



Universidad de Valladolid

**PARÁMETROS CINÉTICOS DE *ESCHERICHIA COLI* EN
ZUMO COMERCIAL DE FRUTAS DEL BOSQUE**

Trabajo de Fin de Grado

Grado de Nutrición Humana y Dietética

Facultad de Medicina

Curso académico 2018/2019

Presentado por: Celia Álvarez Blanco

Tutorizado por: Emiliano José Quinto Fernández



Universidad de Valladolid

Dr. Emiliano José Quinto Fernández, Profesor Titular del Área de Nutrición y Bromatología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid,

Hace constar:

Que Dña. Celia Álvarez Blanco ha realizado, bajo su dirección, el Trabajo de Fin de Grado titulado “Parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumo comercial de frutas del bosque”, que presenta, tras su autorización, para optar al Grado en Nutrición Humana y Dietética.

Y, para que conste donde corresponda, firmo la presente en Valladolid a once de Junio de dos mil diecinueve.

Dr. Emiliano J. Quinto Fernández

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénicas

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógenas

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* hemorrágicas

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasivas

LT: Toxina termolábil

ST: Toxina termoestable

CFA: Factores de colonización

AAF: Fimbrias de adherencia y agregación

SHU: Síndrome hemolítico urémico

BMR: Bacterias multirresistentes

SP: Salud pública

GLASS: Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización Mundial de la Salud

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

EDA: Enfermedad diarreica aguda

UFC: Unidad formadora de colonias

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*)

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

BFP: Fimbrias formadoras de haces (*bundle-forming pilus*)

RESUMEN

Introducción. Los brotes producidos por *Escherichia coli* son un riesgo para la salud pública, siendo los zumos de frutas una fuente crítica de esta bacteria. Dado que la mencionada infección se puede prevenir gracias a unas buenas prácticas de manipulación, es importante conocer la etiopatogenia de esta enfermedad, así como su propagación y prevención. Además, es necesario conocer las definiciones y límites legales que regulan la presencia de *E. coli* en los zumos de frutas.

Objetivo. Estudiar el crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* en un zumo de frutas del bosque comercial a diferentes pH, presencia y ausencia de luz, presencia y ausencia de oxígeno y a diferentes temperaturas.

Material y métodos. De una parte, estudio descriptivo transversal, basado en una revisión bibliográfica sobre *E. coli* y el contexto legal de los zumos de frutas. Se excluyeron las investigaciones realizadas solamente sobre plantas, los brotes producidos por vehículos diferentes al agua y alimentos, y los artículos en idiomas diferentes al español, inglés, italiano y francés. De otra parte, estudio analítico. Se analizaron, utilizando para ello el programa ComBase, datos recogidos por el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, relativos al crecimiento de tres cepas de *E. coli* a diferentes condiciones de pH, luz, temperatura y oxígeno. Se compararon los resultados obtenidos entre sí y con la bibliografía correspondiente.

Resultados. El mayor tiempo de latencia observado correspondió a 20°C, pH 5, *E. coli* no patógeno, sin oxígeno y con luz; el mínimo, a 30°C, pH 7 y *E. coli* O157:H7 con oxígeno y con luz. La máxima velocidad de crecimiento alcanzada se observó a 37°C, pH 7, en *E. coli* O157:H7 con oxígeno y sin luz; la mínima, a 20°C, pH 3.09, en *E. coli* O157:H7 sin oxígeno y sin luz. En cuanto a la máxima población alcanzada por los microorganismos, el máximo fue observado a 37°C y pH 7, en *E. coli* no patógeno con oxígeno y con luz; y el mínimo a 20°C y pH 3.09, en *E. coli* no patógeno con oxígeno y sin luz.

Conclusiones. *E. coli* se adaptó más rápidamente en presencia de oxígeno. *E. coli* no patógeno fue la cepa que más tardó en adaptarse al medio. El crecimiento fue más rápido a pH 7. La máxima población alcanzada fue observada en presencia de luz. A 37°C, *E. coli* creció a la velocidad máxima y alcanzó la máxima población. A 20°C, se observaron el máximo tiempo de latencia y la mínima velocidad de crecimiento y

población alcanzada. *E. coli* se adaptó más lentamente al medio a temperaturas alejadas de sus óptimas, así como en ausencia de oxígeno. Creció más lentamente a temperaturas y pH alejados de sus óptimos; y cuando dichos parámetros se acercaron a su ideal, alcanzó la máxima población. Su crecimiento fue más rápido en presencia de oxígeno y alcanzó la máxima población en presencia de luz. Se adaptó relativamente rápido a pH ácidos. Es un importante riesgo para la salud pública; se debe tener en cuenta y realizar una prevención basada en la educación.

Palabras claves. *Escherichia coli*; *Escherichia coli* O157:H7; zumo de frutas; pH; oxígeno; luz; temperatura.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epidemiología e importancia en salud pública	4
1.2. Cómo se adhesiona <i>E. coli</i> , patogenicidad y factores de virulencia	5
1.3. Qué sintomatología causa <i>E. coli</i> O157:H7	7
1.4. Cómo se propaga <i>E. coli</i>	7
1.5. Prevención de la infección por <i>E. coli</i>	9
1.6. Diagnóstico y tratamiento de la infección por <i>E. coli</i> O157:H7	9
1.7. Zumos de frutas	9
1.8. Brotes producidos por <i>E. coli</i>	11
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Diseño	13
3.2. Metodología	13
3.3. Tratamiento de los datos	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Resultados a 37°C	15
4.2. Resultados a 30°C	17
4.3. Resultados a 20°C	19
4.4. Resultados a 20, 30 y 37°C	21
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES	26
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8. ANEXO	31
8.1. Gráficas correspondientes a los resultados obtenidos	31

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una enterobacteria Gram negativa, con forma bacilar, móvil (gracias a poseer flagelos peritricos), no esporógeno y anaerobia facultativa (es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, con producción de gas). Por ser Gram negativa, posee dos membranas y, entre ellas, un espacio periplásmico formado por péptido-glucano, que le confiere su forma y rigidez, gracias al cual puede soportar presiones osmóticas elevadas (Adams & Moss, 1997; Ahmad, Drew, Lagunoff, Pottinger, Reller & Sterling, 2017; De la Rosa, 1997).

Respecto a la temperatura, *E. coli* es una bacteria mesófila. *E. coli* productora de toxina Shiga es capaz de crecer a temperaturas entre 7-50°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento los 37°C. Un mantenimiento correcto de la cadena de frío evita el crecimiento de *E. coli*. La congelación no garantiza la inocuidad (ya que no elimina a *E. coli* en caso de que estuviera previamente presente en el alimento, sino que solo frena su crecimiento); sin embargo, temperaturas superiores a los 70°C, sí (pasteurizar la leche, zumos... garantiza eliminar a *E. coli*) (Adams & Moss, 1997; OMS, 2018a).

El tiempo de supervivencia (se contabiliza a partir de que se alcanza el máximo de población) de *E. coli* es mayor a temperatura de refrigeración que a temperatura ambiente. Esto es debido a que a temperaturas en torno a los 4-7°C, su crecimiento es prácticamente nulo. De esta forma, a dichas temperaturas, tarda mucho más tiempo en alcanzar el máximo de población, y su posterior fase de muerte (Adams & Moss, 1997).

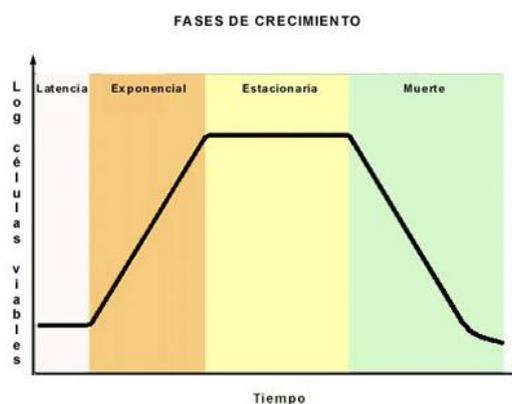


Figura 1. Gráfica de crecimiento bacteriano. Reproducida de Crecimiento bacteriano. Modelos predictivos de ComBase. Recuperado de

http://coli.usal.es/web/demo_alteracion/FactoresCrecimiento/FactoresCrecimiento.html

No solamente afecta la temperatura al crecimiento de *E. coli*, sino que el pH y la actividad de agua (a_w) son otros dos parámetros muy importantes a tener en cuenta.

El pH óptimo de crecimiento de *E. coli* es 7.2. Algunas cepas son capaces de proliferar en alimentos ácidos, incluso en pH de 4.4. Normalmente, un pH fuera del rango 3.8-9.5 detiene el crecimiento de *E. coli* (Adams & Moss, 1997; OMS, 2018a).

Su a_w óptima es 0.99. Algunas cepas son capaces de crecer en alimentos con una a_w de incluso 0.95; sin embargo, cuando este parámetro alcanza valores <0.94 , se detiene el crecimiento de *E. coli* (Adams & Moss, 1997; OMS, 2018a).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018a): “*E. coli* O157:H7 es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos”.

E. coli es una bacteria habitual en el intestino de las personas y de los animales sanos. Habitualmente, esta bacteria es responsable de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, además de contribuir en la síntesis de diversas vitaminas (vitaminas B y K). Solamente una minoría de cepas de *E. coli* es capaz de causar enfermedad en el hombre. La mayoría de los tipos de *E. coli* son inofensivas y no causan problemas, o éstos suponen solamente breves diarreas; sin embargo, existen variedades de esta bacteria que sí dañan seriamente la integridad física del ser humano (CDC, 2006; CDC, 2017; Foodsafety.gov, 2019; Mayo Clinic, 2019; MedlinePlus, 2019; OMS, 2018a).

Las variedades de *Escherichia coli* que producen gastroenteritis en el hombre se pueden encuadrar en cinco categorías. Se nombran en la tabla a continuación, clasificadas en función de la clínica que causan y de sus factores de patogenicidad:

<i>E. coli</i>	Mecanismo de acción	Clínica	Factores de virulencia	Población afectada
Enterotoxigénicas (ETEC)	Produce toxinas que activan la adenil-ciclasa y otros factores de permeabilidad	Diarrea acuosa.	Fimbrias, toxinas LT y ST, a veces asociadas a CFA.	Típico en niños en países en vías de desarrollo y viajeros.
Enteropatógenas (EPEC)	Adherencia al epitelio intestinal y destrucción de las microvellosidades. El enterocito pierde su capacidad de absorción.	Diarrea acuosa.	Adherencia-acortamiento microvellosidades..	Niños en países en vías de desarrollo y niños <2 años (frecuentes brotes en guarderías).
Enteroagregativas (EAEC)	Biofilm que recubre el epitelio, borrado de microvellosidades.	Diarrea acuosa.	Fimbrias (AAF y Bfp), enterotoxina (EAST-1), ¿otras toxinas?	Niños y adultos de países en vías de desarrollo.
Enterohemorrágicas (EHEC) *Aquí se incluye el serotipo O157: H7	Produce una toxina con efecto citotóxico.	Diarrea acuosa. Colitis hemorrágica (SHU).	Fimbrias, citotoxinas (VT-1 o VT-2). *Toxina Shiga.	Países desarrollados.
Enteroinvasivas (EIEC)	Coloniza y destruye la mucosa intestinal, el epitelio del colon.	Diarrea invasiva (disentería).	Plásmido (genes codifican proteínas de invasión).	Países desarrollados y en vías de desarrollo.

Tabla 1. Categorías principales de *E. coli* que producen gastroenteritis en el hombre.

Nota: ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénicas. EPEC: *Escherichia coli* enteropatógenas. EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa. EHEC: *Escherichia coli* hemorrágicas. EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasivas. LT: toxina termolábil. ST: toxina termoestable. CFA: factores de colonización. AAF: Fimbrias de adherencia y agregación. SHU: síndrome hemolítico urémico

(Álvarez, Buesa, Castillo & Vila, 2008; Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cárdenas & Vargas-Remolina, 2016; Sack, 2011).

Entre ellas, se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Causa una clínica variada, pudiendo ocasionar desde una leve diarrea hasta una colitis hemorrágica (es una enfermedad aguda, causada por el serotipo O157: H7), que puede evolucionar hacia un síndrome hemolítico urémico (SHU) (Kaper & O'Brien, 2014) (se da en el 10% de los casos, y presenta una tasa de mortalidad del 5-10%) en niños y ancianos, o hacia una púrpura trombocitopénica en adultos (es un trastorno de la sangre que causa formación de coágulos de sangre en los pequeños vasos) (Foodsafety.gov, 2019; OMS, 2018a; Wasey & Salen, 2019).

El principal serotipo de estas EHEC es el O157: H7, el cual puede causar fuertes calambres abdominales, diarrea con sangre, náuseas, vómitos... (Álvarez, et al., 2008; CDC, 2006; Mayo Clinic, 2019) e incluso fallo renal y muerte; todo ello como consecuencia de la producción de grandes cantidades de toxina (“Shiga”) que daña severamente la mucosa intestinal. Se puede considerar como la causa más importante de colitis hemorrágica en humanos (Foodsafety.gov, 2019; Wasey & Salen, 2019).

La diferencia entre la diarrea acuosa y la invasiva consiste en que, aunque ambas presentan heces frecuentes y líquidas, en el segundo caso son de menor volumen y contienen pus, sangre y moco. Se conoce como “enteritis por *E. coli*” a la inflamación del intestino delgado provocada por la bacteria *Escherichia coli*. Es la causa más común de la diarrea del viajero (Álvarez, et al., 2008).

1.1. Epidemiología e importancia en salud pública

ETEC es la causa bacteriana más común de diarrea aguda en los niños de países en vías de desarrollo, y una de las más comunes de diarrea del viajero (en personas que visitan los países en vías de desarrollo) (Sack, 2011).

“EHEC es responsable de enfermedades gastrointestinales reportadas en numerosos brotes en todo el mundo” (Parsons, Zelyas, Berenger & Chui, 2016)

La incidencia de la sepsis de aparición temprana (EOS) por *E. coli* es una importante causa de morbi y mortalidad en recién nacidos, sobre todo en aquellos prematuros de bajo peso al nacer. Además, esta incidencia está en aumento en todos los grupos de edad, así como las cepas resistentes de *E. coli*, con altas tasas de farmacoresistencia a los antibióticos de primera línea (ampicilina y gentamicina) (Mendoza-Palomar, et al., 2017).

Según la OMS (2018b), los niveles de resistencia de algunas bacterias a ciertos antibióticos son elevados, tanto en países con altos como con bajos ingresos. Entre las bacterias resistentes más frecuentes se encuentra *E. coli*. Además, se observó que un 8-65% de las muestras de dicha bacteria presentan resistencia a uno de los antibióticos usado frecuentemente para tratar las infecciones que causa. En el informe del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS (GLASS, por sus siglas en inglés) se ve la gravedad de la situación de

farmacorresistencia en todo el mundo, teniendo resistencia a antibióticos algunas de las infecciones más frecuentes y peligrosas (OMS, 2018b).

España es el país en cabeza en cuanto a consumo de antibióticos sin motivo justificado, y uno de los primeros de Europa en infecciones por bacterias multirresistentes (BMR).

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) tras realizar un estudio epidemiológico, junto a la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH), la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH), el Foro Español de Pacientes (FEP) y la Alianza General de Pacientes (AGP), ha afirmado que cada año, las BMR causan alrededor de 35000 muertes (cifra 30 veces superior a la de muertes causadas por accidentes de tráfico) (IM Médico Hospitalario, 2018).

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha publicado una herramienta interactiva que permite ver los datos de resistencias a antibióticos relativos a 2017 en la Unión Europea (AECOSAN, 2019).

(Farfán-García, et al., 2016):

“La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema de salud pública mundial, especialmente en los países en vía de desarrollo y es una de las causas de mortalidad en niños bajo cinco años de edad. Los agentes etiológicos de EDA incluyen virus, bacterias y parásitos, en ese orden. Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* está clasificada como uno de los principales agentes diarregénicos (...)

1.2. Cómo se adhiere *E. coli*, patogenicidad y factores de virulencia

Gracias a poseer fimbrias formadoras de haces (BFP: *bundle-forming pilus*), *E. coli* es capaz de fijarse específicamente a los receptores celulares presentes en las células epiteliales del intestino, gracias a una proteína de la membrana externa: la intimina. Esta intimina de la bacteria se une a los receptores “Tir” (receptor traslocador de intimina; es un dímero) del epitelio intestinal, formando así complejos que adhieren a la bacteria a dicho epitelio. Debido al gran tamaño de *E. coli*, acaban formándose muchas de estas uniones, confiriendo así una fuerte adherencia (Farfán-García, et al., 2016).

En cuanto a su patogenicidad, diversas cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedad en el hombre. Son una importante causa de enfermedades diarreicas en los países en vías de desarrollo, donde suponen una morbilidad y mortalidad continuas e inaceptables.

Continúan siendo inciertos los datos sobre los nuevos factores de virulencia, la carga global de la enfermedad aguda y la contribución de *E. coli* y/o sus toxinas a la morbilidad no diarreica (Fleckenstein & Kuhlmann, 2019).

E. coli presenta diversos factores de virulencia (Adams & Moss, 1997; Ahmad, et al., 2017; De la Rosa, 1997; Farfán-García, et al., 2016):

- Adhesinas
 - Pili tipo 1 (manosa sensibles)
 - Factores de colonización: CFA I, CFA II, CFA III
 - Fimbrias de adherencia y agregación: AAF I, AAF III
 - Fimbrias formadoras de haces: BFP
 - Pili P
 - Fimbrias Dr
- Toxinas
 - Toxinas Shiga: STX1, STX2
 - Toxinas termoestables: STa, STb
 - Toxinas termolábiles: LT I, LT II
 - Hemolisinas
- Quelantes de hierro

La patogenicidad de las diferentes cepas de *E. coli* está determinada por sus antígenos superficiales y por las toxinas que generan (Farfán-García, et al., 2016). Como se ha visto anteriormente, las fimbrias confieren a *E. coli* la capacidad de adherirse a los enterocitos de la mucosa intestinal. Los antígenos O y K tienen propiedades antifagocitarias e inhiben las sustancias bactericidas del suero; son responsables de la virulencia de las cepas invasivas. Presentan una endotoxina ligada al lipopolisacárido, que es el responsable de la fiebre y seguramente también de las alteraciones vasculares producidas en las infecciones generalizadas. Algunas cepas son capaces de producir exotoxinas, que causan diarreas. Se sabe que existe una enterotoxina termolábil (LT) y casi idéntica a la toxina del cólera, y una enterotoxina estable (ST), un polipéptido de bajo peso molecular.

Son típicas de las *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), causando una enfermedad grave similar al cólera y siendo la causa bacteriana más común de diarrea aguda en niños de los países en vías de desarrollo y la causa más común de diarrea del viajero. Por el contrario, las *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), se caracterizan por su capacidad de entrar en las células de la mucosa intestinal, por un mecanismo parecido al utilizado por *Shigella*.

Algunas *E. coli* enteropatógenas (EPEC) sintetizan enterotoxinas similares a las producidas por *Shigella dysenteriae*, que dañan directamente el epitelio intestinal, destruyendo las microvellosidades y produciendo diarrea (Farfán-García, et al., 2016).

1.3. Qué sintomatología causa *E. coli* O157:H7

Tras un período de incubación de unas 24-72 h, comienza un dolor abdominal acompañado de una diarrea intensa, normalmente sanguinolenta. No suele transcurrir con fiebre (y en caso de aparecer, ésta es muy leve) ni con vómitos. La enfermedad suele remitir espontáneamente en 5-10 días, sin complicaciones ni secuelas. Sin embargo, en algunos casos, especialmente en niños pequeños (donde es la causa más común de insuficiencia renal aguda) y ancianos, puede derivar en el síndrome urémico hemolítico (SHU) (Foodsafety.gov, 2019). El SHU es un trastorno producido como consecuencia de la toxina “Shiga” (o verotoxina) producida por *E. coli* O157:H7, la cual destruye los glóbulos rojos, provocando daño renal e incluso la muerte, especialmente si se trata de un paciente inmunodeprimido. Las personas con este problema tienen anemia hemolítica (recuento bajo de glóbulos rojos), trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas) e insuficiencia renal (daño renal). Este problema se presenta tras 5-10 días del inicio de la diarrea. El SHU puede requerir cuidados intensivos, diálisis y transfusiones (Wasey & Salen, 2019).

1.4. Cómo se propaga *E. coli*

E. coli se propaga cuando se producen contaminaciones de los alimentos destinados al consumo humano; cuando una persona consume un alimento infectado con *E. coli*, se contagia. La principal fuente de infección de esta bacteria es la carne de ganado vacuno, incluso si visualmente presenta aspecto normal; especialmente si es carne picada o si no se cocina lo suficiente. También puede transmitirse a través de la leche

no pasteurizada ni esterilizada (*E. coli* es capaz de vivir en las ubres de las vacas), de productos lácteos o continentes de mayonesa que hayan estado mucho tiempo fuera del frigorífico, pescados, ostras, huevos mal cocidos... Otra posible fuente de contaminación son los vegetales crudos regados con aguas contaminadas o que hayan contactado con heces de animales infectados o que se hayan lavado con agua contaminada. Como vemos, el agua es otro medio de propagación de *E. coli*, así como las manos de personas que no se laven adecuadamente tras ir al baño, pudiendo de esta forma contaminar con la mencionada bacteria objetos, a otras personas, alimentos... (CDC, 2006; OMS, 2018a).

Según la Clínica de Mayo (2019), *Escherichia coli* es capaz de afectar a cualquier persona expuesta a ella. Sin embargo, existen determinados factores de riesgo que predisponen a ello:

- EDAD: los niños pequeños y los ancianos presentan un mayor riesgo de infección, así como de presentar complicaciones derivadas de la misma (CDC, 2006).
- INMUNODEPRIMIDOS: tener un sistema inmune debilitado (como consecuencia de inmunosupresores, ser enfermo de SIDA...) predispone a la infección.
- COMER DETERMINADOS ALIMENTOS, tales como hamburguesas medio crudas; leche, sidra...sin pasteurizar, quesos blancos elaborados a partir de leche cruda...
- ÉPOCA DEL AÑO: la infección suele ser más frecuente entre junio y septiembre (debido a que la temperatura ambiente es mayor, se produce movimiento de viajeros...).
- DISMINUCIÓN DEL ÁCIDO DEL ESTÓMAGO: la acidez protege en parte de *E. coli*.

(Mayo Clinic, 2019)

1.5. Prevención de la infección por *E. coli*

Es posible prevenir dicha infección, gracias a seguir una serie de pautas, tales como no beber leche ni zumos no pasteurizados, lavarse adecuadamente las manos tras ir al baño, cocinar la carne picada a $>70^{\circ}\text{C}$, separar la carne cruda del resto de alimentos, no tragar agua de piscinas, lagos... lavar correctamente las frutas y verduras que vayan a consumirse en crudo, beber agua de fuentes seguras... Es imprescindible realizar una correcta manipulación de los alimentos (CDC, 2006; CDC, 2017; Mayo Clinic, 2019; OMS, 2018a).

1.6. Diagnóstico y tratamiento de la infección por *E. coli* O157:H7

El diagnóstico se lleva a cabo tras realizar un cultivo de heces (CDC, 2006). El tratamiento de esta infección busca controlar los síntomas de la infección (deshidratación, alteraciones electrolíticas producidas como consecuencia de la diarrea...) y los problemas en renales en caso de que aparecieran (Wasey & Salen, 2019). No se suele recurrir a antibióticos para tratar una infección por *E. coli* O157:H7 ya que su uso se asocia con una mayor tasa de SHU (Wong, et al., 2012).

1.7. Zumos de frutas

Se reconoce como zumo de frutas, según el BOE:

El producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede. Se podrán reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta. En el caso de los cítricos, el zumo de frutas procederá del endocarpio. No obstante, el zumo de lima podrá obtenerse a partir del fruto entero. Cuando los zumos se obtengan a partir de frutas que incluyan pepitas, semillas y pieles, no se incorporarán en el zumo partes o componentes de las pepitas, las semillas o la piel. La presente disposición no se aplicará a los casos en que las partes o los componentes de las pepitas, las semillas o la piel no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación. Se autoriza la mezcla

de zumos de frutas y de puré de frutas en la producción del zumo de frutas. (Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre de 2013, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.)

Se define criterio microbiológico como “criterio que define la aceptabilidad de un producto o lote de productos alimenticios o un proceso basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.” (REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.)

Categoría de comida	Microorganismos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Etapa donde se aplica el criterio	Acción en caso de resultados no satisfactorios
		n	c	m	M			
Zumos de frutas y verduras no pasteurizados (preparados para comer)	<i>E. coli</i>	5	2	100 UFC/g	1000 UFC/g	ISO 16649-1 o 2	Proceso de manufactura.	Mejoras en la higiene de la producción, selección de materias primas.

Tabla 2. Límites para *E. coli* en zumos de frutas.

Nota: UFC: unidad formadora de colonias. Método analítico de referencia: se utilizará la edición más reciente de la norma. n: número de unidades de que se compone la muestra. c: número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M. m: valor umbral del número de bacterias. M: valor límite del número de bacterias. Interpretación de los resultados de la prueba: los límites dados se refieren a cada unidad de muestra analizada. Los resultados de la prueba demuestran la calidad microbiológica del proceso probado. *E. coli* en zumos de frutas y verduras sin pasteurizar (listas para comer): satisfactorio (si todos los valores observados son $\leq m$) / aceptable (si un máximo de valores c/n está entre m y M, y el resto de los valores observados son $\leq m$) / insatisfactorio (si uno o más de los valores observados son $>M$ o más los valores de c/n están entre m y M).

Traducido de: Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on *microbiological criteria for foodstuffs*. L 322/12. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1441/oj>

La OMS (2018a) ofrece controles sobre la presencia de *E. coli* productora de toxina Shiga en los alimentos. La Comisión del Codex Alimentarius utiliza estas evaluaciones como base para redactar normas, directrices y recomendaciones internacionales sobre los diferentes alimentos.

Además, la OMS (2018a) promueve buenas prácticas de manipulación de alimentos.

1.8. Brotes producidos por *E. coli*

A continuación se muestran los brotes y las consecuencias producidos por *E. coli* en EEUU, a través de agua y alimentos, obtenidos de la base de datos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2018).

Nº de brotes	643
Nº de enfermos	14080
Nº hospitalizaciones	2308
Nº muertes	40

Tabla 3. Brotes producidos por *E. coli* en EEUU a través de agua y alimentos.

Nota: Los datos de brotes de transmisión alimentaria se proporcionan para los años 1998-2017; el resto de tipos de brotes para 2009-2017. Los gráficos del tablero de NORS (National Outbreak Reporting System) muestran un recuento de "0" para los años cuyos datos no se incluyen en los datos de NORS; este valor no significa necesariamente que no se produjeran brotes o no se reportaran antes de 2009.

Recuperado y traducido de (CDC, 2018).

Cabe destacar además que los brotes fueron más frecuentes en el mes de julio, seguido por los meses de septiembre, agosto y junio (CDC, 2018).

De los datos presentados en la tabla previa, una parte considerable se asoció al consumo de zumo de manzana en EEUU. Se muestran los datos a continuación.

Nº de brotes	29
Nº de enfermos	352
Nº hospitalizaciones	52
Nº muertes	1

Tabla 4. Brotes producidos por *E. coli* en EEUU asociados a la ingesta de zumo de manzana.

Nota: Datos proporcionados para los años 2009-2017. Los gráficos del tablero de NORS (National Outbreak Reporting System) muestran un recuento de "0" para los años cuyos datos no se incluyen en los datos de NORS; este valor no significa necesariamente que no se produjeran brotes o no se reportaran antes de 2009. Recuperado y traducido de (CDC, 2018).

Los brotes reportados en asociación al consumo de zumo de manzana fueron mucho más frecuentes en el año 2011; la única muerte reportada se produjo en noviembre de 2010. El número de brotes, enfermos y hospitalizados fue mucho mayor en los meses de junio y julio (CDC, 2018).

2. OBJETIVO

- Estudiar el crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* en un zumo de frutas del bosque comercial a diferentes pH, presencia y ausencia de luz, presencia y ausencia de oxígeno y a diferentes temperaturas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño

El diseño de este Trabajo de Fin de Grado se estructuró en dos partes.

Por un lado, se realizó un estudio descriptivo transversal, basado en una revisión bibliográfica, sobre la bacteria *Escherichia coli* (su importancia en salud pública, patogenicidad, factores de virulencia y propagación, además de describir la sintomatología causada por su infección, prevención, diagnóstico y tratamiento), y sobre los zumos de frutas (definición legal y establecimiento de límites a cumplir en base a los criterios microbiológicos).

Por otra parte, se realizó un estudio analítico. Se estudiaron tres cepas de bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*: *E. coli* no patógeno CECT 516 (EC), *E. coli* O157:H7 CECT 4076 (ECO1) y *E. coli* O157:H7 CECT 4267 (ECO2)). Para ello, se trabajó con datos que fueron obtenidos previamente en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, relativos al crecimiento de estas cepas en diferentes condiciones de pH, luz, oxígeno y temperatura. Dichos datos fueron introducidos de forma manual en el programa de software de hoja de cálculo Excel.

3.2. Metodología

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica, se aplicaron varios criterios de inclusión y exclusión:

- Se incluyeron artículos científicos, además de informes de organismos oficiales y reglamentaciones legales vigentes en la actualidad sobre los temas mencionados previamente respecto a *E. coli* y los zumos de frutas.
- Se excluyó la información relativa a investigaciones realizadas solamente sobre plantas, a brotes producidos por vehículos diferentes al agua y alimentos, además de los artículos en idiomas diferentes al español, inglés, italiano y francés.

Para la revisión bibliográfica, los datos se obtuvieron a partir de una búsqueda en Internet en diferentes bases de datos (MEDLINE, PubMed, GOOGLE Académico...), empleando términos libres y vocabulario controlado en inglés y español. También se

consultaron publicaciones de organismos oficiales (OMS, AECOSAN, CDC...), libros de texto, revistas científicas electrónicas y textos legales (BOE...).

3.3. Tratamiento de los datos

De los artículos encontrados, se seleccionaron aquellos considerados pertinentes para el estudio.

El programa elegido para analizar los datos del laboratorio fue ComBase. Este programa consta de una amplia base de datos con miles de curvas de crecimiento y supervivencia microbiana, recogidos en centros de investigación y publicaciones. Además, permite establecer determinadas variables y a partir de ellas predecir el crecimiento o la inactivación de los microorganismos. En esta ocasión, se utilizó el programa Online DMFit (incluido dentro del navegador ComBase) y se fueron introduciendo los datos de tiempo (en horas) y concentración de *E. coli* (en logaritmo del número de bacterias), para las diferentes condiciones de pH, luz y temperatura.

El programa transformó dichos datos en gráficas, además de calcular a partir de ellas los valores de las variables objeto de estudio:

- Coeficiente de determinación (R^2): varía entre 0 y 1, habiendo mayor ajuste del modelo a la variable cuanto más se aproxime el valor a 1. Se busca que sea lo más próximo a 1 posible.
- *SE of Fit* (SE): error estándar. Se busca que sea lo menor posible.
- *Initial value* (N_0): población inicial del cultivo. Se expresará como log UFC/ml.
- *Lag/shoulder* (Lag): tiempo de latencia; es decir, el tiempo que tarda la bacteria en comenzar su crecimiento exponencial. Se expresará en horas (h).
- *Maximum Rate* (Rate): velocidad máxima alcanzada. Se expresará en h^{-1} .
- *Final Value* (Max): población máxima alcanzada. Se expresará como log UFC/ml.

Se recogieron los valores obtenidos de estos parámetros para cada gráfica (con sus condiciones ambientales concretas) y se compararon entre sí y con la bibliografía correspondiente.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados a 37°C

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R²	0.926	0.915	0.952	0.689	0.921	0.916	0.870	0.999	0.843	0.999	0.886	0.907
SE	0.106	0.096	0.144	0.086	0.137	0.119	0.225	0.024	0.321	0.023	0.229	0.222
N₀	7.768	7.634	7.564	7.559	7.721	7.729	7.665	7.749	7.474	7.562	7.700	7.692
Lag	1.173	2.788	0.625	0.887	0.856	0.940	1.132	1.034	-	1.927	0.544	0.742
Rate	0.333	0.352	0.384	0.087	0.337	0.250	0.402	0.421	0.479	0.915	0.434	0.578
Max	8.629	8.472	9.298	7.864	8.916	8.658	9.894	9.449	9.452	9.656	9.397	9.359

Tabla 5 . Valores para *E. coli* a 37°C y pH 7.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R²	0.962	0.136	0.182	0.906	0.920	0.295	0.774	0.945	0.955	0.915	0.962	1.000
SE	0.096	0.243	0.069	0.053	0.087	0.219	0.139	0.089	0.069	0.052	0.059	0.003
N₀	7.815	7.629	7.682	7.806	7.747	7.897	7.722	7.693	7.809	7.559	7.762	7.739
Lag	2.152	0.872	-	0.646	1.942	1.712	0.988	3.542	2.541	0.707	2.078	2.639
Rate	0.416	0.114	-0.024	0.099	0.240	0.150	0.420	0.633	0.313	0.105	0.52	0.206
Max	9.043	8.160	7.597	8.278	8.519	8.522	8.317	8.622	8.623	8.010	8.351	8.419

Tabla 6 . Valores para *E. coli* a 37°C y pH 5.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R²	0.695	0.979	0.793	0.933	0.992	0.986	0.894	0.986	0.899	0.951	0.848	0.974
SE	0.046	0.008	0.018	0.012	0.002	0.005	0.023	0.010	0.008	0.003	0.023	0.006
N₀	7.621	7.629	7.616	7.608	7.797	7.802	7.637	7.573	7.667	7.667	7.817	7.763
Lag	0.488	2.934	-	-	0.496	1.915	1.993	0.906	2.608	0.381	2.409	-
Rate	0.044	0.098	0.022	0.023	0.018	0.064	0.055	0.105	0.025	0.008	0.053	0.024
Max	7.798	7.736	7.715	7.733	7.860	7.893	7.783	7.746	7.722	7.700	7.937	7.856

Tabla 7 . Valores para *E. coli* a 37°C y pH 3.09.

Para 37°C y un pH de 7, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC sin oxígeno ni luz, con un valor de 2.788 h (R^2 : 0.915, y SE: 0.096); por el contrario, el menor correspondió a ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 0.544 h (R^2 : 0.886, y SE: 0.229). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.915 h⁻¹ (R^2 : 0.999, y SE: 0.023), en ECO1 con oxígeno y sin luz; y el menor fue 0.087 h⁻¹ (R^2 : 0.689, y SE: 0.086), en ECO1 sin oxígeno ni luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en EC con oxígeno y con luz, con un valor de 9.894 log UFC/ml (R^2 : 0.870, y SE: 0.225); y el mínimo correspondió a ECO1 sin oxígeno y sin luz, con un valor de 7.864 log UFC/ml (R^2 : 0.689, y SE: 0.086).

Para 37°C y un pH de 5, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC con oxígeno sin luz, con un valor de 3.542 h (R^2 : 0.945, y SE: 0.089); por el contrario, el menor correspondió a ECO1 sin oxígeno ni luz, con un valor de 0.646 h (R^2 : 0.906, y SE: 0.053). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.633 h⁻¹ (R^2 : 0.945, y SE: 0.089), en EC con oxígeno y sin luz; y el menor fue -0.024 h⁻¹ (R^2 : 0.182, y SE: 0.069), en ECO1 sin oxígeno y con luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en EC sin oxígeno y con luz, con un valor de 9.043 log UFC/ml (R^2 : 0.962, y SE: 0.096); y el mínimo correspondió a ECO1 sin oxígeno y con luz, con un valor de 7.597 log UFC/ml (R^2 : 0.182, y SE: 0.069).

Para 37°C y un pH de 3.09, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC sin oxígeno ni luz, con un valor de 2.934 h (R^2 : 0.979, y SE: 0.008); por el contrario, el menor correspondió a ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 0.381 h (R^2 : 0.951, y SE: 0.003). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.105 h⁻¹ (R^2 : 0.986, y SE: 0.010), en EC con oxígeno y sin luz; y el menor fue 0.008 h⁻¹ (R^2 : 0.951, y SE: 0.003), en ECO1 con oxígeno y sin luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 7.937 log UFC/ml (R^2 : 0.848, y SE: 0.023); y el mínimo correspondió a ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 7.700 log UFC/ml (R^2 : 0.951, y SE: 0.003).

4.2. Resultados a 30°C

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.906	0.953	0.905	0.951	0.870	0.876	0.945	0.917	0.892	0.976	0.957	0.969
SE	0.048	0.015	0.039	0.054	0.046	0.058	0.067	0.091	0.108	0.068	0.074	0.069
N ₀	7.689	7.584	7.577	7.571	7.810	7.826	7.623	7.749	7.648	7.617	7.727	7.798
Lag	0.970	1.287	1.475	1.554	2.693	2.735	0.907	3.826	1.866	1.611	0.363	1.888
Rate	0.095	0.060	0.087	0.174	0.129	0.170	0.175	0.656	0.495	0.441	0.201	0.633
Max	8.111	7.736	7.892	8.038	8.105	8.206	8.362	8.519	8.296	8.552	8.687	8.570

Tabla 8 . Valores para *E. coli* a 30°C y pH 7.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.822	0.650	1.000	0.738	0.905	0.987	0.884	0.955	0.937	0.982	0.989	0.978
SE	0.014	0.034	0.001	0.055	0.034	0.008	0.115	0.033	0.073	0.050	0.040	0.049
N ₀	7.564	7.557	7.655	7.654	7.826	7.817	7.655	7.618	7.601	7.616	7.778	7.763
Lag	-	-	2.499	-	2.215	-	1.553	1.721	1.254	0.674	1.929	0.711
Rate	0.032	0.116	0.165	0.204	0.093	0.168	0.233	0.113	0.191	0.218	0.370	0.202
Max	7.642	7.683	7.853	7.902	8.067	7.985	8.441	7.974	8.332	8.926	8.607	8.764

Tabla 9 . Valores para *E. coli* a 30°C y pH 5.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.549	0.316	0.140	0.071	0.237	0.810	0.195	0.753	0.286	0.181	0.222	0.399
SE	0.041	0.060	0.039	0.042	0.049	0.013	0.029	0.023	0.074	0.104	0.064	0.028
N ₀	7.586	7.635	7.700	7.749	7.820	7.865	7.663	7.684	7.664	7.783	7.747	7.786
Lag	2.014	-	1.998	-	1.558	-	-	-	-	2.053	-	-
Rate	0.008	0.019	0.023	-0.017	0.031	-0.053	0.018	-0.068	0.018	-0.073	0.040	0.014
Max	7.597	7.693	7.787	7.690	7.911	7.794	7.721	7.577	7.751	7.615	7.877	7.861

Tabla 10 . Valores para *E. coli* a 30°C y pH 3.09.

Para 30°C y un pH de 7, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC con oxígeno y sin luz, con un valor de 3.826 h (R^2 : 0.917, y SE: 0.091); por el contrario, el menor correspondió a ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 0.363 h (R^2 : 0.957, y SE: 0.074). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.656 h⁻¹ (R^2 : 0.917, y SE: 0.091), en EC con oxígeno y sin luz; y el menor fue 0.060 h⁻¹ (R^2 : 0.953, y SE: 0.015), en EC sin oxígeno y sin luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 8.687 log UFC/ml (R^2 : 0.957, y SE: 0.074); y el mínimo correspondió a EC sin oxígeno ni luz, con un valor de 7.736 log UFC/ml (R^2 : 0.953, y SE: 0.015).

Para 30°C y un pH de 5, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en ECO1 sin oxígeno y con luz, con un valor de 2.499 h (R^2 : 1.000, y SE: 0.001); por el contrario, el menor correspondió a ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 0.674 h (R^2 : 0.982, y SE: 0.050). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.370 h⁻¹ (R^2 : 0.989, y SE: 0.040), en ECO2 con oxígeno y con luz; y el menor fue 0.032 h⁻¹ (R^2 : 0.822, y SE: 0.014), en EC sin oxígeno y con luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 8.926 log UFC/ml (R^2 : 0.982, y SE: 0.050); y el mínimo correspondió a EC sin oxígeno y con luz, con un valor de 7.642 log UFC/ml (R^2 : 0.822, y SE: 0.014).

Para 30°C y un pH de 3.09, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 2.053 h (R^2 : 0.181, y SE: 0.104); por el contrario, el menor correspondió a ECO2 sin oxígeno y con luz, con un valor de 1.558 h (R^2 : 0.237, y SE: 0.049). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.040 h⁻¹ (R^2 : 0.222, y SE: 0.064), en ECO2 con oxígeno y con luz; y el menor fue -0.073 h⁻¹ (R^2 : 0.181, y SE: 0.104), en ECO1 con oxígeno y sin luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO2 sin oxígeno y con luz, con un valor de 7.911 log UFC/ml (R^2 : 0.237, y SE: 0.049); y el mínimo correspondió a EC con oxígeno y sin luz, con un valor de 7.577 log UFC/ml (R^2 : 0.753, y SE: 0.023).

4.3. Resultados a 20°C

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.620	0.987	0.997	0.987	0.919	0.862	0.985	0.910	0.922	0.815	0.999	0.986
SE	0.025	0.010	0.010	0.017	0.032	0.041	0.005	0.022	0.052	0.087	0.004	0.013
N ₀	7.570	7.572	7.758	7.697	7.803	7.863	7.607	7.625	7.700	7.726	7.814	7.801
Lag	1.322	0.528	3.880	2.776	1.721	3.719	4.096	0.803	3.852	2.955	3.701	2.151
Rate	0.077	0.049	0.415	0.169	0.083	0.207	0.115	0.043	0.397	0.225	0.263	0.090
Max	7.647	7.802	8.223	8.111	8.100	8.1282	7.712	7.820	8.156	8.223	8.156	8.062

Tabla 11 . Valores para *E. coli* a 20°C y pH 7.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.654	0.858	0.082	0.936	0.348	0.903	0.013	0.995	0.092	0.953	0.964	0.989
SE	0.028	0.030	0.090	0.023	0.042	0.008	0.053	0.006	0.035	0.030	0.001	0.004
N ₀	7.581	7.616	7.602	7.618	7.754	7.787	7.588	7.643	7.629	7.693	7.816	7.821
Lag	4.216	3.847	-	2.598	-	1.623	-	3.198	-	3.829	3.788	3.426
Rate	0.131	0.162	0.026	0.089	0.019	0.018	0.012	0.114	-0.006	0.285	0.005	0.062
Max	7.684	7.802	7.855	7.837	7.904	7.850	7.718	7.850	7.613	8.027	7.823	7.919

Tabla 12 . Valores para *E. coli* a 20°C y pH 5.

	EC (sin O2)		ECO1 (sin O2)		ECO2 (sin O2)		EC (con O2)		ECO1 (con O2)		ECO2 (con O2)	
	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ	LUZ	SIN LUZ
R ²	0.325	0.164	0.484	0.064	0.635	0.812	0.682	0.124	0.611	0.432	0.919	0.944
SE	0.060	0.063	0.052	0.056	0.043	0.022	0.034	0.076	0.032	0.065	0.014	0.012
N ₀	7.696	7.695	7.714	7.743	7.903	7.875	7.684	7.720	7.724	7.739	7.876	7.870
Lag	1.867	-	1.662	-	1.124	4.074	2.168	-	-	3.015	0.405	3.430
Rate	-0.046	-0.008	-0.046	-0.011	-0.042	-0.126	-0.089	-0.012	-0.036	-0.088	-0.087	-0.077
Max	7.578	7.583	7.580	7.624	7.778	7.758	7.571	7.563	7.615	7.591	7.765	7.750

Tabla 13 . Valores para *E. coli* a 20°C y pH 3.09.

*Nota: EC: *E. coli* no patógeno CECT 516. ECO1: *E. coli* O157:H7 CECT 4076. ECO2: *E. coli* O157:H7 CECT 4267.

Para 20°C y un pH de 7, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC con oxígeno y con luz, con un valor de 4.096 h (R^2 : 0.985, y SE: 0.005); por el contrario, el menor correspondió a EC sin oxígeno ni luz, con un valor de 0.528 h (R^2 : 0.987, y SE: 0.010). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.415 h⁻¹ (R^2 : 0.997, y SE: 0.010), en ECO1 sin oxígeno y con luz; y el menor fue 0.043 h⁻¹ (R^2 : 0.910, y SE: 0.022), en EC con oxígeno y sin luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado, con igual valor (8.223 log UFC/ml), en ECO1 sin oxígeno y con luz (R^2 : 0.997, y SE: 0.010) y en ECO1 con oxígeno y sin luz (R^2 : 0.815, y SE: 0.087); y el mínimo correspondió a EC sin oxígeno y con luz, con un valor de 7.647 log UFC/ml (R^2 : 0.620, y SE: 0.025).

Para 20°C y un pH de 5, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en EC sin oxígeno y con luz, con un valor de 4.216 h (R^2 : 0.654, y SE: 0.028); por el contrario, el menor correspondió a ECO2 sin oxígeno ni luz, con un valor de 1.623 h (R^2 : 0.903, y SE: 0.008). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue 0.285 h⁻¹ (R^2 : 0.953, y SE: 0.030), en ECO1 con oxígeno y sin luz; y el menor fue -0.006 h⁻¹ (R^2 : 0.092, y SE: 0.035), en ECO1 con oxígeno y con luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO1 con oxígeno y sin luz, con un valor de 8.027 log UFC/ml (R^2 : 0.957, y SE: 0.030); y el mínimo correspondió a ECO1 con oxígeno y con luz, con un valor de 7.613 log UFC/ml (R^2 : 0.092, y SE: 0.035).

Para 20°C y un pH de 3.09, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue en ECO2 sin oxígeno ni luz, con un valor de 4.074 h (R^2 : 0.812, y SE: 0.022); por el contrario, el menor correspondió a ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 0.405 h (R^2 : 0.919, y SE: 0.014). El valor máximo observado para la velocidad máxima alcanzada (Rate) fue -0.008 h⁻¹ (R^2 : 0.164, y SE: 0.063), en EC sin oxígeno ni luz; y el menor fue -0.126 h⁻¹ (R^2 : 0.812, y SE: 0.022), en ECO2 sin oxígeno ni luz. Con respecto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado en ECO2 sin oxígeno y con luz, con un valor de 7.778 log UFC/ml (R^2 : 0.635, y SE: 0.043); y el mínimo correspondió a EC con oxígeno y sin luz, con un valor de 7.563 log UFC/ml (R^2 : 0.124, y SE: 0.076).

4.4. Resultados a 20, 30 y 37°C

En el Anexo se pueden observar las representaciones gráficas correspondientes a los resultados presentados en las tablas mostradas previamente.

Cabe mencionar que aparecen algunas velocidades máximas alcanzadas (Rate) negativas. Esto es debido a que en aquellas curvas de *E. coli* se produjo decrecimiento en lugar de crecimiento. Ejemplo de ello es ECO1 a 37°C y pH 5, sin oxígeno y con luz, que comienza el estudio con una población inicial (N_0) de 7.682 log UFC/ml y lo acaba con una población de 7.597 log UFC/ml, presentando así un Rate negativo (-0.024 h⁻¹).

En todo el estudio, el mayor tiempo de latencia (Lag) observado fue 4.216 h, correspondiente a 20°C, un pH de 5 y a EC sin oxígeno y con luz; sin embargo, el mínimo correspondió a una temperatura de 30°C, un pH de 7 y a ECO2 con oxígeno y con luz, con un valor de 0.363h. La máxima velocidad (Rate) alcanzada fue 0.915 h⁻¹, a 37°C, en un pH de 7 y en ECO1 con oxígeno y sin luz; por el contrario, la mínima correspondió a 20°C, pH 3.09, ECO2 sin oxígeno y sin luz, con un valor de -0.126 h⁻¹. En cuanto a la máxima población alcanzada (Max), el máximo fue observado a 37°C y pH 7, en EC con oxígeno y con luz, con un valor de 9.894 log UFC/ml; sin embargo, el mínimo fue 7.563 log UFC/ml, valor que fue observado a 20°C y pH 3.09, en EC con oxígeno y sin luz.

5. DISCUSIÓN

Analizando los resultados obtenidos, se ha detectado que los mínimos valores del tiempo de latencia (Lag) observados para cada temperatura correspondieron a condiciones en presencia de oxígeno. Estos resultados se entienden conociendo que, como se ha dicho anteriormente, *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa, es decir, es capaz de desarrollar un metabolismo tanto aerobio (en presencia de oxígeno) como fermentativo (en ausencia de oxígeno); sin embargo, parece tardar menos tiempo en adaptarse al medio en presencia de oxígeno, lo cual explica que se reduzcan los tiempos de latencia.

Además, se ha visto que los máximos valores para el tiempo de latencia (Lag) fueron observados en EC, así como ninguno de los mínimos, para todas las temperaturas estudiadas. De tal forma, se ve que esta cepa de *E. coli* parece tardar más que las otras dos cepas en adaptarse al medio; aunque no ha mostrado ninguno de los mínimos de velocidad (Rate) en este estudio, lo cual indica que, una vez adaptada, crece más rápido.

El máximo tiempo de latencia (Lag) fue observado a 20°C, pH 5, sin oxígeno y con luz. El mínimo, a 30°C, pH 7, en presencia de oxígeno y de luz. Lo esperable hubiera sido encontrar el máximo a un pH de 3.09 (por ser el estudiado más alejado de su óptimo) y el mínimo a 37°C (por ser la temperatura óptima de *E. coli*). Por el contrario, sí es lógico haber encontrado una adaptación más lenta al medio (un mayor Lag) a 20°C y en ausencia de oxígeno.

No parece que la presencia o ausencia de luz condicione la fase de latencia.

Sorprendentemente, ninguno de los máximos tiempos de latencia (Lag) para cada temperatura fueron a pH 3.09. Era esperable que, al pH más alejado de su óptimo, tardara más en adaptarse al medio, pero no fue así. Además, dos de los tres mínimos tiempos de latencia (Lag) observados se registraron a dicho pH. Parece ser que *E. coli* se adapta relativamente rápido a pH ácidos.

En cuanto al ritmo de crecimiento, todas las máximas velocidades (Rate) observadas para cada temperatura, y ninguna de las mínimas, fueron a pH 7. Esto se explica conociendo que el pH óptimo de crecimiento de *E. coli* es 7.2, siendo 7 el pH estudiado más próximo a su óptimo. Concuerdan los resultados observados con la

teoría: El crecimiento es más rápido cuanto más próxima se encuentra a sus condiciones óptimas.

La máxima velocidad (Rate) fue observada a 37°C, pH 7, en presencia de oxígeno y sin luz. La mínima, a 20°C, pH 3.09, en ausencia de oxígeno y de luz. Como se ve, a la temperatura y pH estudiados más alejados de sus óptimos, *E. coli* crece a una menor velocidad. En cuanto al resto de condiciones estudiadas, parece ser que crece más rápido en presencia de oxígeno y que la presencia o ausencia de luz no condiciona su velocidad de crecimiento.

Por otro lado, la máxima población alcanzada (Max) correspondió a 37°C, pH 7, en presencia de oxígeno y de luz. La mínima, a 20°C, un pH de 3.09, en presencia de oxígeno y en ausencia de luz. Se aprecia que, en las condiciones de temperatura y pH más próximos a los óptimos de *E. coli*, se observa la máxima población alcanzada, así como la mínima se registra cuando dichos parámetros están lo más alejados del óptimo. En cuanto a la atmósfera, aunque lo esperable hubiera sido registrar la mínima población alcanzada en ausencia de oxígeno, correspondió, junto a la máxima, a una situación con oxígeno presente. Además, parece ser que *E. coli* es capaz de alcanzar una mayor población en presencia de luz.

Como cabía esperar, ninguna de las mínimas poblaciones alcanzadas se dio a pH 7, ni ninguna de las máximas a pH 3.09.

Como se puede observar en las tablas de resultados, faltan algunos valores para el tiempo de latencia (Lag). Esto es debido a que el programa ComBase no tuvo suficientes datos para los puntos de la curva en esa fase de latencia del crecimiento, lo cual sería subsanable repitiendo el mismo experimento en el laboratorio tomando más puntos de muestreo en aquellas fases del crecimiento.

Hasta donde conocemos, no existe bibliografía sobre el comportamiento de estas cepas de *E. coli* en zumo de frutas del bosque, lo cual no permite la comparación con los resultados obtenidos por otros estudios. Sin embargo, durante la búsqueda bibliográfica realizada se han encontrado estudios relativos al crecimiento de *E. coli* en otros zumos de frutas ácidas, sobre todo en zumos de manzanas, en los cuales se observaron las relaciones detalladas a continuación.

En el tratamiento del zumo de manzana con ozono a diferentes pH, se observó, para los pH estudiados, una reducción en el tiempo de tratamiento con ozono a medida que disminuye el pH. El mínimo tiempo de tratamiento requerido fue observado para el pH

más bajo estudiado (pH de 3) (Patil, Valdramidis, Cullen, Frias & Boruke, 2010). Parece ser también que *E. coli* pierde su resistencia a las altas presiones en zumos de frutas con alto contenido de ácido (Li, Pan, Xie, Yang, Zhou & Zhu, 2012). Dichos resultados concuerdan con la observación en nuestro trabajo de que todas las máximas velocidades de crecimiento observadas para cada temperatura fueran a pH 7 y con que el pH óptimo de crecimiento de *E. coli* sea 7.2. Además, el pH ácido del zumo de manzana parece aumentar los efectos antibacterianos del ácido caprílico presente (Kim & Rhee, 2015). Son varios los artículos encontrados que estudian el tratamiento de zumo de manzana con ozono gaseoso combinado con un bajo pH, lo cual parece conseguir un gran efecto antimicrobiano (Patil, et al., 2010; Song, Shin, Ryu & Kang, 2015).

Como se ha visto anteriormente, *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa que presenta una adaptación al medio más rápida cuando se encuentra en presencia de oxígeno. Parece ser también que al combinar la aplicación de altas presiones hidrostáticas con CO₂ se aumenta la inactivación de *E. coli* (Li, et al., 2012).

También se encontraron estudios en zumo de manzana que combinan el tratamiento con calor con el tratamiento con ozono (Song, Sung & Kang, 2015) o con aceites esenciales de cítricos (Espina, Somolinos, Ouazzou, Condón, García-Gonzalo & Pagán, 2012; Espina, Somolinos, Pagán & García-Gonzalo, 2010). Se observó que al combinar el calor con alguno de los tratamientos mencionados se reduce la temperatura necesaria a alcanzar para inactivar *E. coli* O157:H7 o el tiempo en el que se consigue dicha inactivación.

Por último, otra investigación probó la combinación de nuevas tecnologías no térmicas (luz ultravioleta, pulsos de luz de alta intensidad, campos eléctricos pulsados...) como tratamiento para inactivar *E. coli* en zumo de manzana y arándanos y vio que podría ser exitoso (Palgan, et al., 2011).

Serían convenientes futuras líneas de investigación de *E. coli* en zumo de frutas del bosque en diferentes condiciones ambientales tal y como existen para otros zumos de frutas ácidas, como las analizadas en los trabajos previamente mencionados.

La finalidad de este trabajo es estudiar el crecimiento de diversas cepas de *E. coli* en diferentes condiciones de temperatura, luz, oxígeno y pH, en un zumo de frutas del bosque comercial. Como se ha visto, *E. coli* es capaz de sobrevivir y proliferar incluso en condiciones lejanas a sus óptimas, lo cual implica un riesgo para la salud pública,

especialmente si no se garantiza el cumplimiento de los límites establecidos por los criterios microbiológicos.

Además, como se ha visto en el apartado 1.8. de este mismo trabajo, seguimos presenciando brotes a consecuencia de *E. coli*, una parte relevante de los mismos debidos a la ingesta de zumo de manzana, zumo con características similares al estudiado en este trabajo.

El hecho de que sigamos presenciando dichos brotes reafirma la idea del zumo de frutas como fuente crítica de *E. coli* (Tadesse, Gidey, Workelule, Hailu, Gidey, Bsrat & Taddele, 2018). Por otra parte, pone en evidencia la necesidad de monitorizar estrictamente, además de promover medidas higiénicas adecuadas en todos los niveles de la cadena alimenticia, informar y educar a la población general sobre buenas prácticas de manipulación de alimentos.

Según la OMS (2018a):

“Las medidas de prevención de la infección por *E. coli* O157:H7 son similares a las recomendadas para otras enfermedades transmitidas por los alimentos. Las prácticas básicas de buena higiene de los alimentos, descritas en las *Cinco claves para la inocuidad de los alimentos* que ha establecido la OMS, pueden prevenir la transmisión de los agentes patógenos responsables de muchas enfermedades transmitidas por los alimentos, y también protegen contra las enfermedades de ese tipo causadas por *E. coli* productora de toxina Shiga.”

Dentro de las cinco claves mencionadas se encuentran el mantenimiento de la limpieza, la separación de alimentos crudos y cocinados, el cocinado completo, el mantenimiento de los alimentos a temperaturas seguras y el uso de agua y materias primas seguras (OMS, 2018a).

Así, es muy importante llevar a cabo una prevención basada en la educación, además de una coordinación, colaboración e intercambio de información a nivel mundial en determinadas situaciones, siguiendo el Reglamento Sanitario Internacional y la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) (OMS, 2018a).

6. CONCLUSIONES

- *E. coli* se adaptó más rápidamente al medio en presencia de oxígeno, mostrando así una menor fase de latencia.
- *E. coli* no patógeno fue la cepa estudiada que más tardó en adaptarse al medio, mostrando los máximos tiempos de latencia para todas las temperaturas; sin embargo, una vez adaptada, no presentó ninguno de los mínimos valores de velocidad de crecimiento.
- A pH 7, *E. coli* creció más rápidamente.
- La luz no condicionó ni el tiempo de latencia ni la velocidad de crecimiento, pero *E. coli* alcanzó el máximo de población en presencia de luz.
- Las máximas velocidades y poblaciones alcanzadas se observaron a 37°C, temperatura coincidente con la óptima de *E. coli*. Por el contrario, a la temperatura estudiada más alejada de su óptima (20°C), se observaron el máximo tiempo de latencia y la mínima velocidad y población máxima alcanzada. Esto se explica porque a esta temperatura *E. coli* se adapta más lentamente al medio y además presenta un ritmo de crecimiento menor una vez adaptada.
- Al alejarse de sus óptimos de temperatura y no tener oxígeno, *E. coli* se adaptó más lentamente al medio. Además, creció más lentamente a temperaturas y pH alejados de sus óptimos; por otro lado, cuando dichos parámetros se acercaron a su ideal, *E. coli* alcanzó la máxima población. Creció más rápidamente en presencia de oxígeno y alcanzó la máxima población en presencia de luz.
- *E. coli* se adaptó relativamente rápido a pH ácidos.
- *E. coli* es un importante riesgo para la salud pública, especialmente si no se cumplen los límites establecidos por los criterios microbiológicos. Se siguen presenciando brotes por *E. coli*, siendo los zumos de frutas una fuente crítica.
- Es necesario llevar a cabo una prevención basada en la educación, así como monitorizar estrictamente toda la cadena alimenticia para garantizar el cumplimiento de dichos criterios.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.R., & Moss, M.O (1997). *Microbiología de los alimentos*. Capítulo 7: 7.7 *Escherichia coli*. pp. 227-233. ISBN-84-200-0830-3. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2019). Herramienta interactiva para la visualización de los datos de antibiorresistencias correspondientes a 2017 en la Unión Europea. Recuperado de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2019/herramienta_interactiva.htm
- Ahmad, N., Drew, W.L., Lagunoff, M., Pottinger, P., Reller, L.B., & Sterling, C.R. (2017). En: Ryan, K.J., & Ray, C.G.; Editores. *Sherris Microbiología Médica*. Parte III: Bacterias patógenas. Capítulo 21: Bacterias. Conceptos básicos. pp. 305-306. Capítulo 33: Enterobacterias. pp. 489-500. 6ª ed. ISBN-978-607-15-1412-7. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- Álvarez, M., Buesa, J., Castillo, J., & Vila, J. (2008). En: Cercenado, E., Cantón, R.; Editores. *Procedimientos en Microbiología clínica*. Capítulo 30: Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. ISBN-978-84-612-7852-7. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- CDC (2017). Prevent Shiga Toxin-Producing *E. coli* Infection. Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/ecoli-prevention.html>
- CDC (2018). National Outbreak Reporting System. Recuperado de <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (2006). Enfermedades causadas por *E. coli*. Recuperado de https://www.cdc.gov/ecoli/es/qa_ecoli_sickness.htm
- De la Rosa, M. (1997). *Microbiología. Enfermería – Ciencias de la salud. Conceptos y Aplicaciones*. Capítulo 10: BACILOS GRAMNEGATIVOS. 10.1.3. *Escherichia coli*. pp. 96-99. ISBN-84-8174-248-1. Madrid, España: HARCOURT BRACE, S.A.
- Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A.A., Condón, S., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2012). *Int J Food Microbiol.* 159(1):9-16. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906601>

- Espina, L., Somolinos M., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2010). Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *J Food Prot.* 73(12):2189-96. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219735>
- Farfán-García, A.E., Ariza-Rojas, S.C., Vargas-Cárdenas, F.A., & Vargas-Remolina, L.V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev chil infestol. (online)*, 33(4): 438-50. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n4/art09.pdf>
- Fleckenstein, J.M., & Kuhlmann, F.M. (2019). Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections. *Curr Infect Dis Rep*, 21(3):9. Abstract. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11908-019-0665-x>
- Foodsafety.gov (2019). *E. coli*. Recuperado de <https://espanol.foodsafety.gov/intoxicaci%C3%B3n/causas/bacteriasvirus/ecoli/2g59/>
- IM Médico Hospitalario (2018). Las bacterias multirresistentes provocan más de 35.000 muertes cada año. Recuperado de <https://www.immedicohospitalario.es/noticia/14056/las-bacterias-multirresistentes-provocan-mas-de-35000-muertes-cada-a>
- Kaper, J.B., & O'Brien, A.D. (2014). Overview and Historical Perspectives. *Microbiol Spectr.*, 2(6). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290666/>
- Kim, S.A., & Rhee, M.S. (2015). Use of caprylic acid to control pathogens (*Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*) in apple juice at mild heat temperatura. *J Appl Microbiol.* 119(5):1317-23. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26257401>
- Li, W., Pan, J., Xie, H., Yang, Y., Zhou, D., & Zhu, Z. (2012). Pasteurization of fruit juices of different pH values by combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide. *J Food Prot.* 75(10):1873-7. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043841>
- Mayo Clinic (2019). *E. coli*. Recuperado de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>
- MedlinePlus (2019). *Infecciones por Escherichia coli*. Recuperado de <https://medlineplus.gov/spanish/ecoliinfections.html>
- Mendoza-Palomar, N., Balasch-Carulla, M., González-Fi Lauro, S., Céspedes, M.C., Andreu, A., Frick, M.A... & Soler-Palain, P. (2017). *Escherichia coli* early-

- onset sepsis: trends over two decades. *Eur J Pediatr.*, 176(9): 1227-34. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28770413>
- OMS (2018a). *E. coli*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
 - OMS (2018b). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. [Comunicado de prensa]. Recuperado de <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
 - Palgan, I., Caminiti, I.M., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P. Morgan, D.J...Lyng, J.G. (2011). Combined effect of selected non-thermal technologies on *Escherichia coli* and *Pichia fermentans* inactivation in an apple and cranberry juice blend and on product shelf life. *Int J Food Microbiol.* 151(1):1-6. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893360>
 - Parsons, B.D., Zelyas, N., Berenger, B.M., & Chui, L. (2016). Detection, Characterization, and Typing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.*, 7: 478. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828450/>
 - Patil, S., Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Frias, J., & Boruke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiol.* 27(6):835-40. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630327>
 - Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre de 2013, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. *Boletín Oficial del Estado*, 245, de 12 de octubre de 2013, 83298. Recuperado de <https://www.boe.es/boe/dias/2013/10/12/pdfs/BOE-A-2013-10611.pdf>
 - REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. L 338/1-26. Recuperado de <https://www.boe.es/doue/2005/338/L00001-00026.pdf>
 - Sack, R.B. (2011). The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian J Med Res.*, 133(2), 171–180. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3089048/>

- Song, W.J., Shin, J.Y., Ryu, S., & Kang, D.H. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment. *J Appl Microbiol.* 119(2):465-74. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033289>
- Song, W.J., Sung, H.J., & Kang, D.H. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in apple juices with different soluble solids content by combining ozone treatment with mild heat. *J Appl Microbiol.* 118(1):112-22. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346257>
- Tadesse, H.A., Gidey, N.B., Workelule, K., Hailu, H., Gidey, S., Bsrat, A., & Taddele, H. (2018). Antimicrobial Resistance Profile of *E. coli* Isolated from Raw Cow Milk and Fresh Fruit Juice in Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Vet Med Int.* (Publicado online). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884018/>
- Wasey, A., & Salen, P. (2019). *Escherichia Coli* (*E Coli* O157 H7). *StatPearls (Internet)*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507845/>
- Wong C.S., Mooney J.C., Brandt J.R., Staples A.O., Jelacic S., Boster D.R... & Tarr P.I. (2012). Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157: H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis.* 55(1):33-41. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431799>

8. ANEXO

8.1. Gráficas correspondientes a los resultados obtenidos.

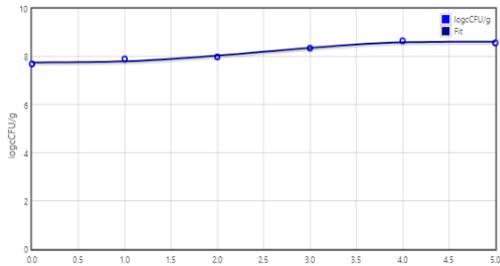


Figura 2. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

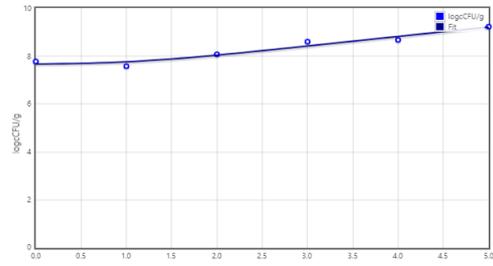


Figura 5. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

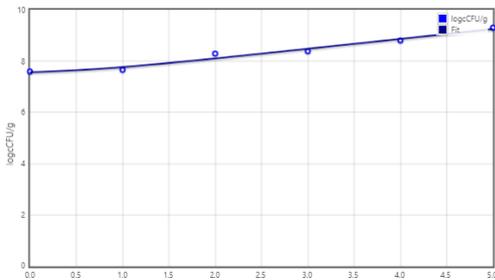


Figura 3. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

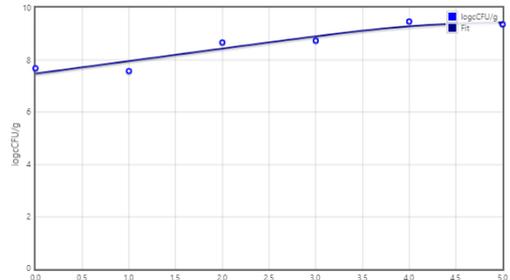


Figura 6. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

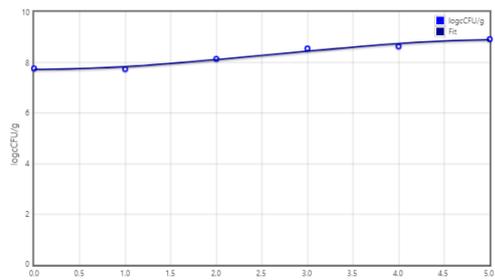


Figura 4. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

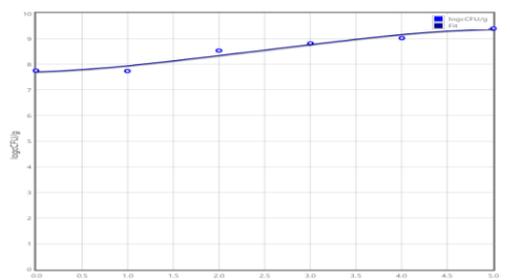


Figura 7. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

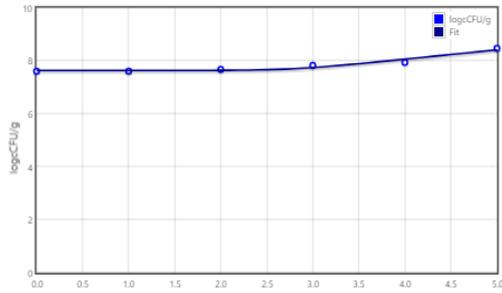


Figura 8. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

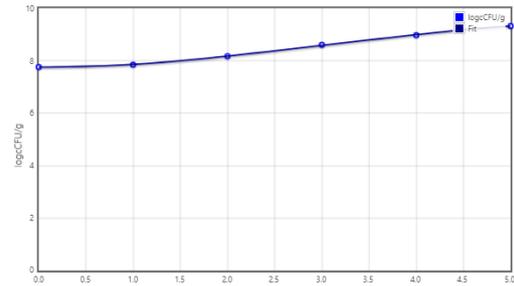


Figura 11. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

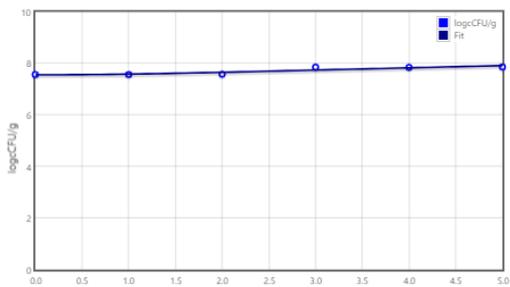


Figura 9. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

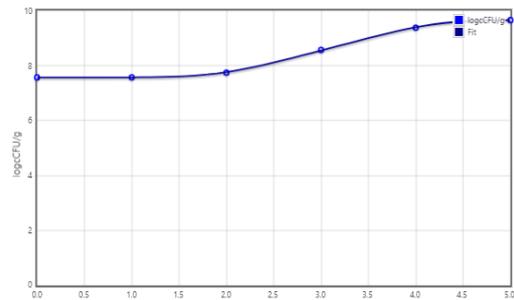


Figura 12. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

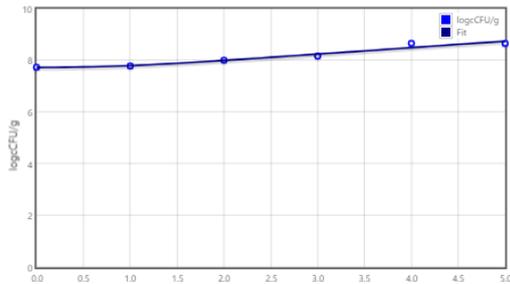


Figura 10. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 37°C.

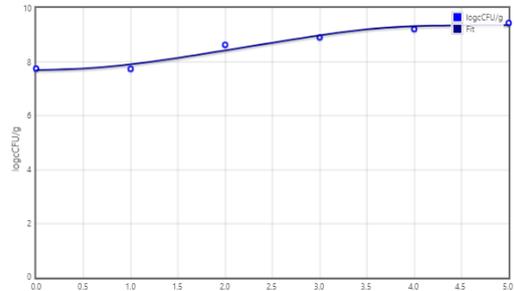


Figura 13. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 37°C.

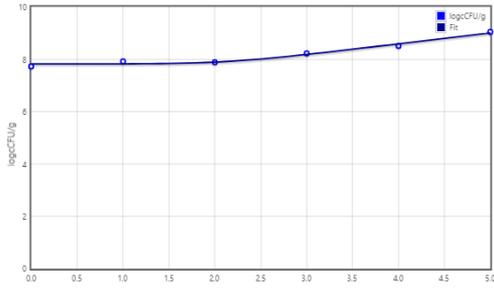


Figura 14. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

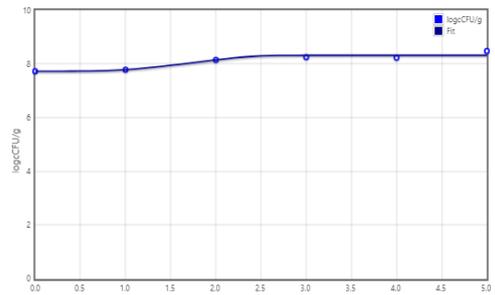


Figura 17. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

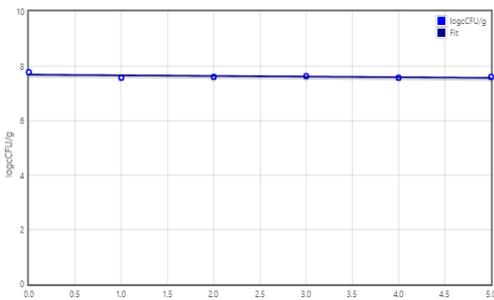


Figura 15. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

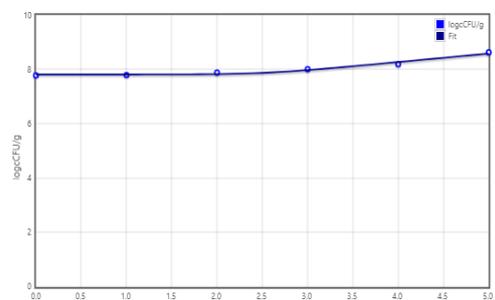


Figura 18. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

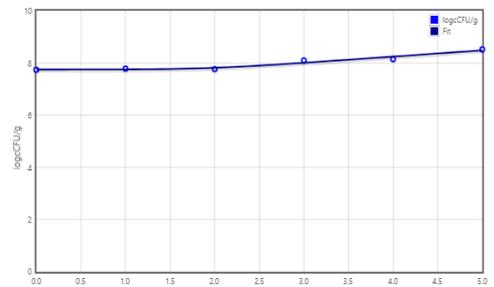


Figura 16. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

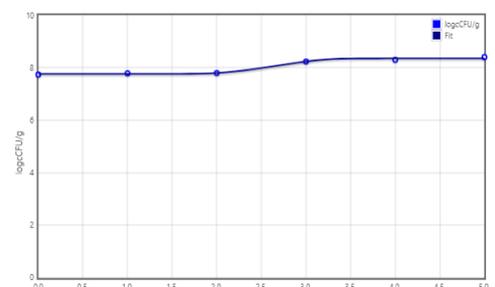


Figura 19. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

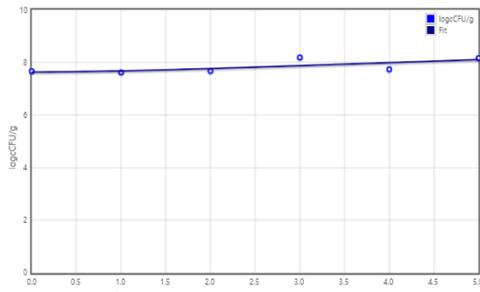


Figura 20. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

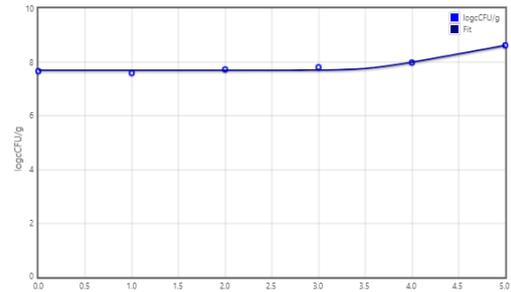


Figura 23. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

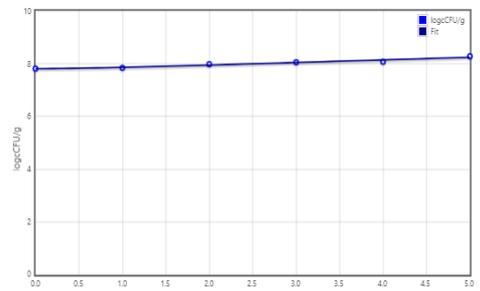


Figura 21. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

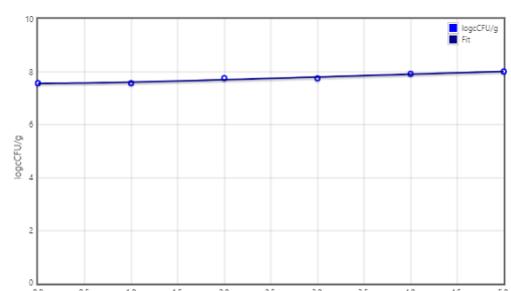


Figura 24. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

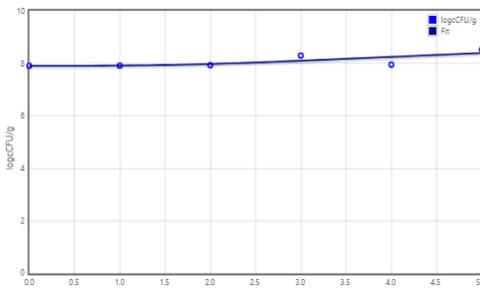


Figura 22. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 37°C.

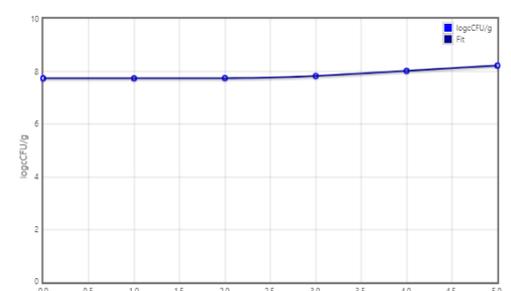


Figura 25. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 37°C.

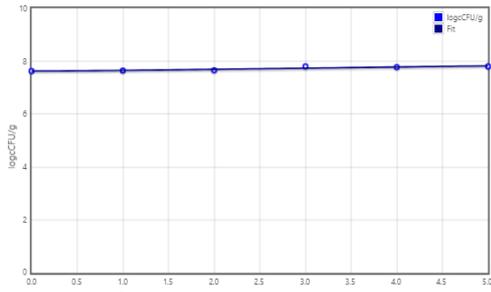


Figura 26. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

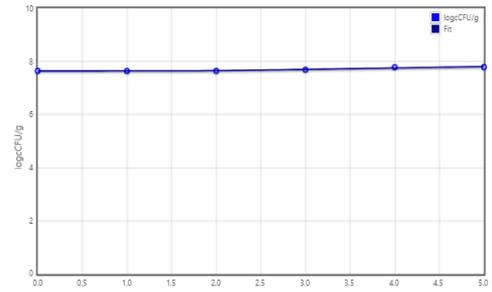


Figura 29. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

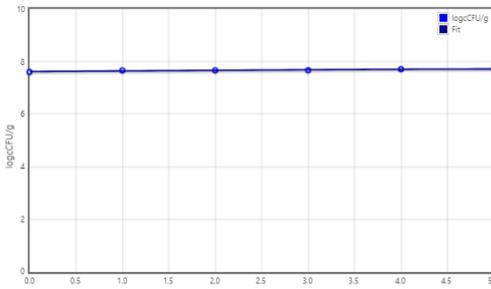


Figura 27. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

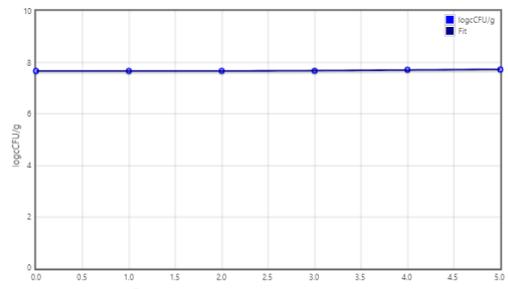


Figura 30. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

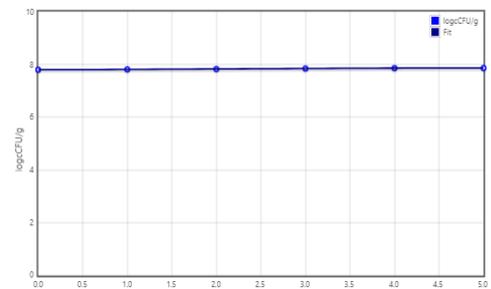


Figura 28. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

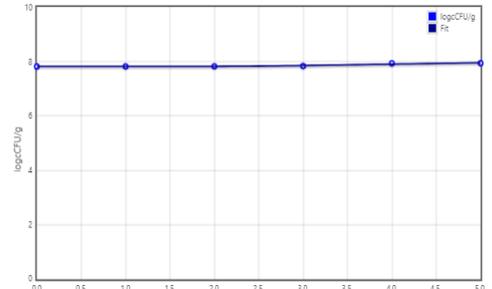


Figura 31. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

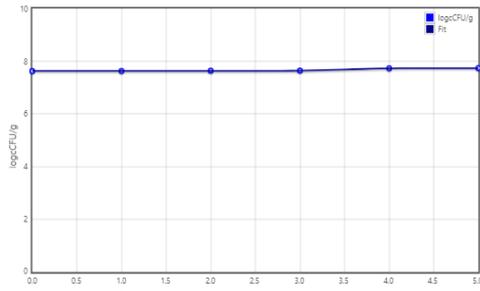


Figura 32*. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

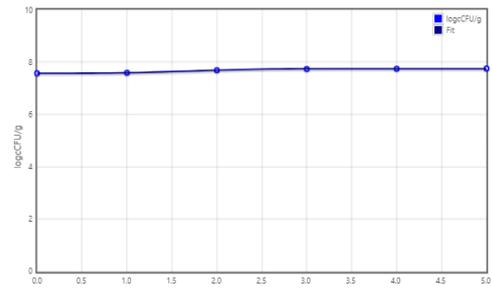


Figura 35*. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

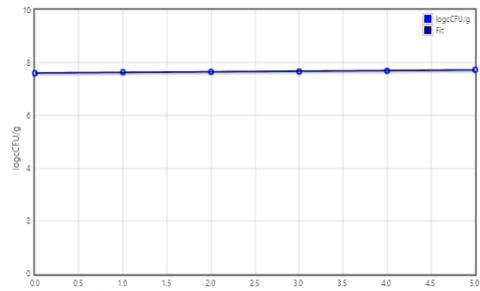


Figura 33*. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

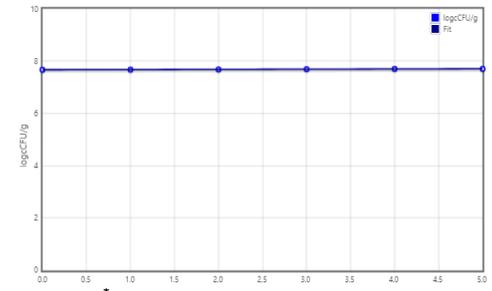


Figura 36*. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

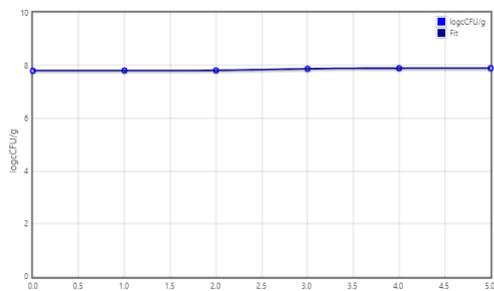


Figura 34*. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

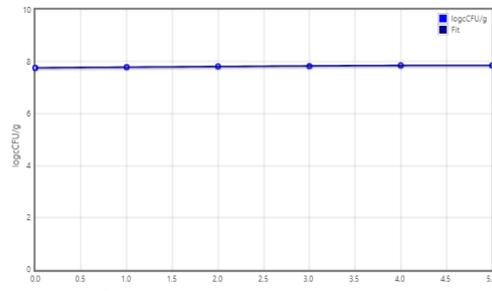


Figura 37*. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 37°C.

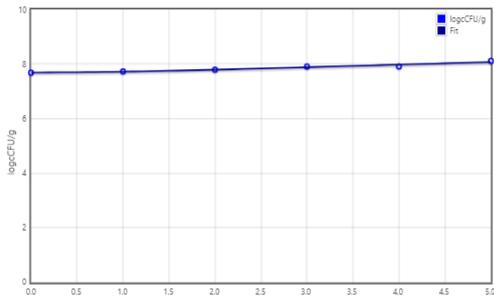


Figura 38. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

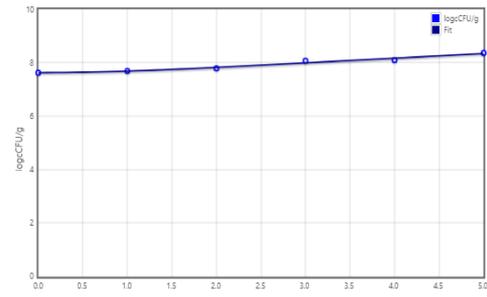


Figura 41. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

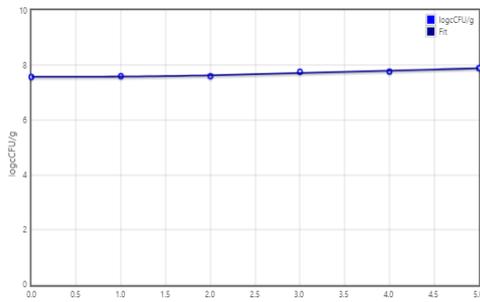


Figura 39. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

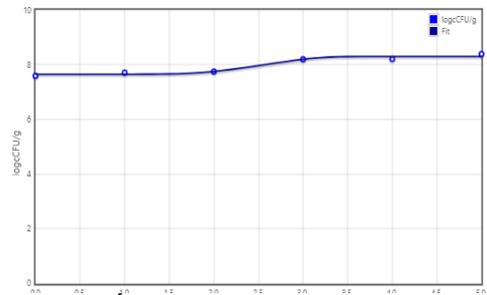


Figura 42. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

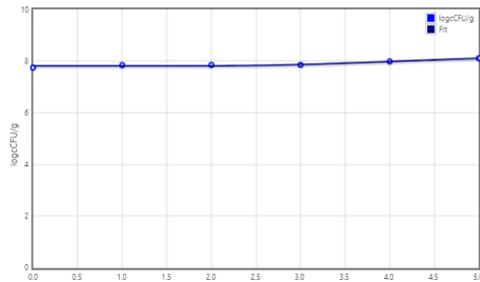


Figura 40. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

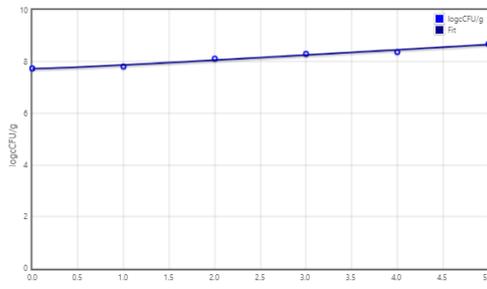


Figura 43. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

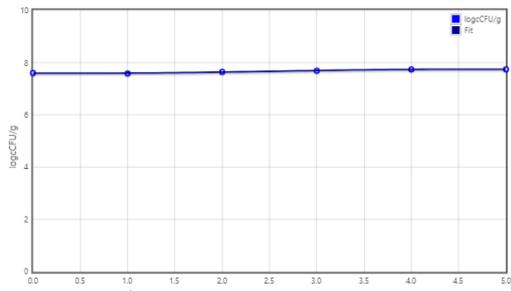


Figura 44. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

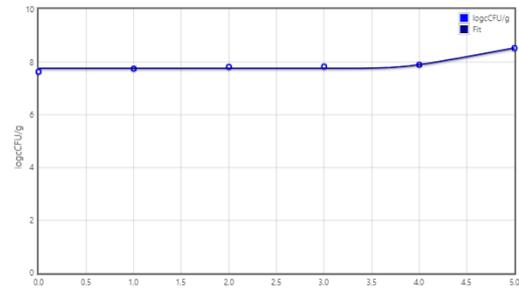


Figura 47. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

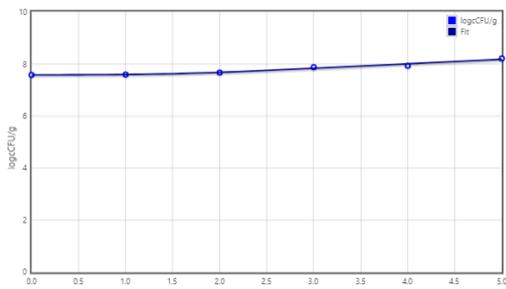


Figura 45. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

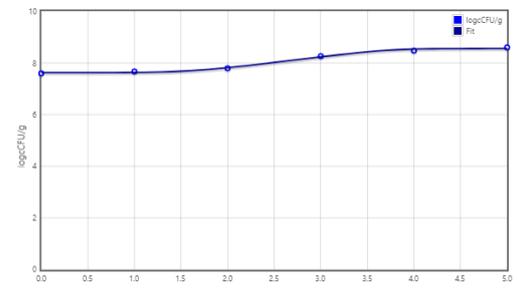


Figura 48. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

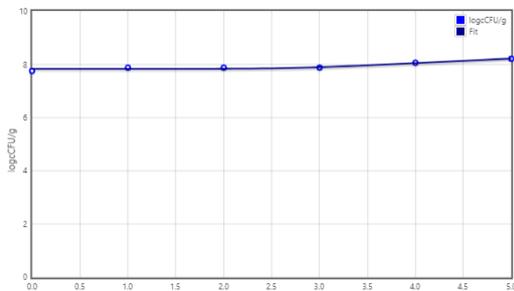


Figura 46. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 30°C.

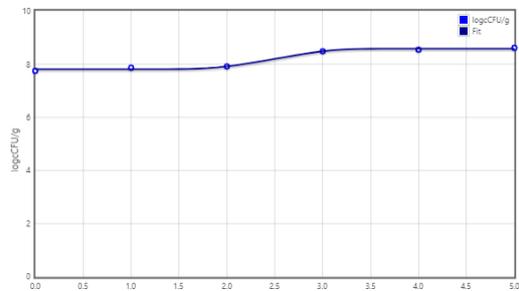


Figura 49. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 30°C.

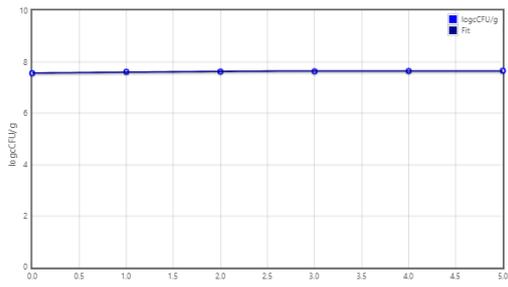


Figura 50. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

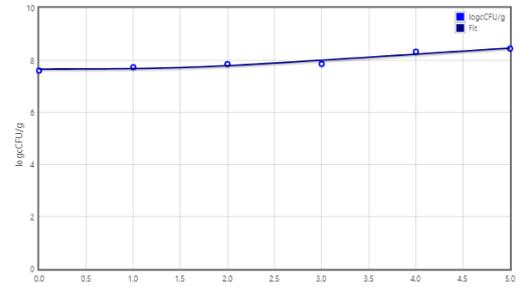


Figura 53. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

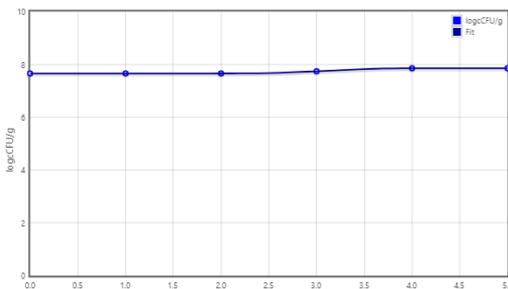


Figura 51. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

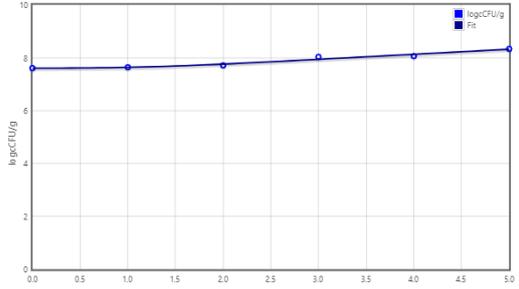


Figura 54. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

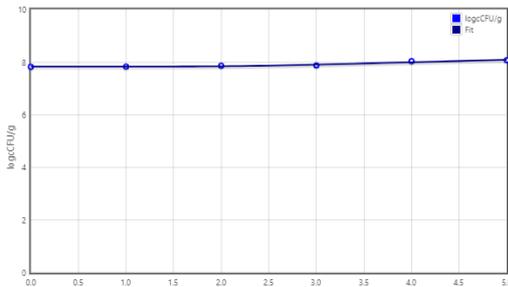


Figura 52. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

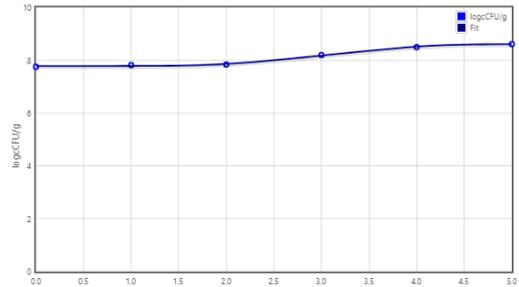


Figura 55. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

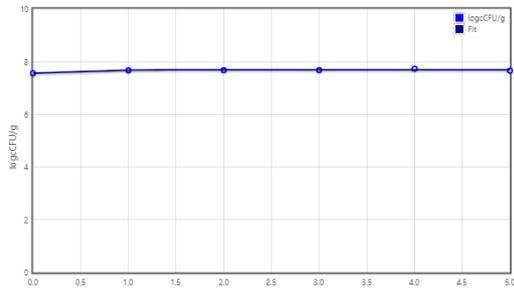


Figura 56. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

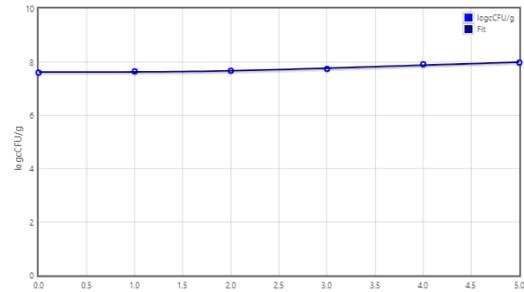


Figura 59. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

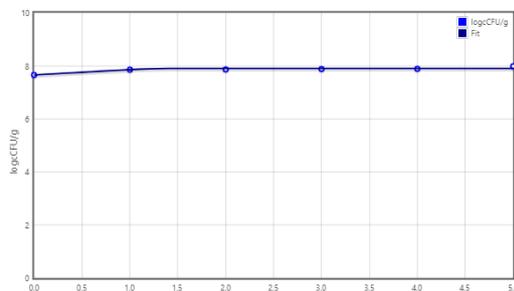


Figura 57. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

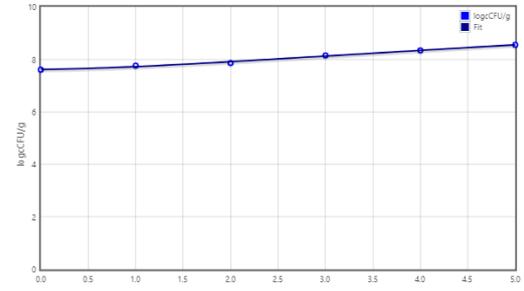


Figura 60. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

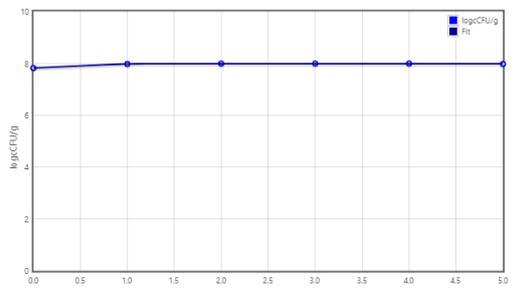


Figura 58. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 30°C.

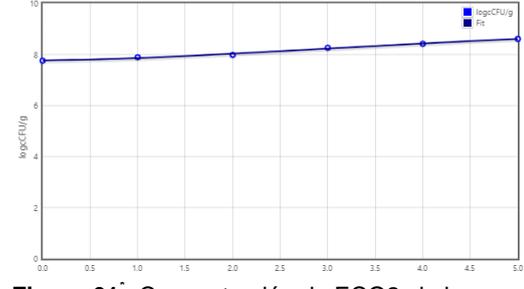


Figura 61. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 30°C.

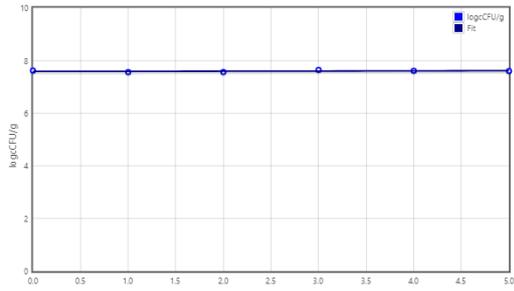


Figura 62. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

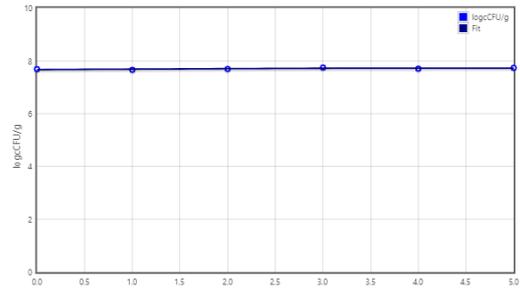


Figura 65. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

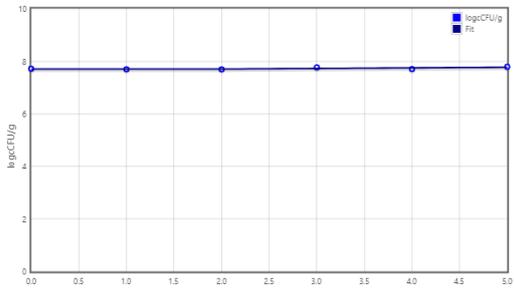


Figura 63. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

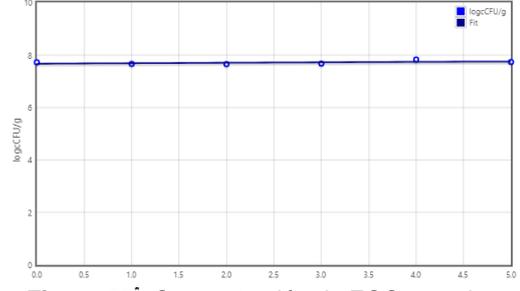


Figura 66. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

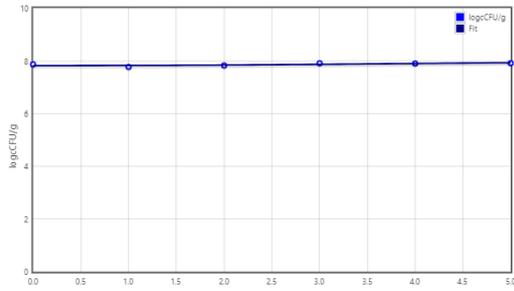


Figura 64. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

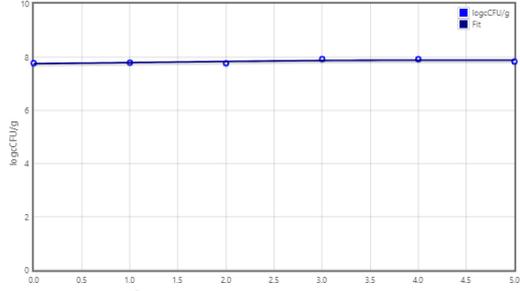


Figura 67. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

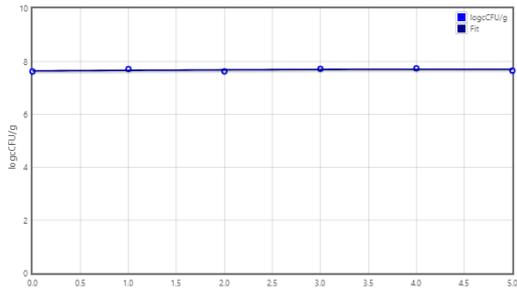


Figura 68. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

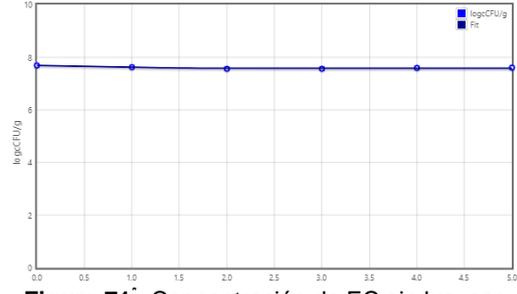


Figura 71. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

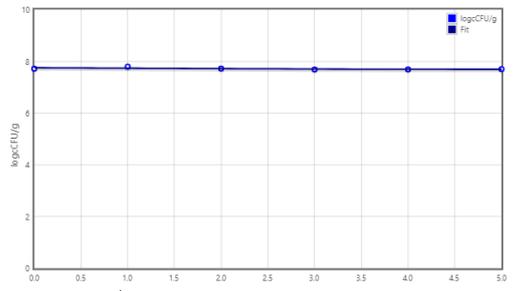


Figura 69. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

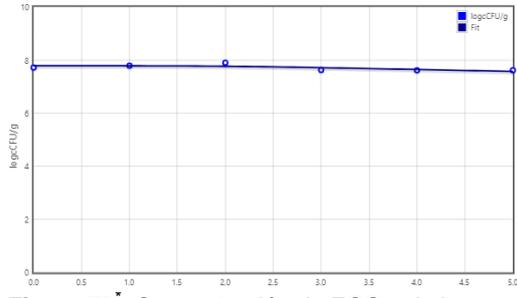


Figura 72. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

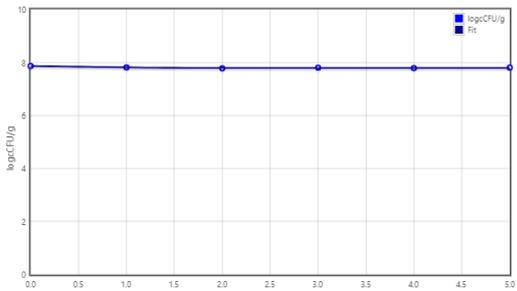


Figura 70. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

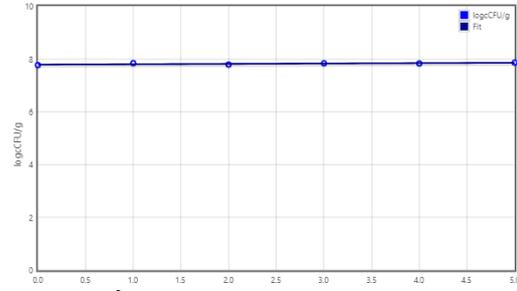


Figura 73. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 30°C.

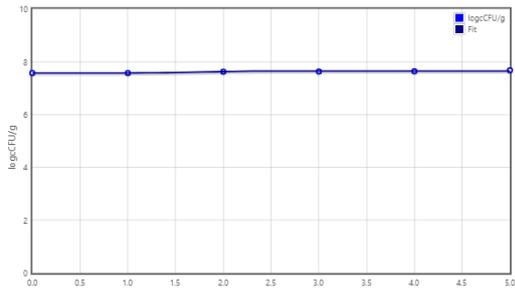


Figura 74. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

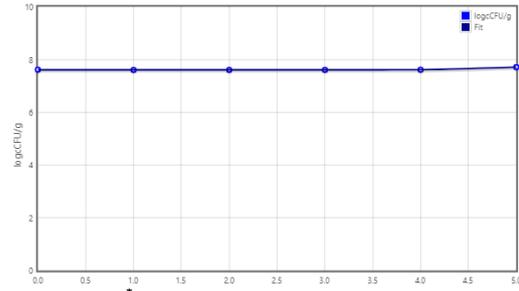


Figura 77. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

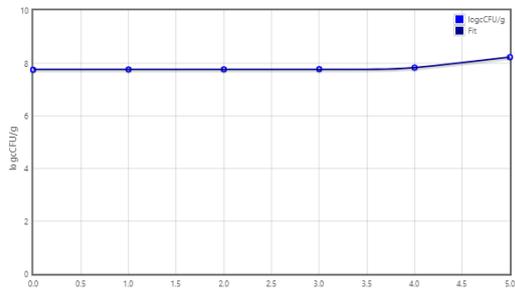


Figura 75. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

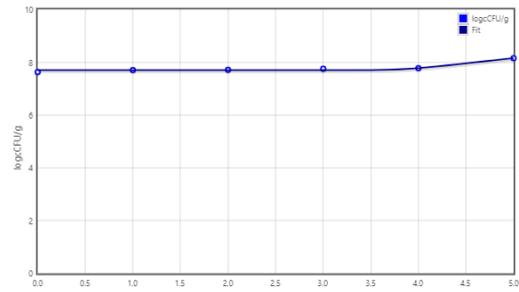


Figura 78. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

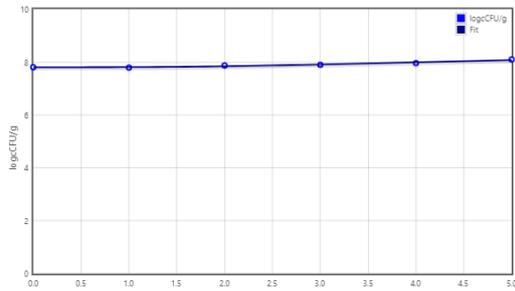


Figura 76. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

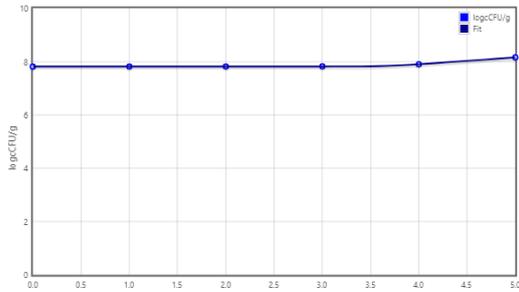


Figura 79. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

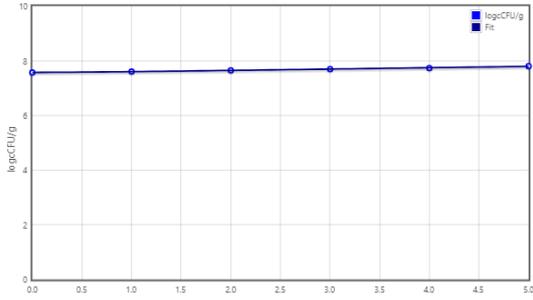


Figura 80. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

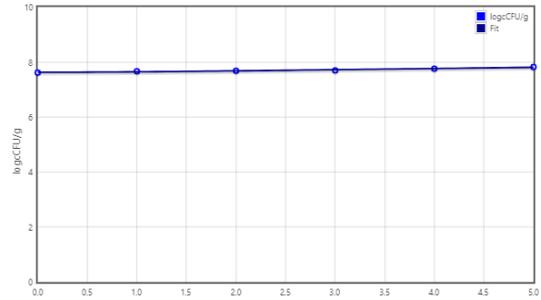


Figura 83. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

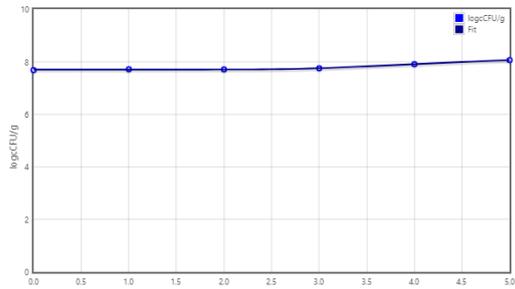


Figura 81. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

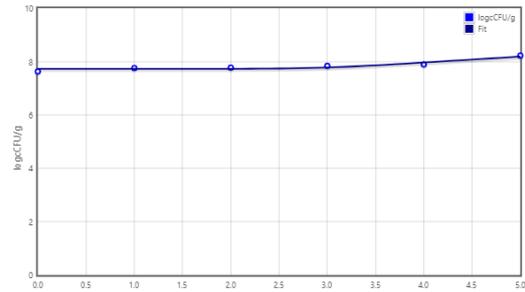


Figura 84. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

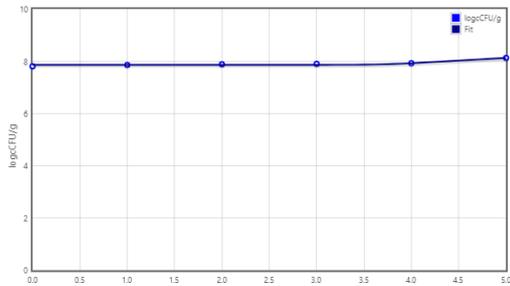


Figura 82. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 7 y 20°C.

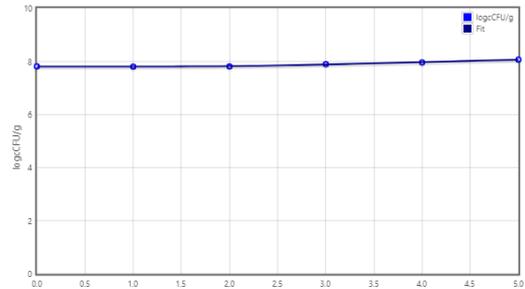


Figura 85. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 7 y 20°C.

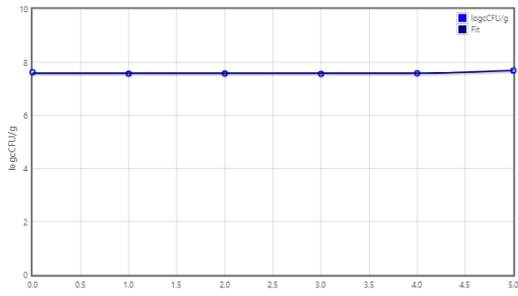


Figura 86. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

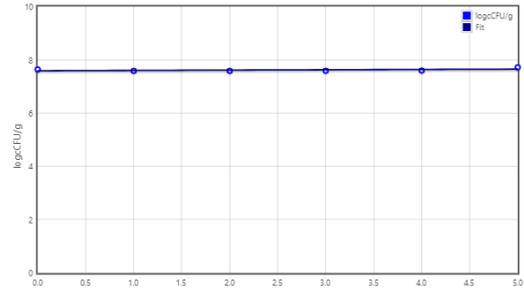


Figura 89. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

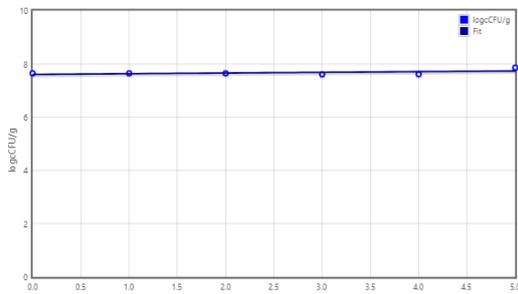


Figura 87. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

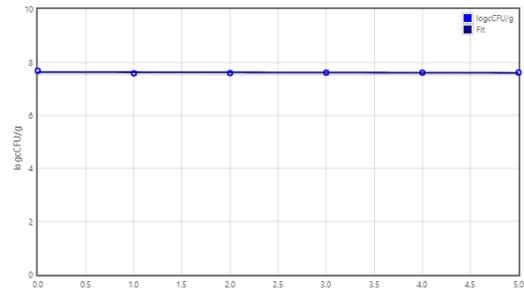


Figura 90. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

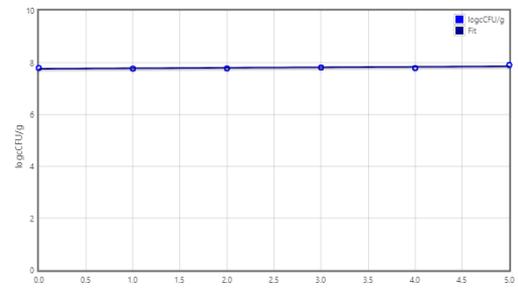


Figura 88. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

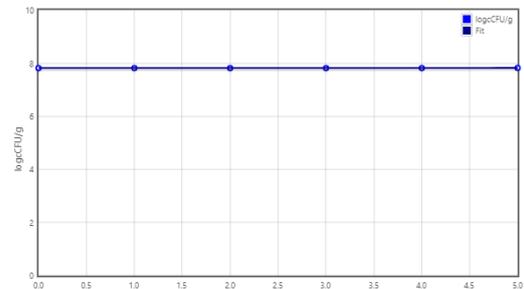


Figura 91. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

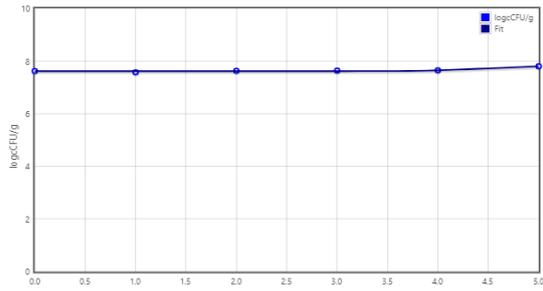


Figura 92. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

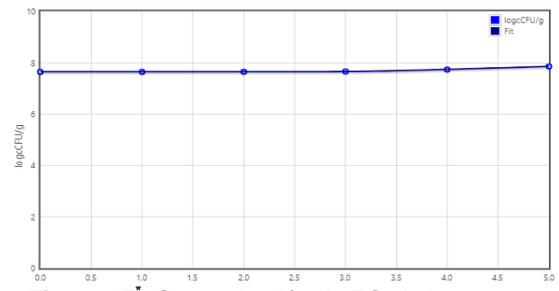


Figura 95. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

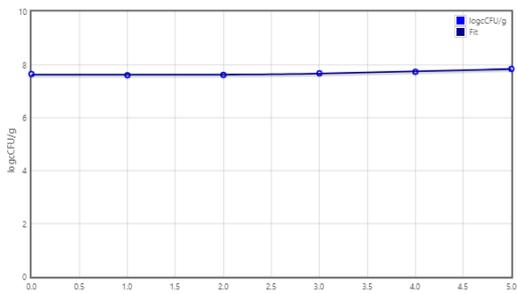


Figura 93. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

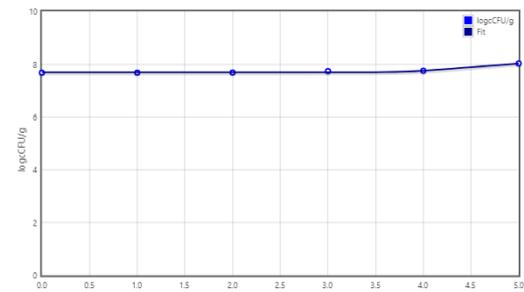


Figura 96. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

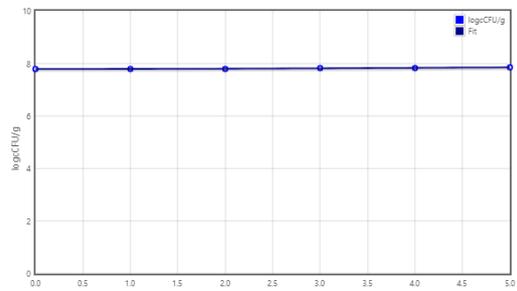


Figura 94. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 5 y 20°C.

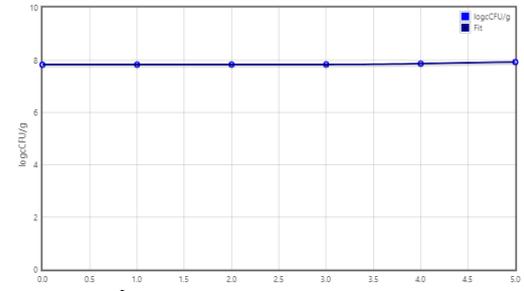


Figura 97. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 5 y 20°C.

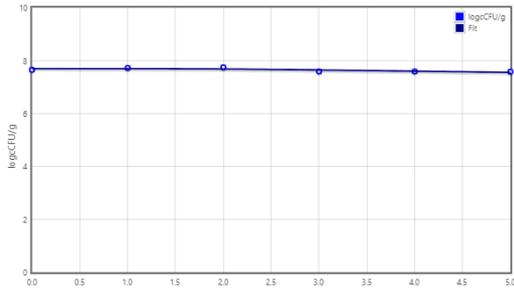


Figura 98. Concentración de EC con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

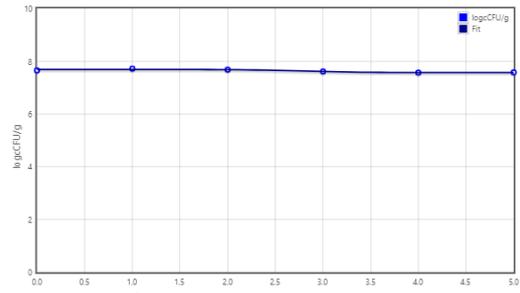


Figura 101. Concentración de EC con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

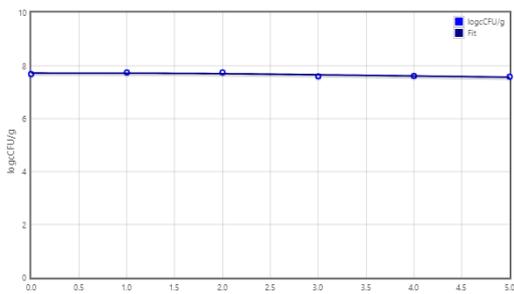


Figura 99. Concentración de ECO1 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

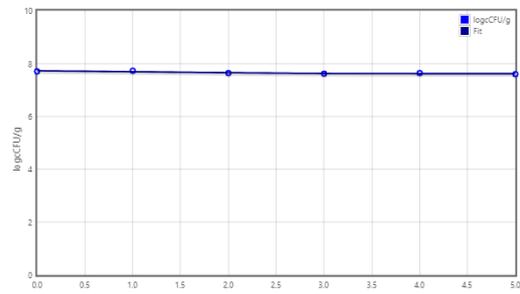


Figura 102. Concentración de ECO1 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

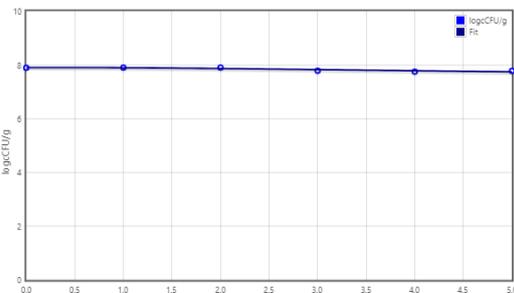


Figura 100. Concentración de ECO2 con luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

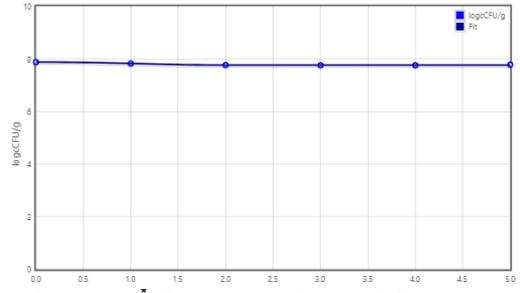


Figura 103. Concentración de ECO2 con luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

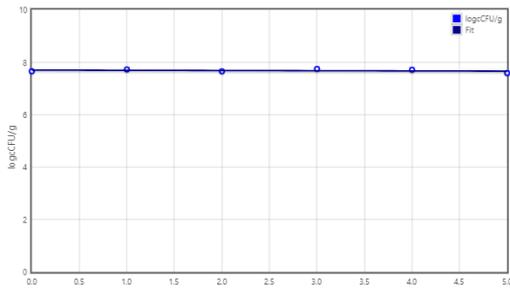


Figura 104. Concentración de EC sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

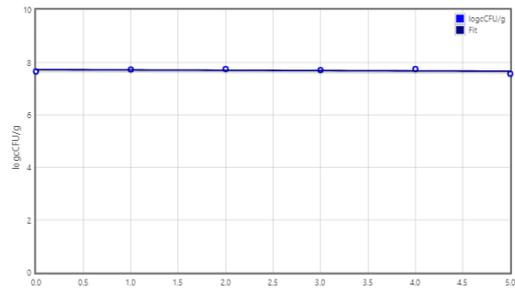


Figura 107. Concentración de EC sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

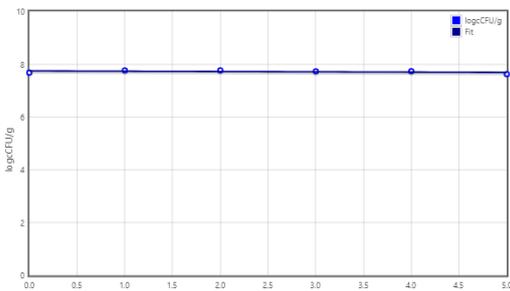


Figura 105. Concentración de ECO1 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

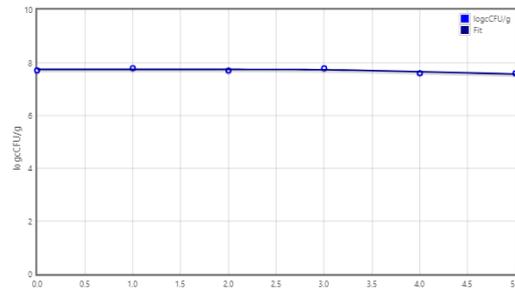


Figura 108. Concentración de ECO1 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

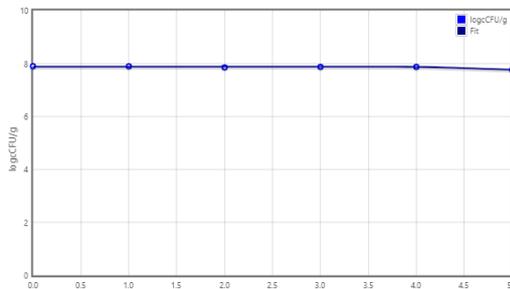


Figura 106. Concentración de ECO2 sin luz, sin oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.^a

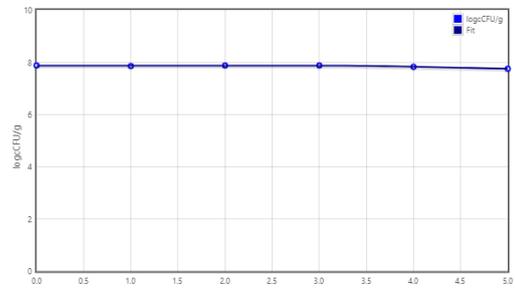


Figura 109. Concentración de ECO2 sin luz, con oxígeno, a pH 3.09 y 20°C.

^a Nota: EC: *E. coli* no patógeno CECT 516. ECO1: *E. coli* O157:H7 CECT 4076. ECO2: *E. coli* O157:H7 CECT 4267.

