropanesulfonic acid, Cat. No. M-1254 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA., pH 7.0) for unadapted cells or 100 mM MES (morpholinethanesulfonic acid, Cat. No. M-5287 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA., pH 5.0) for adapted cells. Survival of these four strains was assessed as follows: overnight cultures were diluted to 10^7 or 10^8 cfu/ml with warmed LB broth acidified to pH 2.5 with sterile HCl, or to pH 4.0 with either sterile acetic or lactic acids solutions. Viable-cell counts were determined at 0, 0.5, 1, 2, 3 and 6 h post-acid challenge. Serial dilutions were performed in 0.1% peptone and 100 μ l of each dilution were spread onto LB agar plates pH 7, which were incubated at 37°C for 24 h. All experiments were done in triplicate.

2.2 Isolation and analysis of outer membrane proteins

Outer membrane proteins were prepared as described previously (Debroy et al., 1995) with the following modifications. After the 6 h acid challenge cells were recovered by centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min at 4°C and suspended in 3 ml of HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, Cat. No. H-3375 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA., 10 mM. pH 7.4) solution. They were disrupted by sonication (Ultrasonic Processor GE 130PB, Hielscher Systems GmbH, Teltow, Germany) 60 s, 30% output. Cell debris was removed by centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was added to 1 ml of 2% *N*-lauroylsarcosine (Sarkosyl) (Cat. No. L-9150 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.) and incubated for 1 h at room temperature. The Omps were isolated after centrifugation of the mixture at $100\,000 \times g$ for 1 h. The

pelleted protein was resuspended in 10 mM HEPES and stored at -20°C. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) was carried out with 6% stacking and an 12.5% separating gel after Omp preparations (15 µg) were solubilized at 100°C for 5 min in sample solution (0.05 M Tris-HCl pH8, 1.6% SDS, 25%glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue, all reagents supplied by Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.). The proteins were visualized after the gels were stained with Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad 161-0400, Bio-Rad Laboratories, CA., USA.) and destained with 30% methanol-10% acetic acid.

2.3 N- terminal sequence of selected proteins

The N- terminal sequence was determined by automated Edman degradation on gas-phase sequencer (LF3000, Beckman Instruments Inc, Fullerton, California, USA) equipped with an online Beckman System Gold high-performance liquid chromatography (HPLC) system. The HPLC equipment included a model 126 pump and 168-diode array detector set at 268 and 293 nm for signal and reference, respectively. The HPLC column used was Beckman Spherogel Micro PTH (2 by 150). Standard Beckman sequencing reagents were used for the analysis.

Protein samples for sequencing were prepared by SDS-PAGE and electroblotting on polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Cat. No. IPVH 00010, Millipore Co., Bedford, MA., USA) as described by Towbin et al., (1979), as well as by direct application of desalted purified protein on Beckman protein supports.

2.4 Extraction of chromosomal DNA

Chromosomal DNA from the 73 *E. coli* strains previously isolated from pozol samples (Sainz et al., 2001) was extracted with the Wizard Genomic DNA Purification Kit

(Promega, Cat. A1120, Promega Corporation, Madison WI, USA), following the instructions of the supplier.

2.5 OmpX primers design

Two primers were designed using the complete sequence of *E. coli* K12 OmpX gene (accession no. L 37088) and a DNASTAR computer program (Madison, WI, USA). The nucleotide sequences were S1 5'AATTGCATGTCTTTCAGC3' (forward) and for S2 5'GTAACCAACACCGGCAATCCA 3' (reverse) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

2.6 PCR conditions using purified chromosomal DNA

PCR was carried out using a PCR Kit (Taq PCR Core Kit, Cat. No. 2012223, QIAGEN Inc., Valencia CA, USA). The PCR mixture was composed of 1 × PCR buffer, 1 × Q solution, 0.5 μM of each primer, 200 μM each of the four deoxynucleoside triphosphates and 2.5 U of Taq polymerase. The total volume of each reaction mixture was 25 μl, employing 1 μl of DNA extract as a template.

The thermal cycle program consisted of an initial cycle of 94°C for 4 min for denaturation and polymerase activation, 30 cycles of : 94.0°C, 30 s; 42.0°C, 60 s; 72.0°C, 60 s. and a final extension step of 5 min at 72.0°C, using a T Personal Thermocycler (Whatman Biometra, Biometra GmbH, Göttingen, Germany).

Amplified products were subjected to gel electrophoresis in 1% agarose gel. Amplified DNA products of specific size (500 bp aprox) were visualized by UV fluorescence after being stained with ethidium bromide.

PCR products were purified using a QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 28104, QIAGEN Inc., Valencia CA, USA), and sequenced in an automatic sequencer (ABI

Prism 3100 Genetic Analyzer, Foster City, CA., USA) for confirmation of the OmpX gene, at Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico.

3. Results

3.1 Acid resistance of adapted and nonadapted pozol, O157:H7 and K12 E. coli strains.

When the challenge was assayed with HCl (Figure 1A), both pozol strains survived for 3 h and the 95222 unadapted pozol strain survived for six hours with a viable count of 10^6 cfu/ml, which remained practically unchanged during exposure to pH value of 2.5. The O157:H7 strain was not detected after an hour of exposure to that pH value and K12 strain was not detected half an hour after exposure to the same medium.

As expected, the previously adapted cells survived for a longer period of time compared with non-adapted cells after the acid challenge. When adapted strains were challenged, the two pozol strains survived for 6 h. Counts of pozol strain 95217 remained practically unchanged and those of 95222 pozol strain decreased 1.5 log units after 2 hours exposure. Adapted O157:H7 *E. coli* strain survived for 3 h; the viable count diminished to 10^5 cfu/ml during the first hour but remained unchanged until 3 hours. This suggests that there is a subpopulation that became acid resistant for that period of time, but no viable count was detected after 6 hours of acid exposure. Counts of K12 strain were reduced more rapidly than the other three strains and was not detected one hour after the challenge (Figure 1B). Counts remained unchanged between 30 min and 1 hour, suggesting the presence of a subpopulation of acid resistant strains.

On the other hand, when non-adapted cells were challenged with acetic acid, survival dramatically decreased. Figure 2A shows that pozol strain 95222 (O88:H25) survived for 3 h; 95217 pozol strain could only survive for 2 hours; counts of O157:H7 and K12 strains dropped very quickly, so that the first did not survive after one hour and the latter after 30

min. However, when adapted cells were challenged with acetic acid, K12 and 95222 strains survived for 6 h (Figure 2B). 95217 *E. coli* pozol strain survived for 3 h and O157:H7 strain survived for 2 h. These results suggest that each strain possesses different ways to face the different challenges, being the K12 strain the better adapted.

When the strains were challenged with lactic acid O157:H7 non-adapted cells faced satisfactorily this acid challenge so that the initial count of 10^8 cfu/ml had been reduced to 10^7 cfu/ml after 6 h challenge (Figure 3A). 95217 pozol non-adapted cells survived for six hours, but the count was smaller compared with the former strain. 95222 pozol strain survived for 3 hours but was not able to survive for 6 h. K12 strain could hardly survive for one hour to this challenge (Figure 3A).

Interestingly, when the adapted cells were challenged with lactic acid (pH 4) the counts decreased from 10^8 to 10^6 cfu/ml after 6 h, but all strains survived satisfactorily (Figure 3 B).

These results suggest that when strains are challenged with acetic acid, cell survival was lower than when the challenge is performed with lactic acid. It could possibly be because the proportion of protonated acetic acid is higher than that of lactic acid at the same pH value, as the pKa of acetic acid (4.76) is higher than that of lactic acid (3.73). So the amount of protonated acid that enters the cytoplasm and drops the internal pH of the bacterial cell is higher in the case of acetic acid.

3.2 Outer membrane protein (Omp) profiles

The Omp patterns of unadapted and adapted *E. coli* strains isolated from pozol samples challenged with HCl, acetic and lactic acids were analyzed (Figure 4).

The N-terminal sequences of some of the Omps were determined (Table 1). In the *E. coli* strains isolated from pozol (95217 and 95222) and in the *E. coli* O157:H7 patterns a 220 kDa fraction was identified (Figure 4), which was not present in the K12 strain.

The protein profile of the 95217 pozol non-adapted strain challenged with HCl compared with the same non-challenged strain, showed a unique band with an approximate molecular mass of 47 kDa, and two bands with different molecular weights (approx. 46 and 45 kDa) were synthesized.

The intensity of the main porins OmpC and OmpA tend to decrease in the acid challenged strains and OmpF porin (37 kDa approx.) did not appear in adapted or non-adapted pozol strains, neither in *E. coli* O157:H7, but was only identified in non-challenged K12 strain.

A band with a molecular mass of 27 kDa approximately that disappeared in pozol strain 95217 challenged with HCl and lactic acid was sequenced, and it showed to be a degraded product of the same OmpA.

A protein band with an approximate molecular mass of 22 kDa was sequenced and it corresponds to OmpW. Its expression decreased in pozol strains challenged with HCl and lactic acid, and remained without changes in the non-adapted strains challenged with acetic acid when compared with the same non-challenged strain.

Dps is a cytosolic protein, but it regularly appears when outer membrane proteins are prepared, and it is suspected to be membrane associated (Molloy et al., 2000). In this study the sequence of this inducible stress protein was obtained.

OmpX (approx. 16 kDa) was one of the expressed proteins in challenged strains with organic acids, but in non-adapted strain 95217 challenged with HCl its expression was very reduced.

As expected, there were few variations in the protein profiles after the adapted strains were challenged (data not shown).

3.3 PCR assay for *ompX* gene

A PCR was performed to find out if all the strains isolated from pozol samples carried the *ompX* gene, results showed (Figure 5) that 70 out of 73 strains carry it. All those that carry the *ompX* gene, belong to a reported pathogenic class of *E. coli* strains, or have virulence factors [like the presence of *eae* genes, or Agg I fimbria, or heat labile toxin LT-1, and localized, aggregative or diffuse adherence patterns or survived at pH values less than 4.8 (Sainz et al., 2001)]. The remaining strains do not belong to any pathogenic reported serotype and do not have any recognized virulence factor or survived at low pH values.

The designed PCR primers amplified practically the entire gene, so it was possible to sequence this protein to confirm their presence in chromosomal DNA to ensure our findings.

Thirty four *E. coli* enteroaggregative (EAEC) strains from Faculty of Medicine collection, isolated from children with persistent diarrhoea, from healthy children, from the environment and from food were tested, and no amplification products were obtained from strains isolated from healthy children where virulence factors had not been detected (data not shown).

4. Discussion

Pozol is an ancient fermented food of Mayan origin, and it is consumed by Indian and mestizo populations throughout Southeastern Mexico. The fermentation process is produced by a complex microbiota that includes bacteria, yeasts and molds.

A lactic fermentation is established and pH values decrease from approx. 7 to 4.5 or less. However, pathogenic *E. coli* serotypes (including EPEC serotypes) were isolated from pozol when pH values were as low as 3.7 (Sainz et al., 2001).

The ability of food-borne pathogens to adapt to acid stress conditions has received attention in food microbiology, but mainly in *E. coli* O157:H7. Our results show that adaptation to acid by EPEC strains significantly enhance their survival in acid conditions, as those attained in acid foods like pozol, in which the pH values decrease gradually as a result of the fermentation process. These results agree with those reported previously for *E. coli* O157:H7 by Yuk and Marshall (2004), in which adaptation to acid might occur during fermentation, when the pH value of the food gradually decreases. Fermented foods contaminated with pathogens may contribute to expose them to moderate acid conditions that could render pathogens more resistant to the gastric fluid. Therefore, exposure to non-lethal acid pH can enhance pathogen's resistance to more acidic conditions (Lin et al., 1996). EPEC strains isolated from pozol have the ability to survive acid stress maintaining their virulence factors (Sainz et al., 2001). Lin et al., 1996, also reported that once acidic resistant systems are induced, they persist active for long periods of time when the strains are stored at 4°C as it was the case of the pozol strains.

An important finding was that OmpF, one of the main porins in *E. coli*, is only expressed in K12 strain when it is grown at pH 7; however, no expression of OmpF could be detected in pozol strains (irrespective of the pH value they were grown on) or in O157:H7 strains. Sato et al. (2000), referred that the expression of OmpC and OmpF outer membrane porins was regulated by osmolarity and low pH values. Our findings agree with this report, as the intensity of OmpC decreased after the acid challenge (Figure 4).

In this study Dps protein was sequenced and identified. Dps is a cytosolic protein, but it can be membrane associated, and it is common to find it with outer membrane protein preparations (Molloy et al., 2000). It has been reported that Dps contributes to protect bacterial DNA from depurination damage caused by acid and oxidative stresses (Choi et al., 2000). This can be the reason to have found it in outer membrane preparations. OmpA has been reported to be one of the most abundant porins, with 10^5 copies per bacterial cell (Nikaido, 1996) and also presents multiple isoforms. This is probably the reason why abundant degradation products were found in this protein profiles (Figure 4).

No significant changes in protein profiles were observed for strains that had been grown at pH 5 before the acid challenge (results not shown). It is possible that acid resistant systems had been induced during growth at pH 5, so that their protein profiles were similar than those of non-challenged strains.

The expression of OmpW increased when strains were challenged with acid conditions. PilsI et al. (1999) described this protein for the first time as a S4 colicin receptor, but its function is unknown. It has been reported to have great homology with OmpW of *Vibrio cholerae* and this protein is well known to be highly immunogenic. OmpX shows homology with Ail protein from *Yersinia enterocolitica* and with Rck and Pag C from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, all considered to be virulence factors because they allow bacterial adherence to mammal cells, and confer protection that contributes to survival inside macrophages (Meccas et al., 1995; Vogt and Schulz, 1999).

Considering these observations, it was decided to investigate if OmpX was present in all the strains isolated from pozol samples, and because it was one of the main proteins expressed when strains were acid challenged with organic acids. Results showed that 70 out 73 strains carry this gene (Figure 5). All those that carry the *ompX* gene, belong to a

reported pathogenic class of *E. coli* strains, or have virulence factors, or survived at pH values less than 4.8. The rest do not belong to any pathogenic reported serotype and do not have any recognized virulence factor nor survived at low pH values. These results suggest this protein could be involved in stress. Maisnier-Patin et al. (2003), reported that OmpX is recognized by the innate immune response but does not activate antigen presenting cells. As it is related with the structure of OmpA protein, it is possible to speculate that this OmpX protein could act as an OmpA porin, but because it does not alert the immune response, bacteria are able to colonize the host cells. So, it could be considered as a virulence factor.

Gene arrays would have the potential to identify connections between regulatory or metabolic pathways that are not yet known. Studies related to gene expression during acetate-induced acid tolerance response have been reported using *E. coli* K12 (Arnold et al., 2001). It will be possible to obtain more information about induction of acid tolerance mechanisms of enteropathogenic *E. coli* and *E. coli* serotype O157:H7 with this technology.

Acknowledgements

This work was supported in part by Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X) and “Doctorado en Ciencias Biológicas” (PhD on Biological Sciences), UAM, included in the “Padrón de Posgrados de Excelencia CONACyT, Convenio PFP-20-93” .

References

Arnold, C.N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R. , Siegele, D.A. 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *Journal of Bacteriology* 183, 2178-2186.

- Arnold, K.W., Kaspar C.W. 1995. Starvation and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2037-2039.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Booth, I. R., Cash, P., O'Byrne, C. 2002. Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 33-42
- Brown, J.I., Ross T., McMeekin, T.A., Nichols P.D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 37, 163-173.
- Choi, S. H., Baumlér D.J., and Kaspar, C. W. 2000. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3911-3916.
- Debroy, C., Yearly, J., Wilson, F. A., Bhan, M.K., Kumar, R., 1995. Antibodies raised against outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 63, 2873-2879.
- Giannella, R. A., Broitman, S.A., Zamcheck, N., 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut* 13, 251-256.
- Gong, S., Richerd, H., Foster, J.W., 2003. YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185, 4402-4409.

- Hersh, B., Farooq, F. T., Barstad, D.N., Blankebshorn, D. L., Slonezewski, J.L., 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178, 3978-3981.
- Heyde, M., Portalier, R., 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12. *Journal of Molecular Biology* 146, 23-43.
- Jordan, K.N., Oxford, L., O'Byrne, C.P. 1999b. Survival of low-pH stress by *E. coli* O157:H7 correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3048-3055.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., Booth, I.R. 1999. Protection of *E. coli* cells against extreme turgor by MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of the structural gene for MscS activity. *EMBO Journal* 18, 1730-1737.
- Leyer, G.J., Wang, L., Johnson, E. A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3752-3755.
- Lin, J., Lee, I.S., Frey, J., Slonezewski, J. L., Foster, J.W., 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177, 4097-4104.
- Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, S., Bennet, G. N., Foster, J.W., 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3094-3100.

- Mecenas, J. Welch, R., Erickson J.W., Gross, C.A., 1995. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology* 177, 799-804.
- Maisnier-Patin K., Malissard M., Jeannin P., Haeuw J.F., Corbiere J.C., Hoeffel G., Gauchat J.F., Nguyen T., Saez J.M., Delneste, Y. 2003. The outer membrane X from *Escherichia coli* exhibits immune properties. *Vaccine* 21, 3765-3774
- Molloy M. P., Herbert B. R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A., Williams K.L Gooley, A.A. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal of Biochemistry* 267, 2871-2881.
- Nikaido, H. 1996. Outer membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Celular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., ed.). pp. 29-47. ASM Press. Washington, D C, USA.
- Peterson, W.L., Mackpwiak, P. A., Barnett, C. C., Marling-Cason, M., Haley, M.L., 1989. *Journal of Infectious Diseases* 159, 979-983.
- Pilsl, H., Smajs, D, Braun, V. 1999. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of *Escherichia coli* outer membrane. *Journal of Bacteriology* 181, 3578-3581.
- Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurion, D., Navarro, A., Molina, J., Cravioto, A., Eslava, C., 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 71, 169-176.

- Sakuma, T., Yamada, N., Saito, H., Kakegawa, T., Kobayashi, H., 1998. pH dependence of the function of sodium ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1363, 231-237
- Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa, T., Kobayashi, H., 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 943-947.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 76, 4350-4354.
- Vogt J. and G. E. Schulz. 1999. The structure of outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure*. 7: 1301-1309.
- Wacher, C., Cañas A., Cook, P. E., Barzana, E., Owens, J.D., 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 226-274.
- Yuk, H-G., and Marshall, D.L. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3500-3505.

Figure1. Survival of non-adapted (A) and adapted (B) *E. coli* pozol strains (95217, 95222) and control strains (K12 and O157:H7) after challenge in LB broth acidified to pH 2.5 with HCl. Values given are means and standard deviations.

Figure 2. Survival of non-adapted (A) and adapted (B) *E. coli* pozol strains (95217, 95222) and control strains (K12 and O157:H7) after challenge in LB broth acidified to pH 4.0 with acetic acid. Values given are means and standard deviations.

Figure 3. Survival of non-adapted (A) and adapted (B) *E. coli* pozol strains (95217, 95222) and control strains (K12 and O157:H7) strains after challenge in LB broth acidified to pH 4.0 with lactic acid. Values given are means and standard deviations.

Figure 4. Outer membrane protein electrophoretic profiles of non-adapted EPEC pozol strains 95217 and 95222 and strains K12 and O157:H7. C, control non- challenged non-adapted strain. HCl, challenged with HCl. Ace, challenged with acetic acid. Lac, challenged with lactic acid. Lanes 1 and 12 correspond to BSA marker, lanes 2, 11 and 13 are molecular weight markers.

Figure. 5. Screening of *ompX* gene by PCR. Lane 1. Molecular weight marker. Lane 2; PCR reagent mixture control. Lanes 3 to 18 amplified PCR products. Lanes 5, 15 and 16; negative strains for *ompX* gene

Table I

Sequenced proteins from acid challenged strains

Approximate Molecular Weight in the electrophoretic gels	N- terminal sequence (NCBI data base) BLAST
220	Not sequenced
38	OmpC (AEVYNKDGNK)
35	Omp A (APKDNTWYTGA)
27	OmpA degradation fragments (APKDNTXY)
22	Omp W (HEAGEFFMRAG)
16	Omp X (ATSTVTGGYAQSDAQ)
15	Degradation products of the inducible Dps protein (SKATNLLYTRNDVSD)

