

Uso de microscopía confocal de rayos láser para estudiar la interacción entre *Escherichia coli* y *Acanthamoeba polyphaga*: potencial de transmisión de patógenos fagocitados por protistas presentes en bebederos de agua para ganado.

por

Milissa L. Santiago Correa

Tesis de investigación sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2006

Aprobado por:

Lynette Orellana, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Muñoz, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Chaparro, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Coordinadora del Programa Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

Published research suggests that amoebas can play a role of importance in the survival and dispersion of bacteria in the environment. The protection of bacteria within protozoa can render ineffective the mechanisms used to control pathogens transmitted through foods. Microscopic observations of water samples collected from cattle water troughs, as well as from samples taken from the ruminal fluid of dairy cows, demonstrate that these are reservoirs of free-living amoebas, ciliates and other protozoa in the farm. The co-incubation between trophozoites of the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and the bacteria *Escherichia coli* (previously dyed with the fluorescent dye Live/Dead L-7012) revealed that *Acanthamoeba polyphaga* has the capacity to lodge *Escherichia coli* in its interior without causing damage to the cellular membrane of the bacteria. In addition, the greater the time of co-incubation between these organisms, the greater the amount of bacteria observed inside the amoeba. This study demonstrates that cattle water troughs and ruminal liquid can serve as reservoirs of free-living amoebas and ciliates, and could be a potential source of transmission of *Escherichia coli* in the farm, increasing the difficulty to control the dispersion of pathogenic bacteria into foods. This study represents the first written report on the interaction between *Escherichia coli* and the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*, using Confocal Laser Scanning Microscopy.

RESUMEN

Investigaciones previas sugieren que las amebas pueden jugar un rol de importancia en la supervivencia y dispersión de las bacterias en el medioambiente. Esta protección de la bacteria dentro del protozooario, podría interferir con los mecanismos utilizados para controlar patógenos transmitidos por alimentos. La observación microscópica de muestras de agua colectadas de bebederos en fincas de ganado de carne, así como de muestras tomadas del líquido ruminal de vacas lecheras, demuestra que éstos son una reserva de amebas desnudas, ciliados y otros protozoarios. Al co-incubar trofozoitos de la ameba de vida libre *Acanthamoeba polyphaga* junto a la bacteria *Escherichia coli* previamente teñida con el tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012, se observó que la ameba posee la capacidad de albergar en su interior a *Escherichia coli* sin causarle daño a la membrana celular de la bacteria. A mayor tiempo de co-incubación, mayor es la cantidad de bacterias observadas en el interior de la ameba. Este estudio demuestra que al ser los bebederos de agua y el líquido ruminal, reservas de amebas de vida libre y ciliados, éstos pudieran ser una fuente potencial de transmisión de *Escherichia coli* en la finca, incrementando la dificultad de controlar la dispersión de bacterias patógenas a los alimentos. Este estudio representa el primer informe escrito donde se demuestra por medio de microscopía confocal de rayos láser, la interacción entre *Escherichia coli* y la ameba desnuda *Acanthamoeba polyphaga*.

DEDICATORIA

A:

Dios, mi fortaleza y mi sostén,
mi esposo Ricky, por su incondicional apoyo y
a nuestra hermosa hija Verónica Idheliz, tu fuiste mi inspiración.
Papi, Mami, son grandiosos, gracias a ustedes estoy aquí,
y mis hermanos Janice, Eggie y Javier, los amo.
A todos Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Durante estos largos años muchas fueron las personas y las experiencias que enriquecieron mi vida. Estar bajo la tutela de la experiencia, la excelencia y la verticalidad de la Dra. Chaparro, enriquece a cualquiera. A ella agradezco haber confiado en mí para ser parte de su equipo de trabajo. Con su ejemplo he aprendido que no se puede ser menos de excelente. Gracias a que me dio luz en los momentos precisos y me dejó caminar el resto del camino, desarrollé al máximo la destreza de la autoconfianza, el valor y la tenacidad. Después de haber completado la maestría sé que yo puedo, que soy un ser humano más completo, no tan sólo intelectualmente sino también emocionalmente. Sin su respaldo económico, sus ideas y agilidad sé que hubiese sido muy difícil.

Gracias a la Dra. Orellana y al Dr. Muñoz por su continua disponibilidad y ayuda. Son excelentes profesores y seres humanos. A la Dra. Acosta por sus sugerencias en la identificación de los organismos observados en las muestras. A José (Tito), el técnico de microscopía electrónica, por mostrar interés y confianza en el proyecto, por todas sus ideas y ayuda estaré en deuda con él toda la vida. A Magaly Zapata, la técnica del laboratorio de microbiología, por siempre estar dispuesta a ayudarme y a Emilee, la estudiante subgraduada, que hasta el final me acompañó en las interminables horas de muestreo y cultivo. Tu compañía me hizo fuerte. A todos Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
DEDICATORIA	<i>iv</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>v</i>
TABLA DE CONTENIDO	<i>vi</i>
LISTA DE TABLAS	<i>vii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>viii-ix</i>
INTRODUCCIÓN	1-5
REVISIÓN DE LITERATURA	6-13
PROCEDIMIENTO	14-24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25-43
CONCLUSIÓN	44
RECOMENDACIONES FUTURAS	45
APÉNDICE DE FOTOS	46-47
LITERATURA CITADA	48-52

LISTA DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Resultados de las pruebas Api 20E realizadas a muestras de agua tomadas de bebederos para ganado de carne.	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> (ATCC 25922) en medio peptona levadura glucosa (PYG)	28
Figura 2. Cultivo de <i>E. coli</i> tal como se observó bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm, bajo el cual no emitió fluorescencia	30
Figura 3. <i>E. coli</i> teñida con LIVE/DEAD L-7012 observada bajo el microscopio confocal de rayos láser a 490nm. Las bacterias que emiten fluorescencia verde tienen la membrana celular intacta (vivas), las que emiten fluorescencia roja tienen daño en la membrana celular (muertas)	30
Figura 4. Quiste de <i>A. polyphaga</i> observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Se observa la pared celular (P), la membrana externa o exoquiste (Ex) y la membrana interna o endoquiste (Ed), el citoplasma granular (C) y el núcleo (N).	31
Figura 5. Trofozoito de <i>A. polyphaga</i> observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Se observa la vacuola (V), las acantopodias (A), el citoplasma (C) y el núcleo (N).	32
Figura 6. Quiste de <i>A. polyphaga</i> observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Éste se observa con la membrana intacta, la cual no emite autofluorescencia.	33
Figura 7. Quiste de <i>A. polyphaga</i> observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Éste se observa con daño en la membrana por desecación luego de la exposición directa y prolongada a la luz del microscopio, lo cual hace que éste emita autofluorescencia.	33
Figura 8. Quistes (Q) y trofozoitos (T) de <i>A. polyphaga</i> emitiendo autofluorescencia verde y roja. Observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm.	34

Figura 9. <i>E. coli</i> viable (fluoresciendo verde) en el interior de trofozoitos de <i>A. polyphaga</i> luego de 3 horas de co-incubación. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a largo de onda de 490nm.	35
Figura 10. <i>E. coli</i> viable en el interior de dos pseudos-vacuolas de un trofozoito de <i>A. polyphaga</i> luego de 1 hora de co-incubación. Observada bajo microscopio de fluorescencia a largo de onda de 490nm. Fuera del trofozoito se observan bacterias en movimiento mostrándose como líneas fluorescentes.	36
Figura 11. Ameba de vida libre observada en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.	39
Figura 12. Invertebrado común, posiblemente Rotifera, observado en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.	39
Figura 13. Invertebrado común, posiblemente Rotifera, observado en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.	39
Figura 14. Ciliado <i>Dasytricha ruminatum</i> Schuberg, 1888. Observado en muestra de líquido ruminal. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.	41
Figura 15. Ciliado del género <i>Ostracodinium</i> observado en muestra de líquido ruminal. La hierba, el interior de los protistas y el mismo líquido ruminal emiten fluorescencia. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a 490nm.	43
Figura 16. Ciliado del género <i>Ostracodinium</i> observado en muestra de líquido ruminal, co-incubado con <i>E. coli</i> previamente teñida con LIVE/DEAD L-7012. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a 490nm.	43

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por microorganismos en alimentos continúan siendo un problema que afecta la salud pública a través del mundo. En los Estados Unidos solamente, se estima que sobre 76 millones de personas al año contraen una enfermedad transmitida por alimentos y que sobre 9,000 mueren cada año (Mead et. al., 1999). Este problema se traduce a millones de dólares en costos médicos y de productividad, apuntando a la necesidad de incrementar el esfuerzo para reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2003b).

La bacteria *Escherichia coli* O157:H7 es un importante patógeno humano a través del mundo. Su ruta principal de infección es por medio del consumo de alimentos de origen bovino y de agua contaminada con materia fecal de bovino. La dosis de infección con O157:H7 está estimada entre 10-100 células. El pico de incidencia de humanos infectados con este patógeno ocurre durante los meses de verano, la misma época en la cual éste es más predominante en la materia fecal de bovino (LeJeune et. al., 2004). Debido a esto, un gran número de estudios se han llevado a cabo enfocados en la ecología de *E. coli* O157:H7 en las fincas. Varias fuentes ambientales han sido identificadas como albergue potencial de este organismo, incluyendo los bebederos de agua para el ganado. Vacas infectadas pueden contaminar el bebedero de agua con heces fecales, rumiado o con saliva que contenga esta bacteria, propiciando así la dispersión del microorganismo entre animales que toman agua del mismo bebedero (LeJeune et. al., 2001a).

La clorinación ha sido por años el método utilizado para eliminar o controlar la presencia de *E. coli* en el agua; sin embargo, los protistas han demostrado sobrevivir y crecer aún después de exponerse a niveles de cloro que eliminen las bacterias

(King et. al., 1988). Diversos estudios han demostrado que los protistas de vida libre pueden servir como hospederos para algunas especies de bacterias patógenas que son transmitidas por alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* enteropatógena y otros enteropatógenos (Greub y Raoult, 2002). Esto sugiere que las amebas pueden jugar un rol de importancia en la supervivencia y dispersión de las bacterias en el medioambiente (Horn y Wagner, 2004). La protección de la bacteria dentro del protista, puede hacer inútiles los mecanismos utilizados para controlar patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos.

Existen cientos de especies de protistas distribuidos en una diversidad de hábitats naturales como lo son aguas frescas y saladas, suelos húmedos y arenas secas. El rol de los protistas de vida libre en ambientes terrestres y acuáticos como depredadores de bacterias es ampliamente conocido. La depredación por los protistas tiene un efecto significativo en el control de poblaciones bacterianas en el suelo, contribuyendo al mantenimiento de la fertilidad. De igual manera los protistas juegan una parte integral del ciclo de nutrientes en cadenas acuáticas de alimentos (Barker y Brown, 1994). Aun así, no todas las especies bacterianas son igualmente susceptibles a la depredación por parte de los protistas. Específicamente, algunas bacterias Gram negativas han mostrado la capacidad de resistir la ingestión de algunas amebas (Weekers et. al., 1993).

Los bebederos de agua son grandes recipientes de aguas templadas e inmóviles, ambiente que promueve la presencia tanto de protistas de vida libre como de *E. coli* (Muñoz et. al., 2003). De entre los protistas, *Acanthamoeba* spp. es uno de los más prevalentes encontrado en el medio ambiente (Marciano y Cabral, 2003) y se ha reportado que por lo menos una de sus especies, *A. polyphaga*, está bien adaptada para

sobrevivir en ambientes hostiles, tales como elevadas temperaturas, clorinación y varios desinfectantes. La habilidad de este protista de vida libre para enquistarse puede proveer refugio en su interior para bacterias que no toleran esas condiciones (Axelsson et. al., 2005).

Otro ambiente en la finca que ha sido identificado como reserva de *E. coli* y de protistas es el rumen de las vacas (Rasmussen et. al., 1993). La diversidad de bacterias en este hábitat tiene las siguientes características en común: la mayoría son Gram negativas, anaerobias obligadas, con un pH óptimo de crecimiento entre 6.0 y 6.9, con una temperatura óptima de crecimiento de 39°C y tolerancia a niveles considerablemente altos de ácidos orgánicos sin afectar adversamente su metabolismo (Kamra, 2005). En el pasado no se concedía importancia a la presencia de bacterias anaerobias facultativas, como *Escherichia coli*, en el medioambiente anaerobio del rumen. Este microorganismo era considerado un competidor pobre en relación con la población predominante de anaerobios estrictos encontrados en este ambiente.

La interacción microbial dentro del rumen es compleja, intensamente competitiva y se conoce que inhibe el crecimiento de enterobacterias. Aún así, enterobacterias anaerobias facultativas están presentes en el rumen. Éstas usualmente se encuentran en densidades poblacionales relativamente bajas, se consideran generalmente transitorias y no muestran crecimiento. Sin embargo, en años recientes, la incidencia del patógeno humano *E. coli* O157:H7 ha forzado a los microbiólogos a re-evaluar la ecología de anaerobios facultativos en el rumen y otros compartimientos del tracto gastrointestinal (Rasmussen et. al., 1993).

Los protistas, particularmente los ciliados, constituyen una fracción importante de la población microbiana total en el ecosistema del rumen. Éstos están preferencialmente retenidos en el rumen y como no contribuyen significativamente al suministro nutritivo postruminal, su valor total al hospedero es debatible (Nagaraja et. al., 1992). Dichos ciliados presentes en el rumen pueden constituir una reserva potencial para la sobrevivencia de *E. coli* O157 en el rumen y proveer un mecanismo para la sobrevivencia y el paso de esta bacteria a través del rumen hacia el tracto digestivo inferior del rumiante. Se conoce que los protistas del rumen invaginan, matan y digieren una serie de bacterias, excretando sus productos de digestión. Sin embargo, recientemente se han reportado otras bacterias que mantienen una relación de comensalismo con protistas del rumen. Hoy día poco es lo que se conoce acerca de la relación depredador-presa entre los protistas del rumen y bacterias patógenas. La asociación simbiótica entre *E. coli* y los protistas del rumen no ha sido reportada (Burow et. al., 2005).

Conociendo que tanto los bebederos de agua como el líquido ruminal han sido identificados como una fuente de protistas y de *E. coli* O157:H7 en las fincas (Burow et. al., 2005; Faith et. al., 1996; Muñoz et. al., 2003), los objetivos de este estudio son: (1) demostrar que los bebederos de agua para ganado son reserva de amebas de vida libre y ciliados, (2) demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 en bebederos de agua para ganado, (3) demostrar que los protistas presentes en muestras de agua de bebederos para ganado y del líquido ruminal pueden actuar como refugio para *E. coli* siendo una reserva potencial para la sobrevivencia de ésta. Además se realizaron estudios de co-incubación entre la ameba de vida libre *Acanthamoeba polyphaga* y la bacteria *Escherichia coli* para determinar si la bacteria podría continuar viable aún después de haber sido ingerida por la

ameba. Se eligió ésta ameba por su amplia distribución en el medio ambiente acuático, que va desde aguas residuales hasta agua embotellada y la cual también ha sido asociada a la ingestión y protección de bacterias patógenas transmitidas por alimentos (Ahmed, 2006).

REVISIÓN DE LITERATURA

Escherichia coli O157:H7 ha sido asociada con numerosos brotes de humanos infectados por alimentos a través del mundo (Thran et. al., 2003). Se estima que cada año ocurren, en los Estados Unidos solamente, 73,000 casos de infección y 61 muertes a causa de esta bacteria. La infección conduce a menudo a diarrea sanguinolenta y, ocasionalmente, a fallo renal (CDC, 2003a). Varios estudios han relacionado brotes de humanos infectados con esta bacteria, al consumo de carne molida mal cocida u otros productos cárnicos, por lo cual el ganado ha sido considerado reserva de este patógeno.

Durante la matanza del ganado, puede ocurrir contaminación de la canal con *E. coli* O157:H7 al ésta tener contacto con heces o con el digerido que se libera del tracto gastrointestinal. Como la contaminación está confinada a la superficie de la canal, diversos esfuerzos han sido dirigidos para desarrollar e implementar métodos de control después de la matanza, que reduzcan la contaminación con *E. coli* O157:H7. Estos esfuerzos han resultado en el desarrollo e implementación de planes HACCP (siglas en inglés para “Hazard Analysis and Critical Control Point”; en español “*Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control*”), para asegurar la inocuidad de los productos cárnicos. Los métodos de control después de la matanza incluyen pelado y lavado, rociado de higienizantes, lavado con agua caliente, uso de aditivos e irradiación (Thran et. al., 2003).

Recientemente, la atención se ha dirigido a desarrollar y evaluar estrategias que puedan reducir la contaminación con *E. coli* O157:H7 antes de la matanza. La implantación de medidas de control a nivel de finca combinadas con medidas efectivas después de la matanza puede reducir el peligro y, a su vez, reducir la preocupación del

consumidor. Se ha encontrado que varios factores en la finca interactúan simultáneamente afectando el transporte y la liberación de *E. coli* O157:H7 por el ganado. Estos incluyen: 1) manejo del animal (Herriott et. al., 1998), 2) el agua que consume el ganado (LeJeune et. al., 2001a), 3) manejo del alimento (Jordan y McEwen, 1998), 4) uso de aditivos y probióticos en los alimentos (Tkalcic et. al., 2000), 5) ingredientes en la dieta (Dargatz et. al., 1997; Hovde et. al., 1999; Kudva et. al., 1995; Kudva et. al., 1997; Lynn et. al., 1998), 6) manejo del estiércol (Hussein et. al., 2001) y 7) método de destete (Herriott et. al., 1998).

Una reserva adecuada de agua limpia y fresca para beber es considerada esencial para mantener el ganado en óptima salud. Lógicamente, el consumo de agua altamente contaminada con bacterias entéricas puede resultar en la infección de un gran número de animales en un periodo de tiempo relativamente corto (LeJeune et. al., 2001b). El agua que se le ofrece al ganado es a menudo de pobre calidad microbiológica, revelando un estudio que *E. coli* O157 estaba presente en al menos 10% de los bebederos (Faith et. al., 1996). Aunque el agua de consumo es reconocida como un vehículo importante en la infección de humanos con *E. coli* O157, se desconoce si las vacas bebiendo agua de bebederos previamente contaminados con este patógeno, están propensas a infección por el mismo. Si *E. coli* O157 es capaz de persistir y permanecer infecciosa en bebederos de agua para ganado, entonces las prácticas de manejo de esta reserva ambiental en la finca, pueden ayudar en el control de este patógeno (LeJeune et. al., 2001a).

Por otro lado, los sistemas de distribución de agua son colonizados por organismos saprofíticos heterotróficos (bacterias, hongos y levaduras) que crecen en materia orgánica biodegradable. Microorganismos potencialmente patogénicos como

Legionella spp. y microorganismos de origen fecal como *E. coli*, pueden también encontrar estas condiciones favorables para su proliferación. Esta biomasa bacteriana es la base de una compleja cadena alimenticia que involucra principalmente protistas y macroorganismos, lo cual significa que una fracción de la biomasa producida es removida por protistas. Aunque es importante considerar que los protistas no son los únicos, como depredadores ayudan a controlar la biomasa bacteriana que crece y se acumula en los sistemas de distribución de agua (Sibille et. al., 1998).

Otros estudios concernientes a la interacción entre bacterias y protistas demuestran que no todas las bacterias están disponibles como fuente de alimento para amebas y ciliados (Barker y Brown, 1994). En el estudio de Alexander (1981) se reportó que algunas bacterias Gram negativas son capaces de sobrevivir a la ingestión por protistas, lo cual podría deberse a la inhabilidad de las amebas y ciliados para matar y digerir la bacteria internalizada. Existen numerosos reportes de bacterias que sobreviven la endosimbiosis por protistas de vida libre, demostrando su adaptación al medioambiente intracelular. El hecho de que *Legionella pneumophila* infecte y se multiplique dentro de algunas especies de amebas de vida libre, confirma la habilidad de esta bacteria para aprovechar el ambiente intracelular normalmente hostil asegurando su sobrevivencia (Barker y Brown, 1994). El crecimiento dentro del protista ha sido asociado no sólo con el aumento en la sobrevivencia ambiental, sino también con el aumento en la virulencia y en la resistencia a biocidas y antibióticos (Barker et. al., 1999). El estudio de Santic' y Abu-Kwaik, (2006) demuestra que cuando una célula infectada por *L. pneumophila* lleva a cabo apoptosis (proceso de autodestrucción celular), la proliferación bacteriana se detiene. Sin embargo, *L. pneumophila* demostró tener la capacidad de tomar control del

programa de apoptosis de su célula hospedera y provocar la autodestrucción de ésta cuando la etapa de proliferación bacteriana haya terminado. Aún así, el rol potencial de los protistas como reserva de patógenos humanos aparenta no estar recibiendo la atención adecuada (Barker y Brown, 1994).

Entre los protistas, *Acanthamoeba* spp. es el más prevalente encontrado en el medioambiente. Éste está distribuido alrededor del mundo y ha sido aislado de suelo, polvo, aire, agua natural y tratada, agua de mar, piscinas, aguas residuales, sedimento, unidades de aire acondicionado, trampas de agua doméstica, plantas de tratamiento de agua, agua embotellada, unidades de tratamiento dental, hospitales y unidades de diálisis, estaciones de lavado de ojos, lentes de contacto y estuches de lentes contaminados con bacterias, entre otros. En ambientes acuáticos *Acanthamoeba* spp. puede encontrarse predominantemente en la interfase agua-aire, consumiendo bacterias que mantengan su crecimiento. Algunos géneros de bacterias son comestibles, mientras otros no lo son. Estudios de laboratorio usando microcosmos ameba-bacterias, indican que numerosas bacterias con relevancia clínica como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Simkania negevensis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* y al menos tres especies de *Listeria*, sobreviven y se multiplican dentro de *Acanthamoeba* (Marciano y Cabral, 2003).

Según Brown et al., (2002), como los protistas están ampliamente distribuidos en el agua, suelo y especialmente en efluentes, estos pueden constituir una importante reserva ambiental para la transmisión de *E. coli* O157 y otros patógenos. Aún así, el rol potencial de los protistas como reserva de patógenos humanos/animales ha recibido poca

o ninguna atención por las autoridades. El rol de los protistas en la sobrevivencia de *E. coli* O157 en ambientes naturales no ha sido estudiado, aunque el organismo puede sobrevivir en el estiércol de vaca por al menos varias semanas (Brown et. al., 2002)

Rasmussen et. al., (1993) investigaron el rol de la fermentación en el rumen de ganado como barrera para el patógeno humano, *E. coli* O157:H7. Ellos encontraron que cepas de *E. coli*, incluyendo algunos aislados de O157:H7, crecen pobremente en medios que simulan el ambiente ruminal de animales bien alimentados. Cepas de *E. coli* O157:H7 no mostraron mayor tolerancia que *E. coli* a las condiciones del rumen, que facilitarían la colonización del tracto digestivo de bovinos. Se observó crecimiento sin restricción de *E. coli* en fluido ruminal colectado de ganado en ayunas, mientras que se observó inhibición en fluido ruminal colectado de ganado bien alimentado, concluyendo que los animales bien alimentados aparentan ser menos favorables como reserva de *E. coli* patogénica (Rasmussen et. al., 1993).

Otros investigadores han demostrado que la composición de la dieta altera significativamente la sobrevivencia, proliferación y liberación de *E. coli* O157:H7 en ganado. Sin embargo, el modo y el lugar exacto (rumen, intestino delgado o intestino grueso) donde ocurre esta acción no han sido identificados. Se conoce que los cambios en el pH del rumen provocados por la variación en la concentración de alimentos, hace que *E. coli* sea eliminada rápidamente del rumen, pero aún la bacteria persiste en las heces hasta por 67 días (Thran et. al., 2003). Los mecanismos involucrados en los efectos de la dieta sobre la sobrevivencia de *E. coli* en el rumen no se conocen bien (Stewart, 1999).

La contribución de los protistas al metabolismo ruminal de ganado alimentado con una dieta de 95% granos, históricamente había sido considerado insignificante dado

que una dieta alta en granos presuntamente reduce o elimina completamente la población de protistas ciliados del rumen. Esta reducción o eliminación había sido atribuida a los bajos niveles de pH en el rumen, a hipertonicidad y a la rapidez con la que pasa el contenido a través del rumen. Sin embargo, Nagaraja et. al., (1992) reportaron que el ganado no mostraba características de defaunación y que a menudo poseían concentraciones relativamente altas de protistas. El número total de protistas en el contenido ruminal de ganado es aproximadamente $1.59 \times 10^5/g$. La defaunación del ganado aparentemente es transitoria, y cada animal posee una población de protistas dinámica que fluctúa en respuesta a los cambios en las condiciones del rumen.

La poca información acerca del rol exacto y la contribución de los protistas al ecosistema del rumen es probablemente debido a la dificultad de cultivarlos *in vitro*. Por lo tanto, el valor de la contribución de los protistas es hecho indirectamente por la comparación del metabolismo ruminal de animales defaunados con el de animales faunados. Sin embargo, el cambio ruminal asociado a la defaunación no puede ser solamente atribuido a la ausencia de protistas ya que, debido a su rol como depredadores, su presencia en el rumen está asociada con la reducción en la densidad bacteriana según Nagaraja et. al. (1992). Estos examinaron el efecto en el número total de bacterias anaerobias viables, bacterias productoras de ácido láctico (*Streptococcus bovis*, lactobacilos anaeróbicos y bacterias amilolíticas) y bacterias fermentadoras de ácido láctico en ganado defaunado y faunado y encontraron que el conteo total de bacterias anaerobias fue cerca de cuatro veces mayor en el grupo de animales defaunados que en el grupo faunado. Esto lo atribuyeron al efecto depredador de los protistas en el rumen.

Rasmussen et. al., (2004) demostraron que diversas cepas de *Salmonella* no tan sólo pueden sobrevivir dentro de protistas del rumen, sino que se pueden hacer más virulentas.

Zhao et. al., (2006) mencionan que el agua que se le ofrece al ganado es un importante vehículo para la diseminación de *E. coli* O157:H7 en la finca, haciendo necesario que los métodos que se utilizan para tratar el agua que consume el ganado reduzcan este patógeno. Ellos evaluaron una variedad de desinfectantes antimicrobiales para eliminar a *E. coli* O157:H7 de agua para consumo de ganado. Los resultados revelaron que la mayoría de los tratamientos tienen un efecto mínimo en eliminar el patógeno, en parte porque los tratamientos son neutralizados por la presencia de material orgánico como contenido ruminal y estiércol que generalmente contaminan el agua (Zhao et. al., 2006). Sin embargo, no relacionan el contenido ruminal y el estiércol como fuente de protistas que podrían estar ayudando a la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en el agua que consume el ganado.

El presente estudio está enfocado en el potencial de los bebederos de agua como el punto común ambiental donde las vacas pudieran estar contaminándose con *E. coli* O157:H7, la cual podría estar alojada en el interior de protistas que abundan en esta agua. Como parte de este estudio buscamos: (1) demostrar que los bebederos de agua para ganado son reserva de amebas de vida libre y ciliados, (2) demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 en bebederos de agua para ganado, (3) demostrar que los protistas presentes en muestras de agua de bebederos para ganado y del líquido ruminal pueden actuar como refugio para *E. coli* siendo una reserva potencial para la sobrevivencia de ésta. Además se realizaron estudios de co-incubación entre la ameba de vida libre

Acanthamoeba polyphaga y la bacteria *Escherichia coli* para determinar si la bacteria podría continuar viable aun después de haber sido ingerida por la ameba.

La viabilidad de la bacteria fue determinada aplicándole el tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), y observándola bajo el microscopio confocal de rayos láser (Olympus FluoView FV300). Éste es el primer informe escrito donde se demuestra por medio de microscopía confocal de rayos láser, la interacción entre *Escherichia coli* y la ameba desnuda *Acanthamoeba polyphaga*.

PROCEDIMIENTO

I. Detección de *E. coli* O157:H7 en muestras de agua tomada de bebederos para ganado de carne.

A. Recolección de las muestras

Con el fin de determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 se recolectaron muestras de agua de bebederos para ganado de carne en la finca Altamira, localizada en la Carr. 301 Km. 4.8 Bo. Llanos Costas, Cabo Rojo, Puerto Rico. Esta finca tiene un tamaño aproximado de 1,200 cuerdas, con sobre 200 cabezas de ganado de carne. Para la realización del estudio se eligieron al azar cuatro bebederos de agua en uso al momento del muestreo, contruidos en cemento, que recibieran agua de pozo y que estuviesen expuestos directamente a los rayos del sol.

Las muestras utilizadas fueron recolectadas entre las 9:00 a.m y las 11:00 a.m. Se realizaron un total de 12 muestreos durante los años 2004 y 2005 (seis por año). De la superficie del bebedero, utilizando bolsas Whirlpak (Fisher) se colectaron dos muestras de 100mL previo a agitar el agua y dos muestras de 100mL inmediatamente después de agitarla suavemente con una vara plástica previamente sanitizada, para un total de cuatro muestras por bebedero. Una vez recolectadas las muestras, éstas fueron transportadas al laboratorio evitando el movimiento y la exposición directa a los rayos del sol. Se analizaron un total de 192 muestras.

B. Aislación de *E. coli* O157:H7 utilizando SMAC_{CT}

Una vez en el laboratorio, cada muestra de agua fue filtrada a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.2 μ m (Whatman). Utilizando técnicas asépticas cada filtro fue

colocado sobre un plato Petri que contenía agar MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (SMAC_{CT}) (Oxoid, SR0172E). Los platos fueron incubados a 37°C por 24-48h (Fujisawa et. al., 2000). Al cabo de este tiempo de incubación se seleccionaron aquellos platos que contenían entre 100-300 colonias incoloras, representativas de organismos sorbitol negativo. Utilizando un asa estéril, se tomaron un máximo de 5 colonias típicas y se estriaron en SMAC_{CT} hasta dos veces para purificar las colonias. Las colonias fueron entonces transferidas a EC medium con MUG (4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido) (Difco) e incubadas a 37°C por 24-48h (Feng y Weagent, 2002) y finalmente los cultivos fueron examinados bajo una lámpara de luz ultravioleta (365nm). Aquellos platos que no mostraron fluorescencia fueron tomados como colonias presuntivas de esta bacteria (CDC, 1994). Las colonias representativas de *E. coli* O157:H7 no producen cromógeno fluorescente 4-metil-umbeliferona dado que esta bacteria no posee la enzima β-glucuronidasa capaz de romper el sustrato 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido (MUG). Las colonias MUG negativas aisladas fueron caracterizadas bioquímicamente utilizando el sistema de identificación de organismos entéricos, Api 20E (Analytab).

C. Caracterización bioquímica utilizando Api 20E.

Las colonias MUG negativas a ser analizadas utilizando el sistema de identificación de organismos entéricos, Api 20E, fueron estriadas en la superficie de tubos con agar nutriente inclinado. Los tubos fueron incubados a 37°C de 16-18h. Al cabo de este tiempo de incubación, se removió la mayor parte del crecimiento sobre el agar nutriente utilizando un hisopo estéril seco. Éste fue colocado dentro de un tubo pequeño que contenía de 5-6mL de solución salina al 0.85% y se agitó vigorosamente.

Luego se realizó la prueba de oxidasa y la prueba de catalasa a cada una de las muestras. Para la prueba de oxidasa, se comenzó tomando un poco del crecimiento sobre el agar nutriente con un hisopo estéril. Inmediatamente se le añadió una gota del reactivo de oxidasa (Becton Dickinson) sobre el crecimiento en el hisopo y se observó por 10-30s. La prueba de oxidasa se basa en la producción de la enzima indofenol oxidasa. Dicha enzima oxida un colorante redox presente en el reactivo, por lo cual un cambio en color de amarillo a violeta oscuro indica una prueba oxidasa positiva; mientras que si permanece amarillo es oxidasa negativa.

Para realizar la prueba de catalasa, se tomó un poco del crecimiento sobre el agar nutriente en un asa de inocular, se esparció sobre una laminilla limpia y seca e inmediatamente se le añadió una gota de peróxido de hidrógeno. La prueba de catalasa se basa en la presencia de la enzima catalasa. Dicha enzima tiene la capacidad de hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno ($2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), por lo cual una producción de burbujas sobre el cultivo es considerado catalasa positivo, mientras que la ausencia de burbujas es considerado catalasa negativo (Costa y Imlay, 2001). Se continuó con el procedimiento del Api 20E a aquellos cultivos cuyo resultado fuesen oxidasa negativo y catalasa positivo.

Haciendo uso de un gotero estéril, se inoculó la suspensión salina que ya contenía la muestra en los primeros 20 mini tubos de la tirilla de prueba Api 20E siguiendo las instrucciones del fabricante para servir las muestras. Las tirillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C por 18-24h. Luego del periodo de incubación se hicieron las pruebas indicadas por el fabricante.

El hisopo colocado en el tubo con 5-6mL de solución salina al 0.85% fue luego transferido a un tubo con caldo nutriente, para obtener un cultivo fresco de la bacteria. Estos tubos fueron incubados a 37°C por 24h y luego se guardaron en la nevera.

Luego del periodo de incubación se realizó la lectura de las tirillas de prueba Api 20E y se determinó el perfil numérico, necesario para determinar el género y la especie de cada colonia analizada según el manual Api 20E.

II. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Se realizó una curva de crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922) para determinar el tiempo en horas en el cual la bacteria permanece en las fases *lag* y *log*. Durante estas dos primeras fases de la curva, la mayor parte de las células están vivas, información que resulta importante porque al momento de co-incubar la bacteria y la ameba se deben utilizar células bacterianas que estén vivas.

Para realizar la curva de crecimiento, *Escherichia coli* (ATCC 25922) deshidratada fue añadida a un tubo que contenía “Brain Heart Infusion Broth” (BHI) (agar de infusión de cerebro y corazón) estéril (tubo de reserva). Éste fue incubado a 37°C por 48h con agitación. Al cabo de este tiempo de incubación, una alícuota de 250µL fue transferida a dos tubos que contenían BHI estéril. Los tubos fueron incubados a 37°C por 48h con agitación. Al cabo de este tiempo de incubación, una alícuota de 250µL de cada uno de los tubos fue transferida a tubos con caldo “Peptone Yeast Glucose” (PYG) (peptona levadura glucosa) (ATCC). Se transfirió a este medio de cultivo para tener a la bacteria en el mismo medio que a la ameba *Acanthamoeba polyphaga*. Los tubos de PYG fueron incubados a 37°C por 48h con agitación. Al cabo de este tiempo de

incubación se realizó una curva de crecimiento por espectrofotometría a cada uno de los tubos.

III. Corroboración de la pureza de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

La pureza de la bacteria se determinó utilizando el Sistema de Identificación de Organismos Entéricos Api 20E siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV. Observación de *Escherichia coli* teñida con LIVE/DEAD L-7012 mediante microscopía confocal de rayos láser (Olympus FluoView FV300).

Para teñir la bacteria, una alícuota de 250µL de *Escherichia coli* (ATCC 25922) creciendo en PYG fue añadida a un tubo Falcon de 15mL (Fisher) conteniendo 5mL de PYG estéril. El tubo fue incubado con agitación a 37°C por 1 hora. Al cabo de este tiempo se tomó una alícuota de 500µL y se añadió a un microtubo estéril. En otro microtubo se mezclaron 0.75µL del tinte SYTO9 con 0.75µL del tinte ioduro de propidio. La mezcla de tintes fue inmediatamente añadida al microtubo que contenía los 500µL de bacteria. Este fue forrado con papel de aluminio y dejado a temperatura ambiente por 15 minutos, sin movimiento. Al cabo de los 15 minutos una alícuota de 10µL de bacteria tratada con tintes fue colocada sobre un cubre objetos 24 x 60mm (VWR Scientific). La muestra fue inmediatamente observada en el microscopio confocal de rayos láser a un largo de onda de 490nm para determinar si observaban bacterias vivas (verde) y muertas (rojas) en la muestra.

V. Hidratación y cultivo de la ameba de vida libre *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30871).

A la ampula conteniendo la ameba de vida libre, *Acanthamoeba polyphaga*, se añadieron 0.5mL de caldo PYG a punto de congelación conteniendo 12% de sucrosa (ATCC). Asépticamente, 250µL del hidratado fueron distribuidos entre tres tubos plásticos de rosca (250µL c/u) 17x120mm (Fisher), conteniendo 5mL de medio PYG fresco. Los tubos fueron incubados horizontalmente, sin movimiento, con la tapa sellada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h. Al cabo de este tiempo, se tomaba una gota de uno de los tubos, se colocaba sobre un cubre objetos y se observaba en un microscopio de luz en objetivo 100x para determinar si la ameba se encontraba en forma de trofozoito o de quiste. En aquellos casos en que la ameba estaba aún enquistada, se continuaba la incubación horizontal de los tubos a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 4 días adicionales y luego cada 9-10 días hasta que se observara que la ameba había desenquistado. Se tomaron fotos en todas las ocasiones en que se observaron las muestras.

Para mantener una reserva de amebas, cada 10-14 días se transferían 250µL de suspensión de amebas a tubos plásticos de rosca conteniendo 5mL de medio PYG fresco (en duplicado). Estos se colocaban en incubación a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una inclinación de 15° con la tapa totalmente sellada.

VI. Observación de *Acanthamoeba polyphaga* en el microscopio confocal de rayos láser.

Se tomó una alícuota de 100µL de *Acanthamoeba polyphaga* de uno de los tubos de reserva de ameba con menos de 10 días de incubación y se colocó sobre un cubre objetos 24 x 60mm. La muestra fue inmediatamente observada en el microscopio confocal para: a) establecer la diferencia entre la ameba en etapa de quiste y de trofozoito, b) determinar la magnificación más apropiada para observar las estructuras

internas de la ameba en ambas etapas, y c) determinar si la ameba mostraba autofluorescencia bajo algún largo de onda.

VII. Co-incubación entre *Escherichia coli* y *Acanthamoeba polyphaga*

En cada ensayo de co-incubación entre la bacteria y la ameba se examinaba microscópicamente la calidad de ambos organismos por separado. En un cubre objetos (24 x 60mm) se colocaban 10 μ L de la ameba en un extremo y 10 μ L de la bacteria previamente teñida en el otro extremo. Al observar la muestra de amebas bajo el microscopio confocal de rayos láser se buscaba: que la muestra contuviese abundancia de amebas en forma de trofozoitos, que los trofozoitos estuviesen en buen estado y que la muestra no estuviese contaminada con bacterias. Por otro lado, al observar la muestra de bacterias bajo el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm se buscaba: que hubiese abundancia en el número de bacterias, que todas o la mayoría de las bacterias estuviesen teñidas de verde (vivas) y que tuviesen movimiento.

La co-incubación entre la ameba y la bacteria se realizó para corroborar; en primer lugar, si la ameba *Acanthamoeba polyphaga* tiene la capacidad de ingerir la bacteria *Escherichia coli*; en segundo lugar, si las bacterias continúan viables aún después de haber sido ingeridas por la ameba; y en tercer lugar, para determinar si el tiempo de co-incubación tiene algún efecto sobre la cantidad de bacterias ingeridas. La viabilidad de la bacteria se determinó observando el color que éstas emitían. Las bacterias vivas emiten color verde y las muertas, rojo. Para corroborar los tres puntos anteriores se tomó, primeramente, una alícuota de 10 μ L de *Acanthamoeba polyphaga* de uno de los tubos de reserva de ameba con menos de 10 días de incubación y se colocó en el centro de un cubre objetos 24 x 60mm. Inmediatamente, sobre los 10 μ L de suspensión de ameba

se colocaron 10 μ L de suspensión de bacteria *Escherichia coli* previamente teñida con el tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012. La mezcla se movió ligeramente con la punta de la micropipeta y se colocó un cubre objetos (18 x 18mm, Fisher) encima. Luego, utilizando esmalte transparente se sellaron los cubre objetos para evitar que la muestra se secase durante la observación bajo el microscopio. Ésto se realizó simultáneamente para seis cubre objetos diferentes, con el fin de examinar una muestra fresca en cada análisis y que no hubiese recibido exposición directa y prolongada a la luz del microscopio. Cada cubre objetos fue examinado en el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm cada 30 minutos (0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos), para un total de 4h. Se tomaron fotos de secciones transversales finas y videos que permitieran corroborar que la bacteria está dentro de la ameba y no sobre ésta.

VIII. Estudio de amebas de vida libre y ciliados presentes en el agua de bebedero para ganado de carne utilizando el microscopio confocal de rayos láser.

Con el fin de corroborar que los bebederos de agua para ganado de carne son una reserva ambiental de amebas de vida libre y ciliados, se recolectaron muestras de agua y se transportaron al laboratorio, como se describe en la parte I-A de este escrito. Una vez en el laboratorio, las muestras permanecieron en reposo por 2h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, utilizando un gotero estéril se tomó una alícuota del agua de la superficie y se distribuyó entre varios cubre objetos. El mismo procedimiento se hizo con una alícuota tomada del agua del fondo de la bolsa Whirlpak. Las muestras fueron observadas bajo el microscopio confocal de rayos láser para detectar la presencia de amebas o ciliados solos.

IX. Co-incubación entre las amebas de vida libre y ciliados presentes en el agua de bebedero y *Escherichia coli*.

Inmediatamente se observaba bajo el microscopio un protista aislado, se añadían 1.5µL del tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012 sobre la muestra. Esta se forraba con papel de aluminio y era mantenida en reposo por 15min. Al cabo de este tiempo se observaba la muestra en el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm para determinar, en primer lugar, si las bacterias alrededor y dentro del protista adquirieron el tinte, y en segundo lugar, la viabilidad de las bacterias teñidas.

En otra laminilla donde se observara un protista aislado se añadían 10µL de suspensión de bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) previamente teñida sobre la muestra. Ésta se examinaba en el microscopio confocal de rayos láser para determinar si el protista observado tenía la capacidad de ingerir la bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) y también, si las bacterias continuaban viables aún después de haber sido ingeridas por el protista. La viabilidad de las bacterias se determinó tal como se describió en la parte VI de este escrito.

X. Recolección de las muestras del rumen de vaca

La recolección de las muestras de rumen fue realizada a una vaca lechera fistulada propiedad de la vaquería de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez, localizada en la Carr. 303 Km. 0.7 Bo. Palmarejo Lajas, Puerto Rico. La vaca fistulada raza Holstein tiene 9 años de edad y está con el resto del hato. Se alimenta de alimento concentrado 18% proteína “Dairy feed” (PanAmerican Grade) y hierba cortada. Al igual que el resto de los animales del hato, consume agua de bebederos plásticos expuestos directamente a los rayos del sol.

En un mismo día se colectaron seis muestras de material ruminal entre las 6:00 a.m y las 7:00 a.m del mes de marzo del 2006. Utilizando guantes, se introdujo la mano en el rumen de la vaca, se extrajeron dos puñados de material ruminal y se colocaron en bolsas de Stomacher (Fisher) estériles. Una vez recolectadas las muestras, éstas fueron transportadas al laboratorio evitando el movimiento exagerado y la exposición directa a los rayos del sol.

XI. Estudio de los protistas presentes en el rumen de vacas utilizando el microscopio confocal de rayos láser.

Una vez en el laboratorio, utilizando un gotero estéril, se tomó una alícuota de líquido ruminal y se distribuyó entre varios cubre objetos. Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal de rayos láser hasta encontrar amebas o ciliados solos.

XII. Co-incubación entre los protistas presentes en el líquido ruminal y *E. coli* teñida con el tinte LIVE/DEAD L-7012.

A cada muestra de líquido ruminal con presencia de ciliados y amebas se le añadía 1.5µL del tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012 sobre la muestra. Esta se forraba con papel de aluminio y se mantenía en reposo por 15min. Al cabo de este tiempo, se observaba la muestra en el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm para determinar en primer lugar si las bacterias alrededor y dentro del protista adquirieron el tinte, y en segundo lugar, la viabilidad de las bacterias teñidas.

En otra laminilla donde se observara un protista aislado se añadían 10µL de suspensión de bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) previamente teñida sobre la

muestra. Esta se examinaba bajo el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm para determinar si el protista observado tenía la capacidad de ingerir la bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) y si las bacterias continúan viables aún después de haber sido ingeridas por el protista. La viabilidad de la bacteria se determinaba tal como se describió en la parte VI de este escrito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *E. coli* O157:H7 en agua de bebedero para ganado de carne.

El Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM) de AOAC indica que el agar MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (SMAC_{CT}) es altamente selectivo y ha sido desarrollado para aislar *E. coli* O157:H7. El fabricante hace la salvedad de que bacterias que no fermentan sorbitol, como *Morganella* y *Hafnia*, pueden aparecer en este medio como colonias idénticas a *E. coli* O157:H7. MacConkey Sorbitol es un medio diferencial que permite distinguir entre las cepas de *E. coli* con y sin la habilidad de fermentar sorbitol. Al medio se le añade cefixima para inhibir algunos cocos Gram positivos, cocos Gram negativos y bacilos Gram negativos. Mientras que el telurito inhibe la mayoría de las bacterias presentes en los alimentos, excepto *Staphylococcus* spp. coagulasa positivo. La literatura presenta varios artículos (LeJeune et. al., 2001a, LeJeune et. al., 2001b, LeJeune et. al., 2004) en los cuales utilizan SMAC_{CT} para aislar *Escherichia coli* O157 de bebederos de agua para ganado. Al igual que en estos artículos de LeJeune, Faith et. al., (1996), Shere et. al., (2002) y Renter et. al., (2003), realizaron estudios similares logrando también aislar la bacteria de esta fuente. Basado en los estudios antes mencionados, decidimos utilizar el medio SMAC_{CT} para aislar a *E. coli* O157:H7 de bebederos de agua para ganado.

Con el propósito de detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de agua tomadas de bebederos para ganado se analizaron 192 muestras, colectadas en 12 muestreos. De las 192 muestras analizadas 10 fueron identificadas por la prueba Api 20E como especies de *Pseudomonas* spp. y 2 fueron identificadas como *Enterobacter cloacae*. Ninguna de las muestras resultó ser *E. coli* (Tabla 1). Müller y Ehlers, (2005)

examinaron la eficacia del medio SMAC_{CT} para aislar *E. coli* O157:H7 y concluyeron que una variedad de bacterias Gram negativas pueden ser aisladas utilizando este medio, en su mayoría, de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* spp. El presente estudio demostró también que la alta selectividad atribuida a este medio en la selección de *E. coli* O157:H7 no es real.

Resultados de las pruebas Api 20E				
No. de muestra	No. de bebedero	Código Api 20E	Descripción de los resultados según el manual Api 20E	Resultados
1	Control	514450	Excelente	<i>Escherichia coli</i>
2	Control	514450	Excelente	<i>Escherichia coli</i>
3	1	220200	Muy buena	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens</i>
4	1	220300	Poco selectiva	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens</i>
5	1	220200	Muy buena	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens</i>
6	3	220000	Muy buena	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens, P. putida</i>
7	3	220000	Muy buena	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens, P. putida</i>
8	3	050202	Excelente	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
9	3	050202	Excelente	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
10	4	220000	Muy buena	<i>P.aeruginosa, P. fluorescens, P. putida</i>
11	1	330547	Buena	<i>Enterobacter cloacae</i>
12	1	330557	Buena	<i>Enterobacter cloacae</i>

Tabla 1. Resultados de las pruebas Api 20E realizadas a cultivos puros procedentes de las 192 muestras de agua tomadas de bebederos para ganado de carne.

Fujisawa et. al., (2000), utilizó SMAC_{CT} para aislar a *E. coli* O157:H7 de espárragos y concluyó que la presencia de *Pseudomonas* spp. puede enmascarar a *E. coli* O157:H7 y no permitir que ésta sea aislada. Stewart (1999), menciona la interacción de *Pseudomonas aeruginosa* con *E. coli* O157 indicando que ésta inhibe el crecimiento de *E. coli* O157 *in vitro*. Las cepas de *P. aeruginosa* de diferentes animales producen varias bacteriocinas (piocinas), las cuales pueden tener un rol ecológico en determinar el biotipo dominante de *E. coli* que estará presente. Dos pigmentos de *P. aeruginosa* (piocianina y fluoresceína) han demostrado inhibir diversas cepas de *E. coli* O157. Con estos factores no es posible descartar la posible presencia de *E. coli* en las aguas analizadas.

LeJeune et. al., (2001b), determinó que entre los factores que influyen en la calidad del agua que se le ofrece al ganado está la exposición directa de los bebederos a los rayos del sol. En ese estudio lograron aislar a *E. coli* O157 en 4 de 251 (1.6%) bebederos expuestos directamente a los rayos del sol y en 2 de 217 (0.9%) bebederos no expuestos a la luz solar. Se mencionan la competencia y la depredación por otros microorganismos como factores importantes que influyen en la eliminación de bacterias de sistemas acuáticos naturales. Señalan que todos estos factores deben considerarse al tratar de aislar a *E. coli* O157:H7 de agua de bebederos (LeJeune, Merrill et. al., 2001b).

Curva de crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

La Figura 1 muestra la curva de crecimiento realizada a *Escherichia coli* (ATCC 25922) para determinar el tiempo en horas que la bacteria se encuentra en las fases lag y log. Durante estas dos primeras fases de la curva, la mayor parte de las células están vivas, por lo cual al teñirlas se espera que fluorescan de color verde. La importancia de conocer el tiempo de estas fases estriba en que al momento de la co-incubación todas las

células bacterianas deben estar vivas. De esta manera, si al ponerlas en contacto con la ameba ocurre un cambio en el color de la membrana celular de la bacteria de verde a rojo, éste puede atribuirse a la interacción entre estos organismos y no a que la célula estaba muerta (roja) previo a co-incubación.

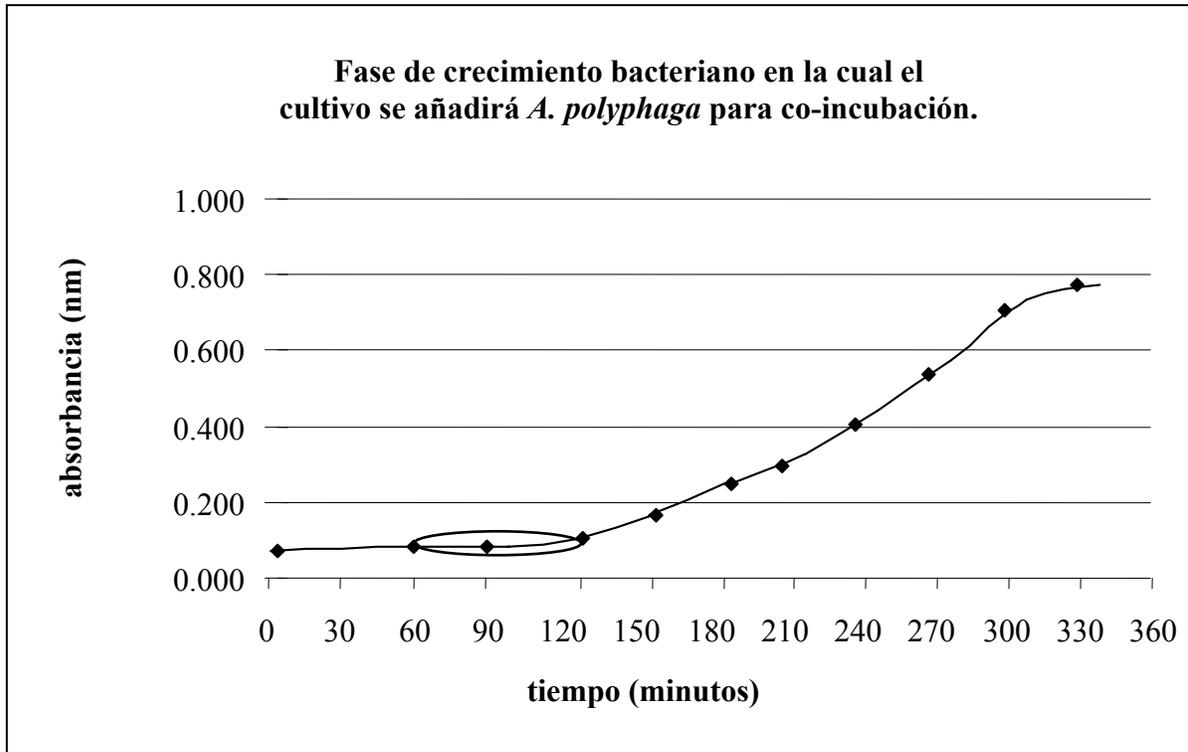


Figura 1. Curva de crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) en medio peptona-levadura-glucosa (PYG).

Las pruebas Api 20E se realizaron a *E. coli* (ATCC 25922) para corroborar la pureza de la bacteria antes y durante la investigación.

Estudio de *Escherichia coli* en el microscopio confocal de rayos láser.

Antes de elegir cuál tinte sería el más apropiado para teñir a *E. coli* y demostrar su viabilidad era importante conocer si la bacteria emitía autofluorescencia bajo algún largo de onda, que fuera a interferir con la fluorescencia del tinte. La Figura 2 muestra la manera en la que se observaba *E. coli* en el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm, bajo el cual no emitió fluorescencia. Basado en el estudio de Barker et. al., (1999), seleccionamos el tinte fluorescente LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L-7012 (Molecular Probes) para demostrar la viabilidad de la *E. coli* a ser usada en este estudio. El tinte LIVE/DEAD se compone de los tintes fluorescentes SYTO9 (tinte de ácidos nucleicos verde fluorescente) y yoduro de propidio (tinte de ácidos nucleicos rojo fluorescente). El SYTO9 se adhiere a toda población de bacterias, tanto a las que tienen la membrana intacta como a las que han sufrido algún daño en ésta. En cambio, el yoduro de propidio penetra sólo bacterias con daño en la membrana, causando una reducción en la fluorescencia del tinte SYTO9 cuando ambos tintes están presentes. Utilizando una mezcla apropiada de ambos tintes las bacterias con la membrana celular intacta fluorescen verde, mientras que aquellas con daño en la membrana celular fluorescen rojo. Los rangos de excitación/emisión máxima para los tintes son 480/500nm para SYTO9 y 490/635nm para yoduro de propidio.

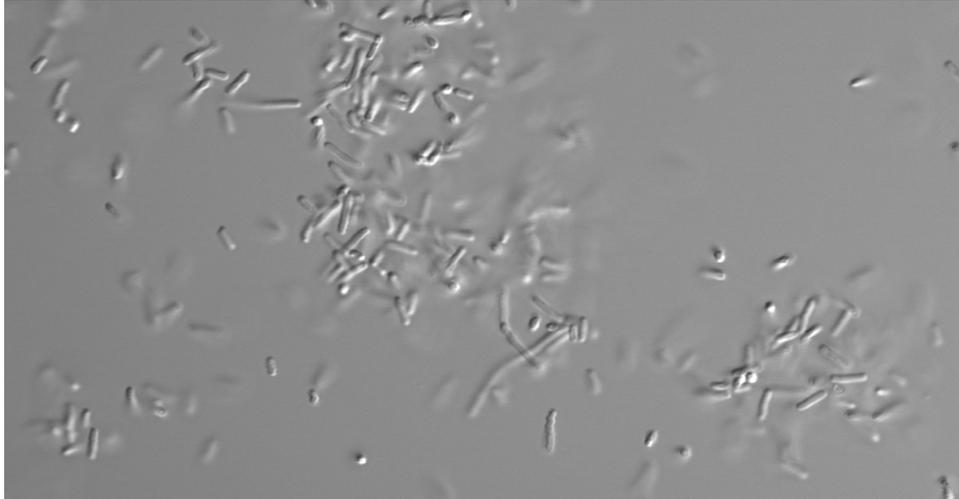


Figura 2. Cultivo de *E. coli* tal como se observó bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm, bajo el cual no emitió fluorescencia.

La Figura 3 muestra a *E. coli* teñida luego de 15 minutos en contacto con la mezcla de tintes. Esta muestra fue observada bajo el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm. El cultivo utilizado en esta prueba se encontraba en la fase estacionaria, por esto se observan células vivas (verdes) y células muertas (rojas), mientras el fondo del campo de visión permanece sin fluorescer.

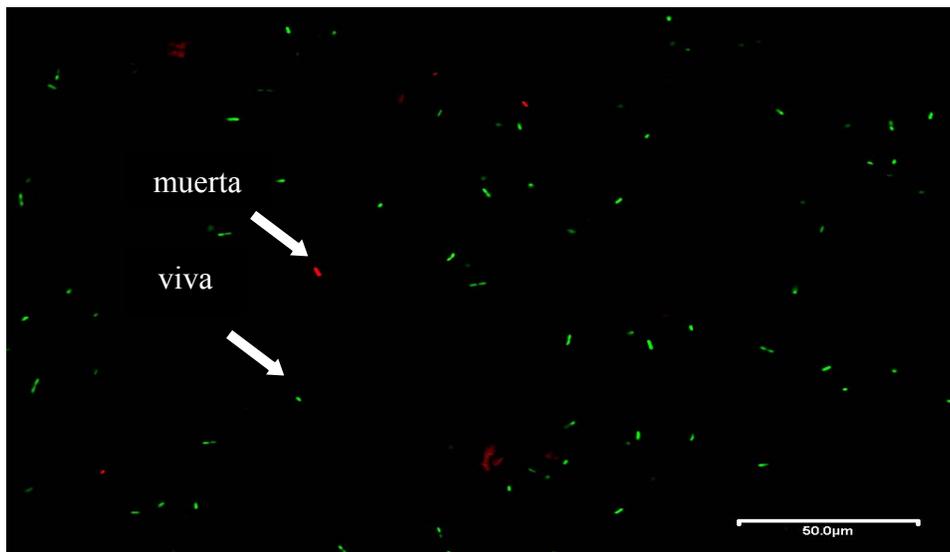


Figura 3. *E. coli* teñida con LIVE/DEAD L-7012 observada bajo el microscopio confocal de rayos láser a 490nm. Las bacterias que emiten fluorescencia verde tienen la membrana celular intacta (vivas), las que emiten fluorescencia roja tienen daño en la membrana celular (muertas).

Estudio de *Acanthamoeba polyphaga* bajo el microscopio confocal de rayos láser.

El ciclo de vida de *Acanthamoeba polyphaga* consiste de dos etapas: la de quiste (metabólicamente inactiva) y la de trofozoito (forma activa). La formación del quiste ocurre bajo condiciones ambientales adversas como deprivación de alimento, desecación, cambios en temperatura, pH y presión osmótica.

La Figura 4 muestra un quiste de *A. polyphaga* observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Este provino de medio PYG incubado a 22°C por 72h. El quiste de *A. polyphaga* se caracteriza por ser arrugado y con doble pared celular. Éste se compone del exoquiste (membrana externa) y el endoquiste (membrana interna), lo cual explica por qué los quistes de *A. polyphaga* son resistentes a biocidas y clorinación (Greub and Raoult, 2002). Estos pueden presentarse en forma hexagonal, poligonal, esférica o de estrella y medir entre 15-20µm de diámetro. Los quistes de *A. polyphaga* tienen un citoplasma granular fino con vacuolas y un sólo núcleo rodeado por un halo claro (Marshall et. al., 1997).

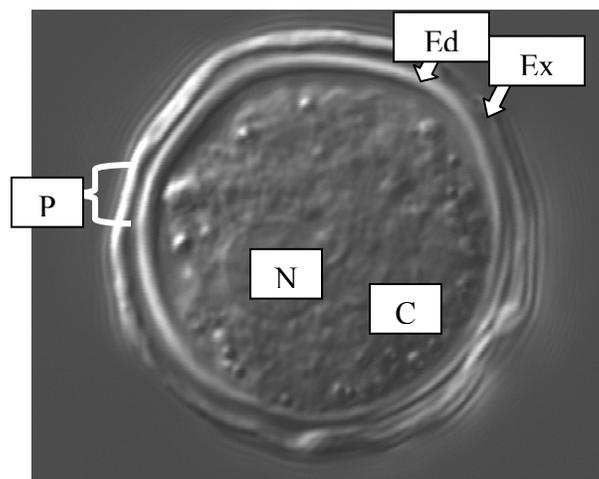


Figura 4. Quiste de *A. polyphaga* observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Se observa la pared celular (P), la membrana externa o exoquiste (Ex) y la membrana interna o endoquiste (Ed), el citoplasma granular (C) y el núcleo (N).

La ameba desenquista cuando las condiciones ambientales vuelven a serle favorables. En nuestro estudio, ésto ocurrió luego de 15 días de incubación bajo las condiciones que se describen en la parte V. Los trofozoitos miden entre 10-50 μ m, son delgados y tienen estructuras como espinas llamadas acantopodias, que se proyectan desde la superficie. Estas proyecciones son las que le permiten al organismo llevar a cabo movimientos lentos. Los trofozoitos muestran un citoplasma granular, una vacuola prominente y un núcleo (Figura 5).

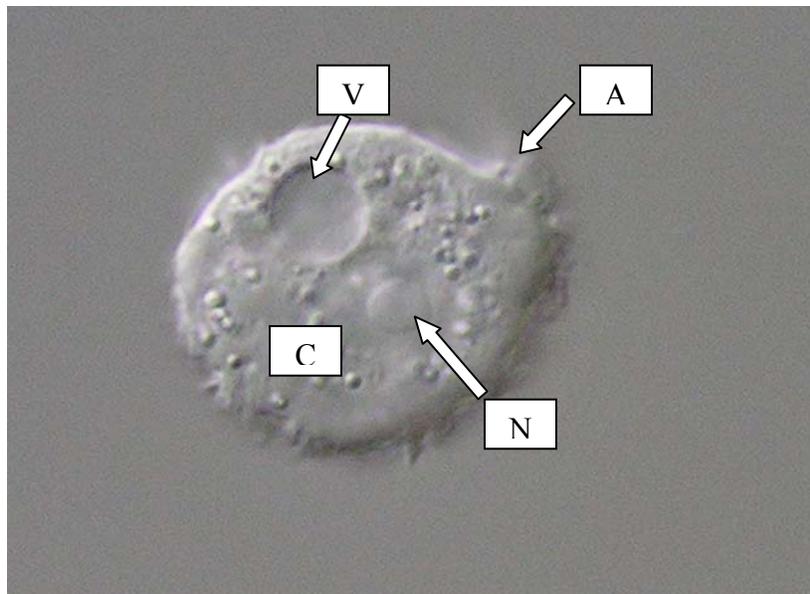


Figura 5. Trofozoito de *A. polyphaga* observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Se observa la vacuola (V), las acantopodias (A), el citoplasma (C) y el núcleo (N).

Al irradiar el quiste a largo de onda de 490nm utilizando la técnica de Nomarski no se observó autofluorescencia (Figura 6). Sin embargo, si el quiste mostraba algún daño en la estructura de la membrana, ésta fluorescía de color rojo (Figura 7) al observarla bajo el microscopio confocal de rayos láser a largo de onda de 490nm. En la mayoría de las amebas patógenas reportadas en la literatura, la pared del quiste se encuentra cubierta por el carbohidrato quitina. *Acanthamoeba* spp. es la excepción, ya

que el endoquiste consiste de celulosa (Linder et. al., 2002) y el exoquiste de proteínas ácido-insolubles (Turner et. al., 2000). Linder et. al., (2002) observaron fluorescencia en quistes rotos y en secciones congeladas de quistes, pero no en quistes maduros intactos, desconociendo la razón por la que esto ocurre. En el presente estudio la desecación del quiste provocada por exposición directa y prolongada a la luz del microscopio causó daño en la membrana haciendo que ésta se observara rojo fluorescente al examinarla en el microscopio confocal de rayos láser.

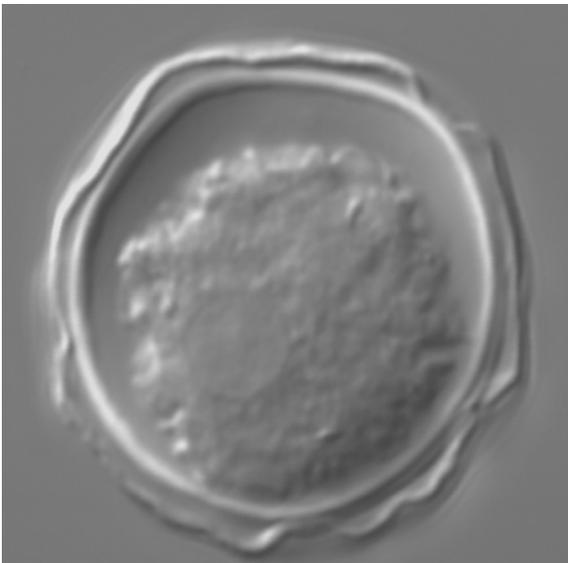


Figura 6. Quiste de *A. polyphaga* observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Este se observa con la membrana intacta, la cual no emite autofluorescencia.



Figura 7. Quiste de *A. polyphaga* observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm. Éste se observa con daño en la membrana por desecación luego de la exposición directa y prolongada a la luz del microscopio, lo cual hace que éste emita autofluorescencia.

En una muestra que contenía trofozoitos y quistes de *A. polyphaga* observada bajo microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski e irradiada a largo de onda de 490nm, se observó que ambos emitieron autofluorescencia en áreas no

específicas. La fluorescencia se observó como puntos verdes y rojos dispersos por el citoplasma (Figura 8). No se encontraron estudios que mencionaran o explicaran las razones a las que se puede atribuir estas observaciones.



Figura 8. Quistes (Q) y trofozoitos (T) de *A. polyphaga* emitiendo autofluorescencia verde y roja. Observado bajo el microscopio confocal de rayos láser utilizando la técnica de Nomarski a largo de onda de 490nm.

Co-incubación entre *Escherichia coli* y *Acanthamoeba polyphaga*.

Al co-incubar la bacteria *E. coli*, previamente teñida, y la ameba *A. polyphaga* se observó que en 15 minutos, había bacterias en el interior de las amebas. En todos los ensayos realizados, las bacterias en el interior de las amebas fluorescieron verde y mostraban movimiento, demostrando que la ameba tiene la capacidad de ingerir la bacteria sin causarle daño alguno a la integridad de la membrana de ésta. En ocasiones las bacterias se observaron dispersas por todo el citoplasma de la ameba (Figura 9), mientras que en otras ocasiones las bacterias se observaban agrupadas en pseudo-vacuolas (Figura 10). Fuera del trofozoito observado en la Figura 10, se observan líneas verdes fluorescentes representativas de bacterias en movimiento.

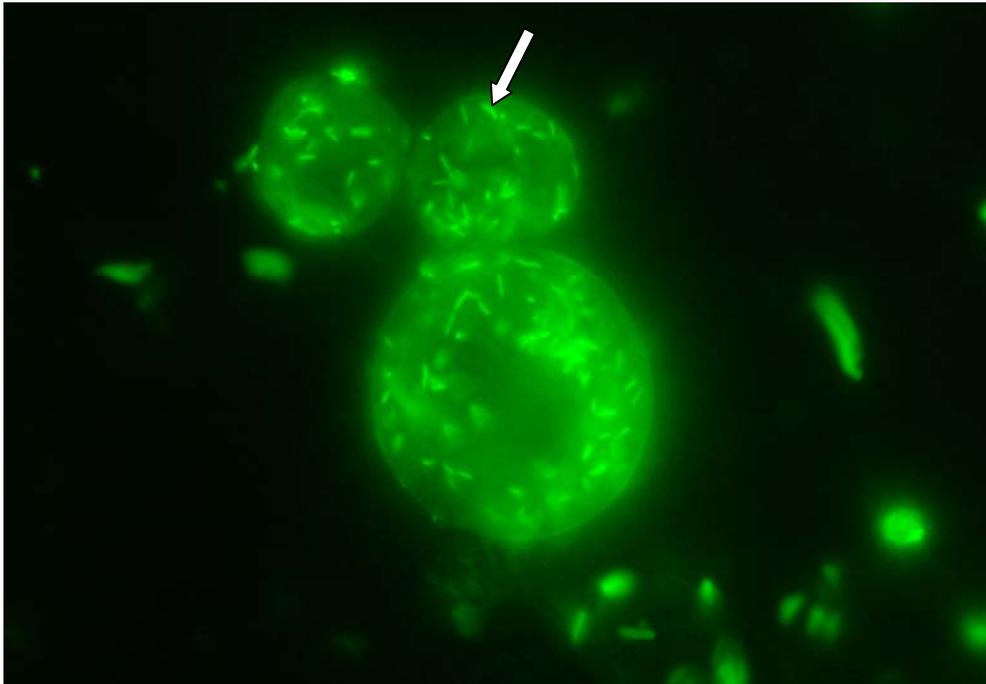


Figura 9. *E. coli* viable (fluoresciendo verde) en el interior de trofozoitos de *A. polyphaga* luego de 3 horas de co-incubación. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a largo de onda de 490nm.

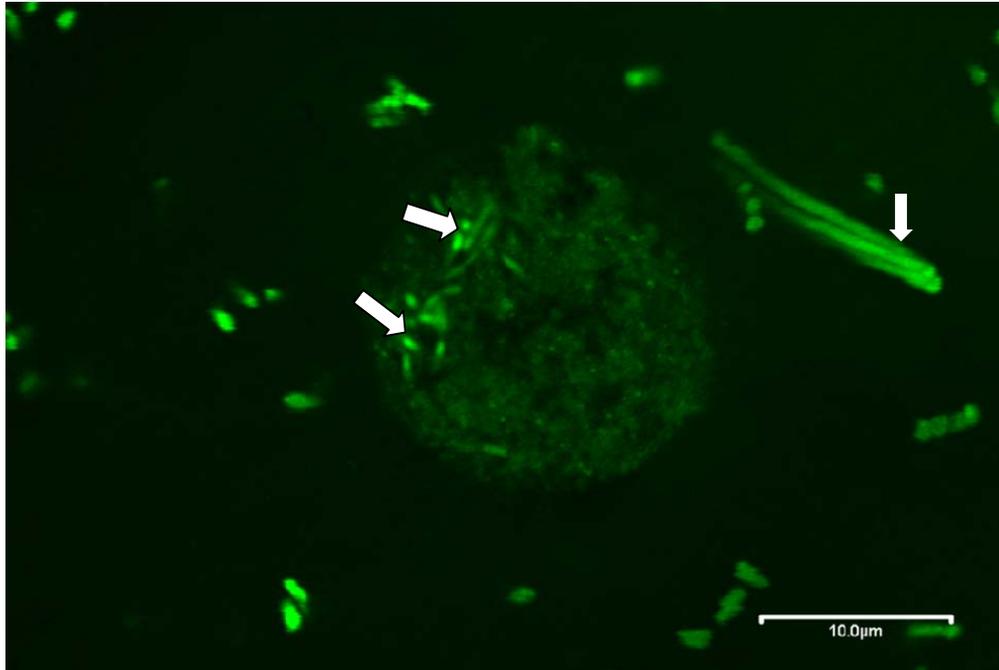


Figura 10. *E. coli* viable en el interior de dos pseudo-vacuolas de un trofozoito de *A. polyphaga* luego de 1 hora de co-incubación. Observada bajo el microscopio de fluorescencia a largo de onda de 490nm. Fuera del trofozoito se observan bacterias en movimiento mostrándose como líneas fluorescentes.

Se observó que a mayor tiempo de co-incubación entre amebas y bacterias mayor la cantidad de bacterias observadas en el interior de la ameba. No es posible precisar si esto se debe a la multiplicación de las bacterias que ya estaban en el interior de la ameba o a que la ameba continuaba ingiriendo bacterias del exterior. En un estudio similar, Barker et al., (1999) investigaron por 30 días si un lisado de trofozoitos de *A. polyphaga* podía servir como sustrato para mantener el crecimiento de *E. coli* O157 y encontraron que ésta creció rápidamente después de cuatro días de incubación a 25°C, aumentando el conteo de colonias por un ciclo logarítmico. En los próximos tres días el conteo de colonias disminuyó por 0.5 ciclos logarítmicos y luego se mantuvo constante por los próximos 28 días. Este estudio (Barker et. al., 1999) demostró que las bacterias pueden usar el sustrato contenido en el interior de la ameba para multiplicarse.

En este estudio observamos bacterias emitiendo fluorescencia roja en el interior de la ameba a partir de 6 horas de co-incubación, siendo la proporción de bacterias rojas similar tanto dentro como fuera de la ameba. Esto podría atribuirse a muerte normal de bacterias y no a que la ameba haya causado algún daño a la integridad de la membrana de éstas.

Para corroborar que las bacterias estaban ubicadas dentro del trofozoito de *A. polyphaga* y no sobre o debajo de éste, se tomó un video de fotos de cortes ópticos bajo el microscopio confocal de rayos láser. Con este estudio pudimos corroborar que la bacteria estaba en el interior de la ameba y no sobre o debajo de ésta.

Estudio de amebas de vida libre y ciliados presentes en agua de bebederos.

De cada uno de los tres bebederos de agua seleccionados para este estudio, se colectaron dos muestras de 100mL previo a agitar el agua y dos muestras de 100mL inmediatamente después de agitarla suavemente con una vara plástica previamente higienizada para un total de cuatro muestras por bebedero. La apariencia externa de las muestras de agua tomadas del agua de la superficie era clara y con poco precipitado, por lo general hierba; mientras que la apariencia externa de las muestras tomadas del fondo del bebedero era turbia e incluía hierba, tierra y pequeñas piedras. En ocasiones se observó limo, mosquitos y larvas.

Al examinar el agua de la parte superior de las muestras de agua de bebedero bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski, se observó ocasionalmente la presencia de protistas. Por lo general, sólo se observaba esporas de hongos, hifas, diatomeas y cianobacterias. El examen microscópico del agua del fondo de la muestra, mostraba mayor cantidad de protistas (5-6 por gota), junto a una cantidad mayor de precipitado. Esto representaba cierto grado de dificultad al tratar de identificar con claridad los protistas, ya que estos se mezclaban con el particulado. Al parecer los protistas, especialmente las amebas de vida libre, tienden a permanecer entre el particulado suspendido en el agua, por lo cual se hace difícil el estudio de su morfología y comportamiento en presencia de *E. coli*. La Figura 11 muestra una de las amebas de vida libre observada en una muestra de agua tomada de bebederos para ganado, mientras que las Figuras 12 y 13 muestran un invertebrado común, posiblemente Rotifera, observado en muestra de agua tomada de bebedero para ganado.

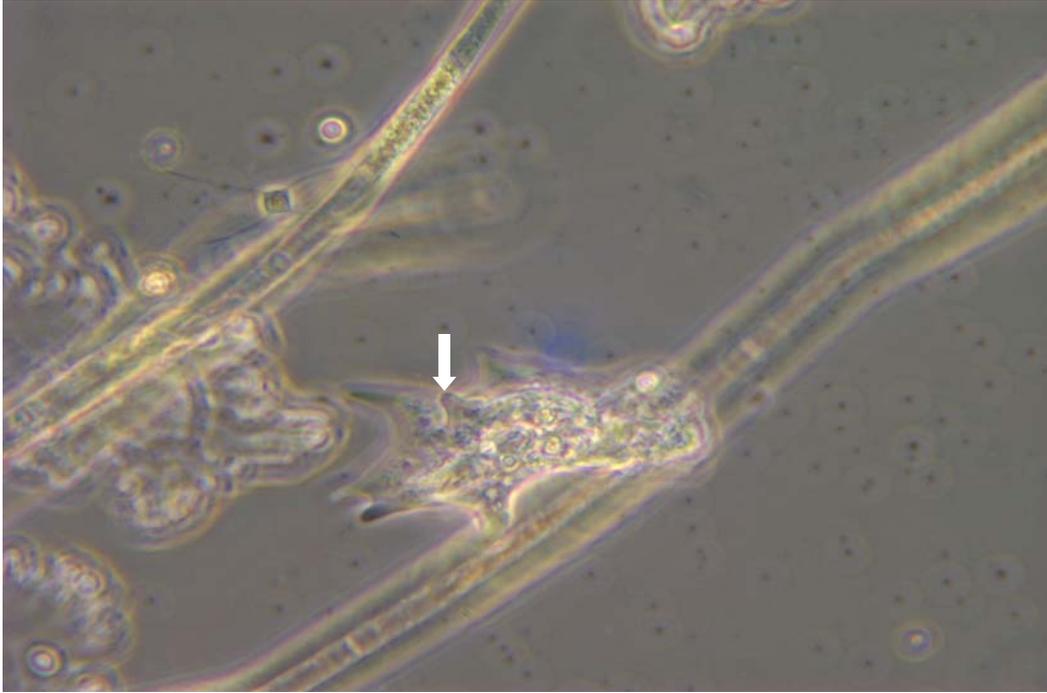


Figura 11. Ameba de vida libre observada en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.

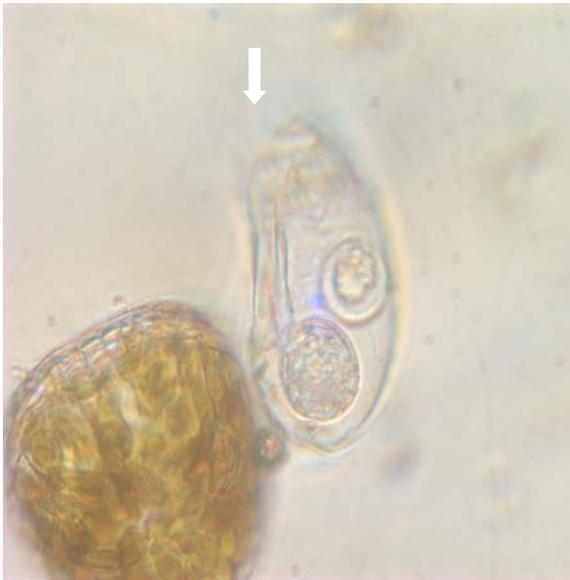


Figura 12. Invertebrado común, posiblemente Rotifera, observado en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.



Figura 13. Invertebrado común, posiblemente Rotifera, observado en muestra de agua tomada de bebedero para ganado. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.

La presencia de amebas y ciliados en una misma muestra de agua hace difícil trabajar con estos organismos. El movimiento del ciliado hace que la gota de agua esté en constante movimiento. Bajo estas condiciones, al tratar de observar una ameba en particular, el movimiento del agua hace que ésta se pierda de vista. El uso de Protoslow (Cole-Parmer) hacía la muestra viscosa y oscura, por ende difícil de examinar. Otra limitación al trabajar con estas muestras es el tiempo limitado con el que se puede trabajar con ellas debido a que la luz del microscopio incide directamente sobre la gota de agua causando evaporación y deshidratación.

Estudio de protistas presentes en muestras de líquido ruminal.

Las muestras tomadas del líquido ruminal de vacas lecheras mostraron una gran abundancia de protistas (12-15 organismos/campo de visión para 40x), en su mayoría ciliados. Estos se mantuvieron en constante movimiento por el medio, chocando unos con otros, haciendo imposible verlos con detenimiento. Otro factor que dificultó el trabajo con estas muestras es la gran cantidad de precipitado, esencialmente hierbas. Esto no permitió distinguir los tipos de protistas presentes en las muestras. Los protistas presentes en las muestras de líquido ruminal mueren (cesan su movimiento) una vez transcurridas de 8 a 10h de haberlas colectado. Esto limita el tiempo en que puedan usarse para estudios *in vivo*. La Figura 14 muestra el ciliado *Dasytricha ruminatium* Schuberg, 1888 observado en muestra de líquido ruminal.

Burow et al., (2005) estudiaron la interacción entre ciliados presentes en muestras tomadas del rumen de vacas y *E. coli*. Los ciliados utilizados en el estudio fueron primero cultivados *in vitro* en solución salina anaerobia, siguiendo el método descrito por Coleman (1987) y luego colocados en co-incubación con *E. coli* por 4h. Estos concluyeron que los ciliados del rumen aparentan no ingerir a *E. coli* cuando son co-incubados (Burow et. al., 2005).



Figura 14. Ciliado *Dasytricha ruminatium* Schuberg, 1888. Observado en muestra de líquido ruminal. Observado bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.

Co-incubación entre los protistas presentes en el líquido ruminal y *E. coli* teñida con el tinte LIVE/DEAD L-7012.

Para observar la posible interacción entre los protistas presentes en el líquido ruminal y *E. coli* previamente teñida, era necesario irradiar la muestra del líquido ruminal a largo de onda de 490nm. Esto tuvo como consecuencia el que todas las partículas del medio que tuviesen la capacidad de emitir fluorescencia a 490nm, lo hicieran. La Figura 15 presenta el ciliado del género *Ostracodinium* observado en muestras de líquido ruminal. La hierba, el interior de los protistas y el mismo líquido ruminal emiten fluorescencia a largo de onda de 490nm. Al co-incubar el ciliado *Ostracodinium* con *E. coli* previamente teñida con LIVE/DEAD L-7012, se observaba una gama de colores que dificultaba distinguir entre la bacteria añadida y las partículas del medio (Figura 16). Esto se debe a que el largo de onda de excitación/emisión de los componentes del tinte LIVE/DEAD L-7012 (SYTO9 a 480/500nm y yoduro de propidio a 490/635nm) es similar al largo de onda de excitación de la hierba, del interior de los ciliados y del mismo líquido ruminal. Esta situación imposibilitó el análisis de la posible interacción entre los protistas del rumen y *E. coli*.

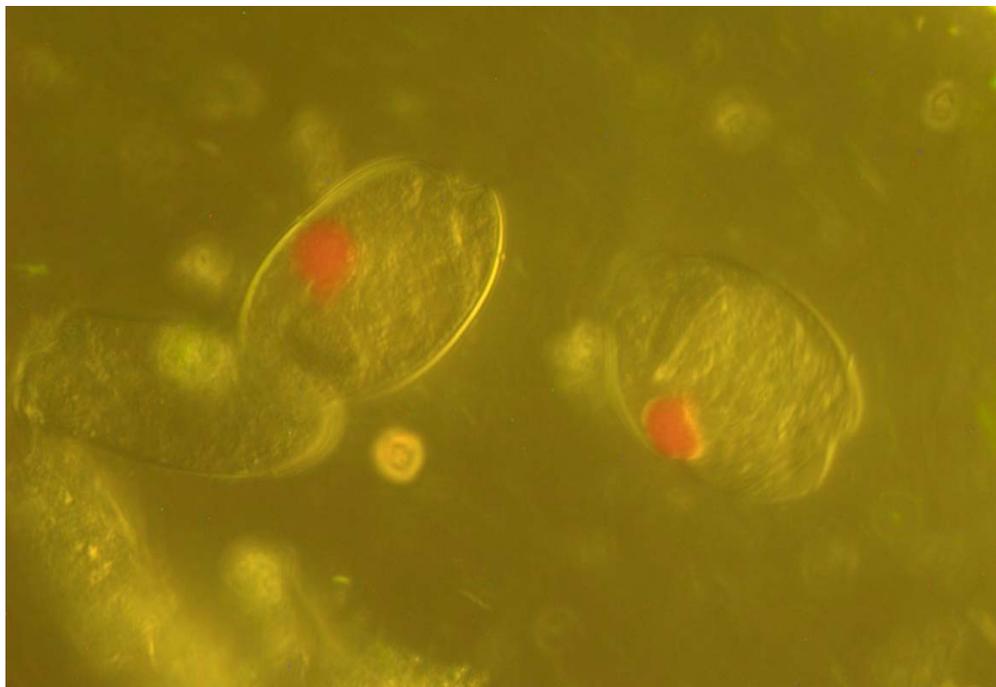


Figura 15. Ciliado del género *Ostracodinium* observado en muestra de líquido ruminal. La hierba, el interior de los protistas y el mismo líquido ruminal emiten fluorescencia. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a 490nm.

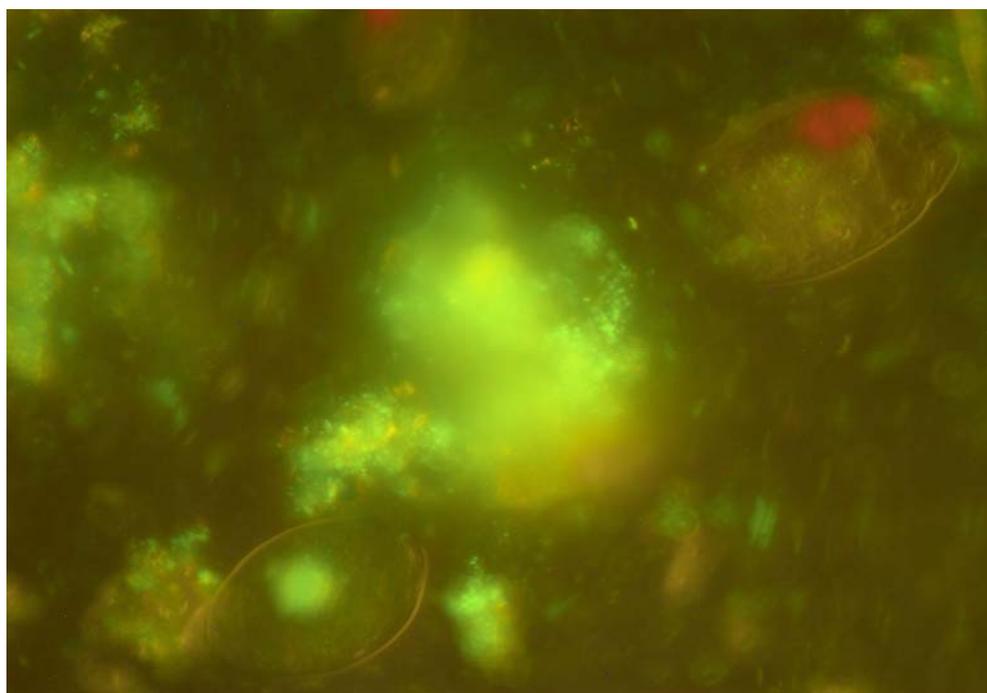


Figura 16. Ciliado del género *Ostracodinium* observado en muestra de líquido ruminal, co-incubado con *E. coli* previamente teñida con LIVE/DEAD L-7012. Muestra observada bajo el microscopio de fluorescencia a 490nm.

CONCLUSIÓN

La observación microscópica de muestras de agua colectadas en bebederos de agua para ganado de carne así como de muestras tomadas del líquido ruminal de vacas lecheras demuestra que éstos son una reserva de amebas desnudas y ciliados en la finca.

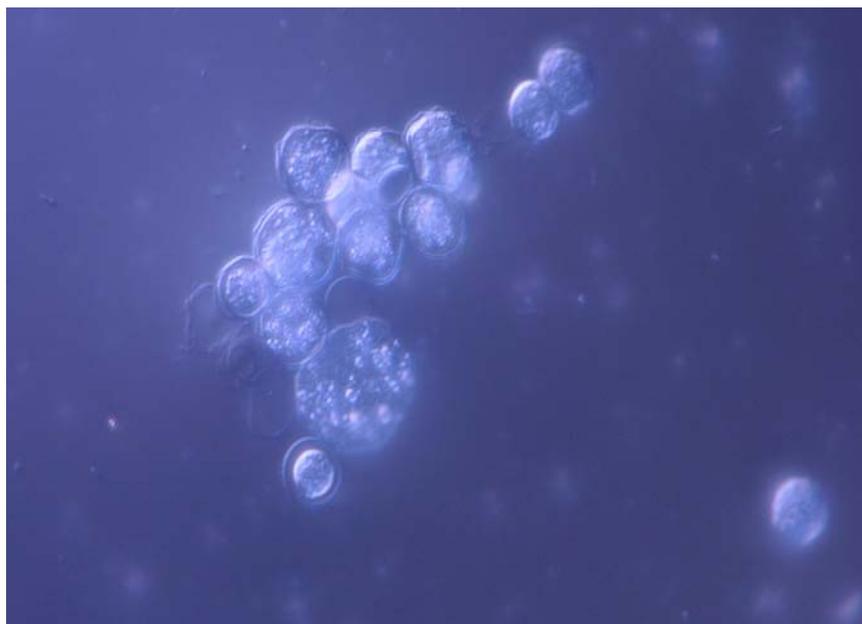
Al co-incubar trofozoitos de la ameba de vida libre *Acanthamoeba polyphaga* junto a la bacteria *Escherichia coli* previamente teñida con el tinte fluorescente LIVE/DEAD L-7012, se observó que la ameba *Acanthamoeba polyphaga* posee la capacidad de albergar en su interior a la bacteria sin causarle daño a la membrana celular de ésta. Además, se observó que a mayor tiempo de co-incubación entre estos organismos, mayor es la cantidad de bacterias vivas observadas en el interior de la ameba. Este estudio representa el primer informe escrito donde se demuestra por medio de microscopía confocal de rayos láser, la interacción entre *Escherichia coli* y la ameba desnuda *Acanthamoeba polyphaga*.

Este estudio demuestra que al ser los bebederos agua para ganado de carne y el líquido ruminal una reserva de amebas de vida libre y ciliados, éstos pudieran ser una fuente potencial de transmisión de *Escherichia coli* en la finca, incrementando la dificultad de controlar la dispersión de bacterias patógenas a los alimentos.

RECOMENDACIONES FUTURAS

1. Observar por más de 6 horas la interacción entre *E. coli* y *A. polyphaga* bajo el microscopio confocal de rayos láser.
2. Utilizar un tinte que permita demostrar la viabilidad de *E. coli* pero cuyo color de emisión sea distinto de verde o rojo.
3. Desarrollar una técnica para separar los protistas del precipitado sin causarles la muerte.
4. Desarrollar una técnica para observar las muestras de agua y de líquido ruminal por más tiempo bajo el microscopio confocal.
5. Desarrollar una técnica para poder estudiar las muestras de líquido ruminal en anaerobiosis bajo el microscopio confocal.

APÉNDICE DE FOTOS



Quietes y trofozoitos de *Acanthamoeba polyphaga* observados bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.



Quietes y trofozoitos de *Acanthamoeba polyphaga* observados bajo el microscopio de fluorescencia utilizando la técnica de Nomarski.



Protistas observados en muestra de líquido ruminal.

LITERATURA CITADA

Ahmed, N. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol. Rev. 30:564-595.

Alexander, M. 1981. Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and host. Annu. Rev. Microbiol. 35:113-133.

Axelsson, D., J. Waldenström, T. Broman, B. Olsen, and M. Holmberg. 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 71:987-992.

Barker, J., and M. R. W. Brown. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiol. 140:1253-1259.

Barker, J., T. J. Humphrey, and M. R. W. Brown. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. FEMS Microbiology Letters. 173:291-295.

Brown, M. R. W., A. W. Smith, J. Barker, T. J. Humphrey, and B. Dixon. 2002. *E.coli* O157 persistence in the environment. Microbiol. 148:1-2.

Burow, L. C., K. S. Gobius, B. A. Vanselow, and A. V. Klieve. 2005. A lack of predatory interaction between rumen ciliate protozoa and Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 40:117-122.

Centers for Disease Control and Prevention. 1994. Procedure for isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from stool specimens. Movie prepared by: Foodborne and diarrheal disease branch, Division of Bacterial and Mycotic Disease, National Center for Infectious Disease and Center for Disease Control and Prevention.

Centers for Disease Control and Prevention. 2003a. *Escherichia coli* O157:H7 general information. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g_sp.htm.

Centers for Disease Control and Prevention. 2003b. Preliminary foodnet data on the incidence of foodborne illnesses – selected sites, United States, 2002. MMWR. 52:340-343.

Costa, L., and J. A. Imlay. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183:7182–7189.

Dargatz, D. A., S. J. Wells, L. A. Thomas, D. D. Hancock, and L. P. Garber. 1997. Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in feces of feedlot cattle. J. Food Prot. 60:466–470.

Faith, N. G., J. A. Shere, R. Brosch, K. W. Arnold, S. E. Ansay, M.-S. Lee, J. B. Luchansky, and C. W. Kaspar. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1519-1525.

Feng, P., and S. D. Weagant. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Bacteriological Analytical Manual*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration.

Fujisawa, T., S. Sata, K. Aikawa, T. Takahashi, S. Yamai, and T. Shimada. 2000. Modification of sorbitol MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3117-3118.

Greub, G., and D. Raoult. 2002. Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoeba* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3076-3084.

Herriott, D. E., D. D. Hancock, E. D. Edel, L. V. Carpenter, D. H. Ric, and T. H. Besser. 1998. Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 61:802-807

Horn, M., and M. Wagner. 2004. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:509-514.

Hovde, C. J., P. R. Austin, K. A. Cloud, C. J. Williams, and C. W. Hunt. 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3233-3235.

Hussein, H. S., S. L. Lake, and T. P. Ringkob. 2001. Review: Cattle as a reservoir of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* including O157:H7-pre- and post-harvest control measures to assure beef safety. *Prof. Anim. Sci.* 17:1-16.

Jordan, D., and S. A. McEwen. 1998. Effect of duration of fasting and a short-term high-roughage ration on the concentration of *Escherichia coli* Biotype 1 in cattle feces. *J. Food Prot.* 61:531-534.

Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Microbiol.* 89:Special section: Microbial diversity.

King, C., E. B. Shotts, R. E. Wooley, and K. G. Porter. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3023-3033.

Kudva, I. T., P. G. Hatfield, and C. J. Hovde. 1995. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1363-1370.

- Kudva, I. T., C. W. Hunt, C. J. Williams, U. M. Nance, and C. J. Hovde. 1997. Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3878–3886.
- LeJeune, J., T. Besser, and D. Hancock. 2001a. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3053-3057.
- LeJeune, J., T. Besser, N. Merrill, D. Rice, and D. Hancock. 2001b. Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *J. Dairy Sci.* 84: 1856-1862.
- LeJeune, J., T. Besser, D. Rice, and D. D. Hancock. 2001c. Methods for the isolation of water-borne *Escherichia coli* O157. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:316-320.
- LeJeune, J. T., T. E. Besser, D. H. Rice, J. L. Berg, R. P. Stilborn, and D. D. Hancock. 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 377-384.
- Linder, M., J. Winiiecka-Krusnell, and E. Linder. 2002. Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2503-2508.
- Lynn, T. V., D. D. Hancock, T. E. Besser, J. H. Harrison, D. H. Rice, N. T. Stewart, and L. L. Rowan. 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J. Dairy Sci.* 81:1102–1108.
- Marciano, F., and G. Cabral. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:273-307.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and C. R. Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:67-85.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCraig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
- Müller, E. E., and M. M. Ehlers. 2005. Biolog identification of non-sorbitol fermenting bacteria isolated on *E.coli* O157 selective CT-SMAC agar. *Water SA.* 31:247-251.
- Muñoz, V., H. Reyes, P. Toche, C. Carcomo, and B. Gottlieb. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latinoam.* 56:106-111.

Nagaraja, T. G., G. Towne, and A. A. Beharka. 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2410-2414.

Rasmussen, M. A., W. Cray Jr., T. Casey, and S. C. Whipp. 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:79-84.

Rasmussen, M. A., S. Franklin, and S. Carlson. 2004. Predation survival in rumen protozoa enhances *Salmonella* virulence (abstract). Joint Annual Meeting of the American Dairy Science Association, American Society of Animal Science, Poultry Science Association. p.166.

Renter, D. G., J. M. Sargeant, R. D. Oberst, and M. Samadpour. 2003. Diversity, frequency, and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:542-547.

Santic', M. and Y. Abu-Kwaik. 2006. *Legionella pneumophila* can hijack the self-destruct system of macrophages. *Microbe.* 1:185-191.

Shere, J. A., C. W. Kaspar, K. J. Barlett, S. E. Linden, B. Norell, S. Francey, and D. M. Schaefer. 2002. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle housed in a confined environment following waterborne inoculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1947-1954.

Sibille I., T. Sime, L. Mathieu, and J. C. Block. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:197-202.

Stewart, C. S. 1999. Microbial interactions in the rumen and their potential impact in the survival of *Escherichia coli* O157. The rumen microbial ecosystem. *Microbial biosystems: New frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Thran, B. H., H. S. Hussein, D. Redelmen, and G. C. J. Fernández. 2003. Influence of pH treatments on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in continuous cultures of rumen contents. *Exp. Biol. Med.* 228:365-369.

Tkalcic, S., C. A. Brown, B. G. Harmon, A. V. Jain, E. P. O. Mueller, A. Parks, K. L. Jacobsen, S. A. Martin, T. Zhao, and M. P. Doyle. 2000. Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *J. Food Prot.* 63:1630-1636.

Turner, N.A., A. D. Russell, J. R. Furr, and D. Lloyd. 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 46: 27-34.

Weekers, P. H. H., P. L. E. Bodelier, J. P. H. Wijen, and G. D. Vogels. 1993. Effects of grazing by free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2317-2319.

Zhao, T., P. Zhao, J. W. West, J. K. Bernard, H. G. Cross, and M. P. Doyle. 2006. Inactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in rumen content- or feces-contaminated drinking water for cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3268-3273.