

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INFLUENCIA DEL ESTRES A BAJA TEMPERATURA
Y pH ACIDO EN *Clostridium perfringens* TIPO A

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR:

LICET VILLARREAL TREVIÑO

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Agosto de 1998

TD
RC116
.C5
V5
c.1



1080087087

RESEARCH & DEVELOPMENT
LONDON, ENGLAND



964278

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**INFLUENCIA DEL ESTRES A BAJA TEMPERATURA
Y pH ACIDO EN *Clostridium perfringens* TIPO A**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR: **DR. LICET VILLARREAL TREVIÑO**

LICET VILLARREAL TREVIÑO

DR. LUIS J. GALÁN WONG
Vocal

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Agosto de 1998





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INFLUENCIA DEL ESTRÉS A BAJA TEMPERATURA Y pH ÁCIDO EN
Clostridium perfringens TIPO A

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA

POR

LICET VILLARREAL TREVIÑO


APROBADA
COMISIÓN DE TESIS



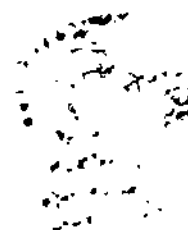
DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO
Presidente



DRA. NORMA L. HEREDIA ROJAS
Secretario



DR. LUIS J. GALÁN WONG
Vocal



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la co-dirección de la Dra. Norma L. Heredia Rojas. Esta investigación fue apoyada en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Tuya es, oh Jehová, la magnificencia y el poder, la gloria, la victoria y el honor; porque todas las cosas que están en los cielos y en la tierra son tuyas. Tuyo, oh Jehová, es el reino, y tu eres excelsa sobre todos.

Las riquezas y la gloria proceden de ti, y tú dominas sobre todo; en tu mano está la fuerza y el poder, y en tu mano el hacer grande y el dar poder a todos.

1ª. Cr. 29: 11-12

DEDICATORIA

A mi esposo

con quien he compartido momentos inolvidables en mi vida,
por su ayuda y comprensión en los momentos mas difíciles,
por formar parte de este gran sueño y compartir conmigo
esfuerzos y sacrificios. Por su amor, cariño y paciencia
que nos alienta a superarnos cada día más,
y porque simplemente, TE AMO.

A mis hijos

Alberto, Lizeth y Melissa

razón de mi vida y superación

A mis padres

por haberme dado el don más grande: LA VIDA,
porque con su amor y ejemplo de lucha en la vida,
me educaron y formaron, siendo el apoyo moral
más grande en mi vida. LOS QUIERO MUCHO.

A mis hermanos,

por su interés y ayuda que siempre
me han brindado, y comprender
tantos momentos de separación.
Por siempre los llevo en mi
mente y en mi corazón.

Al Pbro. Fidel Rodríguez M y Hna. Nohemí Jácome de R, con profundo respeto y admiración, por ser pilares espirituales en mi vida. GRACIAS A DIOS POR SUS VIDAS.

Con especial cariño para el Profr. Humberto Bustamante y Angelita Alcocer de B, quienes ocupan un lugar especial en mi corazón. Gracias por su valiosa amistad y ayuda invaluable, por compartir un poco de su vida conmigo, por todo esto, son alguien especial para mí.

Con gran afecto para mis Hermanos en la fe y queridos amigos, Víctor y Taby, Chilo y Chaguita porque han compartido momentos muy importantes en mi vida, por hacer con su cariño más fácil el camino. Es una bendición de Dios el sentirse cerca y compartir con ustedes mis alegrías y tristezas. GRACIAS, MUCHAS GRACIAS, QUE DIOS LOS BENDIGA.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado el apoyo económico para la realización de esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, la cual a través de la Dirección de la Facultad de Ciencias Biológicas y de la División de Estudios de Postgrado, me brindó su apoyo en todo momento para la realización de mi tesis doctoral.

Muy especialmente a la Dra. Julia Verde Star, Subdirectora de la División de Estudios de Postgrado por su invaluable apoyo y sincera amistad.

Al Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma L. Heredia R, por su valiosa asesoría y consejos que me permitieron incursionar más, en el campo de la investigación.

Al Dr. Ronald G. Labbé del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, E.U.A. quien amablemente me facilitó su laboratorio para realizar algunos experimentos de mi investigación.

A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS por la facilidad que me brindó en el uso del Contador de Centelleo Líquido.

Al Dr. Mario R. Morales Vallarta, por su valiosa amistad a través del tiempo, por su gran interés durante esta investigación y la ayuda que siempre me ha brindado.

A la Dra. Marivel Gómez Treviño, por todas las facilidades que me brindó para llevar a cabo la escritura de este trabajo, sus consejos y apoyo incondicional.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, a la Dra. Marivel Gómez Treviño y al Dr. Mario R. Morales Vallarta, por su valioso tiempo empleado en la revisión de este escrito, sus sugerencias y experta opinión.

A la M.C. María Manuela Vela Franco por su gran apoyo y amistad incondicional en todo momento. Gracias por todo.

A todo el personal del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., por su amistad y ayuda invaluable, les estaré siempre agradecida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

TÍTULO.....	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
Principales enfermedades causadas al hombre por <i>C. perfringens</i>	8
A) Gangrena gaseosa.....	8
B) Intoxicación alimentaria.....	9
Proteínas de estrés.....	10
A) Proteínas de choque frío.....	15
B) Proteínas de choque ácido.....	21
Respuesta cruzada.....	36
PCHF y PCHA como antígenos inmunodominantes.....	42
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVOS.....	48

MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
Mantenimiento de la cepa.....	49
Inóculo.....	49
Efecto del choque frío sobre el crecimiento de <i>C. perfringens</i>	49
Efecto de la baja temperatura en la adquisición de tolerancia al frío.....	50
Duración de tolerancia al frío.....	51
Efecto del choque frío sobre el patrón de proteínas.....	51
Efecto del choque ácido sobre el crecimiento de <i>C. perfringens</i>	52
Efecto del pH ácido en la adquisición de tolerancia.....	53
Inducción de la respuesta a la tolerancia al ácido (RTA).....	53
Medición de la RTA.....	53
Duración de la RTA.....	54
Efecto del choque ácido sobre el patrón de proteínas.....	54
Métodos de rompimiento celular.....	55
Método de Abraham y Rood.....	55
Método modificado de Qoronfleh y Streips.....	55
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	56
Fluorografía.....	57
Secado del gel.....	57
Autoradiografía.....	58
Detección de PCHF y PCHA Inmunodominantes.....	58
Inducción de PCHF y PCHA.....	58
Electrotransferencia.....	59

Inmunodetección.....	59
Determinación de proteínas.....	60
RESULTADOS.....	62
Efecto de un choque frío en el crecimiento de <i>C. perfringens</i>	62
Tolerancia al frío por un choque frío previo.....	65
Duración de la tolerancia adquirida al frío.....	66
Efecto de un choque frío sobre el patrón de proteínas.....	68
Método de rompimiento celular.....	68
Concentración del isótopo a utilizar.....	69
Análisis de los patrones de proteínas de choque frío.....	70
Determinación de PCHF Inmunodominantes.....	70
Efecto de un choque ácido en el crecimiento de <i>C. perfringens</i>	73
Inducción de la RTA debido a un choque ácido previo.....	76
Duración de la tolerancia adquirida al ácido.....	79
Análisis de los patrones de PCHA.....	82
Determinación de PCHA inmunodominantes.....	84
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES.....	89
PERSPECTIVAS DE ESTUDIO.....	97
LITERATURA CITADA.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford.....	61
2.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 10 °C.....	62
3.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 15 °C.....	63
4.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 20 °C.....	63
5.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 28 °C.....	64
6.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. Inmediatamente después se sometió a 10 °C.....	65
7.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. 2h después se sometió a 10 °C.....	67
8.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. 2.5 h después se sometió a 10 °C.....	67
9.	Curva de incorporación de ³⁵ S por las células de <i>C. perfringens</i> durante un choque frío de 28 °C por 60 min.....	69
10.	Autoradiografía de los patrones de proteína totales de <i>C. perfringens</i> FD-1041 cultivado en caldo con tioglicolato a 43 °C y sometido a un choque frío (28 °C por 60 min) a la mitad de la fase logarítmica.....	71
11.	Inmunodetección de proteínas de choque frío de <i>C. perfringens</i> utilizando suero de conejo después de ser inoculado con la bacteria.....	72

12.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 2.0.....	73
13.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 2.5.....	74
14.	<i>C. perfringens</i> cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 3.0.....	74
15.	Curva espectrofotométrica (a) y de células viables (b) de <i>C. perfringens</i> cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.0.....	75
16.	Curva espectrofotométrica (a) y de células viables (b) de <i>C. perfringens</i> cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.5.....	77
17.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. Inmediatamente después se sometió a pH 3.5.....	78
18.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. 2 h después se sometió a pH 3.5.....	80
19.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. 3 h después se sometió a pH 3.5.....	80
20.	Curva de supervivencia de <i>C. perfringens</i> , cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. 3.5 h después se sometió a pH 3.5.....	81
21.	Curva de incorporación de S ³⁵ por las células de <i>C. perfringens</i> durante un choque ácido de pH 4.5 por 20 min.....	82
22.	Autoradiografía de los patrones de proteína totales de <i>C. perfringens</i> FD-1041 cultivado en medio ICC a pH 7.0 y sometido a un choque ácido (pH 4.5 por 20 min) a la mitad de la fase logarítmica.....	83
23.	Inmunodetección de proteínas de choque ácido de <i>C. perfringens</i> , utilizando suero de conejo después de ser inoculado con la bacteria.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Valores de letalidad a 10 °C de células de <i>C. perfringens</i> FD-1041, incubadas a 43 °C y sometidas previamente a un choque frío de 28 °C por 1 h. El ensayo de tolerancia se realizó inmediatamente después del pre-choque frío.....	66
2. Valores de letalidad a 10 °C de células de <i>C. perfringens</i> FD-1041, incubadas a 43 °C y sometidas previamente a un choque frío de 28 °C por 1 h. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del pre-choque frío.....	68
3. Valores de letalidad a pH 3.5 de células de <i>C. perfringens</i> FD-1041, incubadas a pH 7.0 y sometidas previamente a un choque ácido de pH 4.5 por 20 min. El ensayo de tolerancia se realizó inmediatamente después del pre-choque ácido.....	78
4. Valores de letalidad a pH 3.5 de células de <i>C. perfringens</i> FD-1041, incubadas a pH 7.0 y sometidas previamente a un choque ácido de pH 4.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del pre-choque ácido.....	81

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

A_{600}	Absorbancia a 600 nanómetros
AA	Adaptación ácida
ADN	Acido desoxirribonucleico
°C	Grados celsius
CO ₂	Bióxido de carbono
cpm	Cuentas por minuto
"D"	Valor de letalidad
Desv. Std	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
Fig	Figura
g	Gramo
h	Hora (s)
H ₂	Hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Acido clorhídrico
ICC	Infusión cerebro corazón
IgG	Inmunoglobulina G
K	Potasio
KDa	Kilodaltones
Log ₁₀	Logaritmo base 10
M	Molar

mA	Miliamperes
mg	Miligramo (s)
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MMS	Medio mínimo suplementado
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
OH ⁻	Hidroxilo
P	Probabilidad
p	Peso
PAF	Proteínas de aclimatación al frío
PARC	Proteína antigénica de reacción cruzada
PCHA	Proteínas de choque ácido
PCHF	Proteínas de choque frío
PCHT	Proteínas de choque térmico
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PPO	Difenil oxazol
RA	Resistencia ácida
RNA	Acido ribonucleico
RTA	Respuesta a la tolerancia ácida
³⁵ S	Azufre 35
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundo (s)

t'	Prueba de análisis estadístico de "t" pariaada
TA	Tolerancia ácida
TCA	Acido tricloroacético
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltios
v	Volumen
μCi	Microcuries
μg	Microgramo (s)
μl	Microlitro (s)
<	Menor que
>	Mayor que
%	Porciento

RESUMEN

Clostridium perfringens es un bacilo gram positivo, formador de esporas e inmóvil, que es causante de varias enfermedades en el hombre y en los animales, entre éstas destacan la gangrena gaseosa y una intoxicación alimentaria muy importante. Este microorganismo elabora varias enzimas; algunas de éstas son toxinas, como la enterotoxina producida durante el proceso de esporulación y causante de la intoxicación alimentaria.

Se sabe que muchos organismos tienen la capacidad de adaptarse a condiciones desfavorables del medio ambiente, mediante la síntesis de un grupo de proteínas llamadas de estrés, las cuales se cree que protegen a la células de estas condiciones tensionantes. Cuando las células son sometidas a una baja temperatura o a un pH ácido, sintetizan proteínas llamadas proteínas de choque frío o proteínas de choque ácido respectivamente, como respuesta a esta condición. Se cree que estas proteínas facilitan la supervivencia de las células al proporcionar protección contra bajas temperaturas y acidez extrema.

Debido a la trascendencia de *C. perfringens* como patógeno y causante de enfermedades en el humano, pensamos que sería de gran importancia el estudio de los factores que pueden favorecer la supervivencia y patogenicidad de esta bacteria como un mecanismo de control de las enfermedades que produce.

Las células fueron sometidas a un choque frío de 43 a 28 °C y un choque ácido a pH de 7.0 a 4.5 representando una condición subletal y alcanzaron

niveles de crecimiento similares al control. Cuando se aplicó este choque frío y ácido a las células vegetativas se logró la inducción de tolerancia a temperaturas y pH ácido más bajos. Además, que como resultado de un choque frío previo a 28 °C, la bacteria resultó ser de 2 a 3 veces más tolerante a 10 °C y esta tolerancia se prolongó hasta 2 h posteriores a este tratamiento. Así mismo, se observó que cuando aplicamos un choque ácido previo a pH 4.5 se indujo tolerancia a un pH de 3.5, resultando células hasta 15 veces más tolerantes que el control y esta tolerancia se prolongó hasta 3 h después del pre-choque ácido.

Se encontró que un choque frío aplicado a la bacteria induce la síntesis de 7 proteínas de choque frío (PCHF) cuyos pesos moleculares fueron de 200, 105, 82, 70, 50, 45 y 10 kDa de las cuales las últimas 5, presentaron un nivel de síntesis muy aumentado, mientras que las primeras 2, presentaron una menor inducción. También se observó que un choque ácido aplicado a las células vegetativas de la bacteria provocó la inducción de al menos 5 proteínas de choque ácido (PCHA) como respuesta a este tratamiento y sus pesos moleculares fueron de 120, 84, 58, 45 y 17 kDa. De estos polipéptidos, el de 84, 58 y 17 kDa presentaron un mayor nivel de síntesis que el de 120 y 45 kDa.

Se identificaron 4 PCHF inmunodominantes de *C. perfringens* al inducir un cuadro de gangrena gaseosa. Los pesos moleculares de estas proteínas fueron 105, 82, 70 y 10 kDa. Sin embargo no pudimos detectar PCHA inmunodominantes en un cuadro similar.

ABSTRACT

Clostridium perfringens, is a spore forming, non-movil, gram positive rod, that causes several diseases in human beings and animals. The most important illnesses originated by this organism are gas gangrene and food poisoning. This microorganism synthesizes several enzymes and proteins, some of them are toxic such as the enterotoxin produced during the sporulation.

It is known that many organisms get the ability to adapt to unfavorable conditions in the medium by synthesizing a set of polypeptides called stress proteins. These are believed to protect the cell against those conditions. When the cells are exposed to low temperatures or acidic pH, they synthesize proteins called cold shock and acid shock proteins respectively. It is believed that these proteins protect the cells against damage caused by low temperatures and extreme acidity.

Since *C. perfringens* is an important pathogen in human beings and animals we tough it would be relevant to study some factors that could enhance the survival and pathogenicity of this bacterium.

We found that after a cold shock from 43 to 28 °C or an acid shock from pH 7 to 4.5 growth ceased for several minutes, but after some time it reached similar levels compared to the control. When the cells were cold shocked or acid shocked, they acquired tolerance to a lower temperature (10 °C) or acid pH (3.5). Thus cold shocked cells were 2 to 3 fold more tolerant to 10 °C than the control. This tolerance was maintained after 2 h of the treatment. Also cells pre-treated at pH 4.5 were 15 fold more tolerant to pH 3.5 than the control.

Cold shock applied to the bacteria induced the synthesis of 7 cold shock proteins (200, 105, 82, 70, 50, 45 and 10 kDa). Five of them (10, 45, 50, 70 and 82 kDa) presented highest levels of synthesis, while two (105 and 200 kDa) lower levels. On the other hand, an acid shock induced the synthesis of five proteins (120, 84, 58, 45 and 17 kDa). Some of them (84, 58 and 17 kDa) were synthesized at higher levels than the others (120 and 45 kDa).

Using serum from rabbits suffering gas gangrene, four immunodominant cold shock proteins (105, 82, 70 and 10 kDa) were identified. No immunodominant acid shock proteins were detected using the same serum.

INTRODUCCION

C. perfringens, uno de los principales microorganismos anaerobios patógenos para humanos está ampliamente distribuido en la naturaleza y es causante de gangrena gaseosa, desde 1940 se le asoció con una intoxicación alimentaria, por lo que el interés por estudiarla ha aumentado en los últimos años (Matches, J.R. *et al*, 1979).

Este microorganismo posee un tiempo de generación muy corto (7min), además puede crecer en un amplio rango de temperatura de crecimiento (15-50 °C) y posee un pH óptimo de 6.0 a 7.0 todo este le confiere la habilidad de poder reproducirse rápidamente en los alimentos, siendo esto de gran importancia en la sanidad de los mismos (Labbé, R.G y T.Yamagishi, *et al*, 1976).

Es bien sabido que las altas o bajas temperatura son algunos de los factores mas utilizados en el control de los microorganismos, sin embargo se conoce que algunas bacterias presentan mecanismos de adaptación a estos medios ambientes desfavorables lo cual les permite sobrevivir a estos tratamientos (Morimoto, R.I., *et al*, 1990).

Un factor importante que se presenta en este aspecto es la capacidad que tienen los organismos de sintetizar proteínas debido a alguna condición desfavorable. La baja temperatura y el pH ácido inducen la síntesis de proteínas de choque frío y proteínas de choque ácido respectivamente involucradas en el proceso de tolerancia a condiciones extremas de estos factores lo cual pudiera

ocasionar graves consecuencias (Goldstein, J, *et al.*, 1990; y Foster, J.W, 1993).

Durante la elaboración y almacenaje de los alimentos, éstos son sometidos a cambios físicos y químicos (temperatura, pH, radiaciones, etc). Los cambios de pH también son muy comunes durante el paso por el tracto digestivo en donde el organismo debe de pasar la barrera gástrica, sin embargo una bacteria con buena capacidad de adaptación tanto a la baja temperatura a la cual son sometidos los alimentos durante su refrigeración, como al pH ácido, pudiera resistir estos cambios y esto favorecería la supervivencia del microorganismo (Bearson, S. *et al.*, 1997).

Debido a todo lo anterior resulta muy importante el estudio de la supervivencia de *C. perfringens*, así como la adquisición de tolerancia y síntesis de proteínas, de tal manera que pudiéramos conocer los efectos que tienen estos cambios de temperatura y pH en la patología por este microorganismo.

ANTECEDENTES

C. perfringens es una bacteria patógena ampliamente distribuida, se encuentra normalmente en el tracto digestivo de humanos y animales, así como en el suelo y las aguas de desecho (Matches, J.R. et al., 1974), a diferencia de muchos otros clostridios, no es móvil y forma esporas *in vitro* solamente en medios de cultivo especiales; es fermentativo, crece rápidamente en medios carbohidratados produciendo grandes cantidades de H₂ y CO₂ lo cual favorece un ambiente anaerobio y es productor de una variedad de toxinas y enzimas importantes en la patogénesis (Hatheway, C.L, 1990). Las cepas de este microorganismo han sido clasificadas en 5 tipos (A-E) en base a la producción de 4 exotoxinas (alfa, beta, epsilon e iota), siendo las cepas del tipo A las más importantes como causantes de enfermedades en humanos (Smith, L.D.S. y B.L. Williams, 1984); y pueden estar presentes en suelo (Labbé, R.G, 1989).

Este microorganismo tiene un tiempo de generación muy corto (7 a 8 min) y una temperatura óptima de crecimiento de 43 a 46 °C (la mas alta que cualquier bacteria de importancia médica); así mismo debido a su capacidad de producir esporas puede resistir a procesos de cocción, de congelación, de radiación, a la acción de detergentes, de antibióticos, de solventes, etc (Labbé, R.G, 1991).

C. perfringens causa en humanos la gangrena gaseosa, enterocolitis necrozante en infantes y enteritis necrótica (Rood, J. I. y S. T. Cole, 1991). En 1940 se relacionó por primera vez con intoxicaciones alimentarias (Sutton, R.G. y Hobbs, P, 1979). Posteriormente en 1968 se descubrió que existían cepas de este microorganismo que producían una enterotoxina responsable de enfermedades gastrointestinales en humanos (Duncan, C.L. et al., 1969). En 1980 *C. perfringens* llegó a ocupar el segundo lugar como causante de intoxicaciones alimentarias bacterianas en E.U.A. y Canadá (Shandera, W.X., 1983; Labbé, R.G, 1991) y se ha relacionado con el síndrome de muerte fulminante infantil (Murrel, T.G.C., et al., 1987). Es también el agente causal de varias enfermedades en animales como disentería del cordero, enterotoxemia ovina, enfermedad del riñón pulposo en cabras y otras enfermedades enterotoxémicas de corderos y becerros (Niilo, L. 1980).

***C. perfringens* CAUSA:**

a) **GANGRENA GASEOSA.** Es una de las principales enfermedades en el hombre causada por *C. perfringens*. El proceso infeccioso comienza habitualmente con la localización de las esporas en una herida abierta, posteriormente a la germinación de las esporas, el crecimiento de la bacteria causa una necrosis o destrucción de los tejidos con posterior disminución del aporte sanguíneo debido a la destrucción de los capilares por una toxina, la fosfolipasa C (alfa toxina). Esta toxina es una lecitinasa que actúa en presencia de iones calcio; posee acciones letales, necrotizantes y hemolíticas, su acción letal se debe fundamentalmente a la división de la lecitina de las membranas

celulares en fosforilcolina y diglicérido y como la lecitina está presente en las membranas de diferentes tipos de células, la toxina puede causar lesiones en diferentes partes del organismo (Holland, K.T. *et al.*, 1987).

B) INTOXICACIÓN ALIMENTARIA. Una de las enfermedades mas frecuentes es la intoxicación alimentaria provocada por la acción de una enterotoxina en el tracto gastrointestinal la cual está relacionada con el proceso de esporulación de la bacteria (Labbé, R.G, 1989). Esta enfermedad ocurre al ingerir alimento contaminado con un gran número de células vegetativas (mas de 10^6 UFC/g), las cuales esporulan y producen la enterotoxina en el intestino. Se ha encontrado que esta toxina reconoce receptores específicos presentes en la membrana de las células del borde de cepillo, en la región del ileon del intestino delgado, donde provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana de las células intestinales, lo que ocasiona un aumento en el flujo de agua y sodio hacia el lumen intestinal, así como falta de absorción de glucosa, desencadenándose la sintomatología (Wnek, A.P. y B.A. McClane, 1989). La intoxicación alimentaria se presenta de 6 a 20 h después de la ingestión del alimento contaminado y consiste en una diarrea profusa, acompañada de dolor abdominal y rara vez se presentan mareos y vómito (McClane, B.A., *et al.* 1988; Uemura, T., 1978; McDonel, J. y B. McClane, 1986). Esta enfermedad puede ocasionar la muerte en individuos débiles y de edad avanzada (Labbé, R.G., 1989; Shandera, W.X, 1983).

Se ha determinado que la enterotoxina es una proteína constituida por una sola cadena de 320 aminoácidos, con un peso molecular de 35 kDa, un punto isoeléctrico de 4.3, sensible al calor, y antigénica (Yotis, W.W. y C. Castimpolas, 1975; McClane, B.A., *et al.* 1988, Duncan, C.L., *et al.*, 1969).

La enterotoxina de *C. perfringens* también se ha asociado a una colitis que se caracteriza por diarrea infecciosas con duración de 9 a 10 días, esta última se presenta con dolor abdominal severo y vómito pero no se ha encontrado relación con una intoxicación alimentaria (Borriello, S.P, 1985). La enfermedad se presenta principalmente en ancianos tratados con antibióticos y se piensa que es producida por una sobrepoblación de *C. perfringens* en el intestino donde libera la enterotoxina (Borriello, S.P. *et al.*, 1984).

PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Todos los organismos desde bacterias y hongos hasta plantas y animales, responden a una gran variedad de factores adversos, induciendo la síntesis de un pequeño grupo de proteínas llamadas proteínas del estrés. Se cree que la función de estas proteínas es proteger a las células del cambio adverso el cual podría ser letal.

Hasta hace 10 años la función de estas proteínas se desconocía, esto debido en parte, a la complejidad de las diferentes formas de proteínas del estrés. La mayoría de éstas son producidas en pequeñas cantidades bajo condiciones fisiológicas normales, sin embargo bajo las condiciones de estrés,

la síntesis de estas proteínas se ve incrementada notablemente (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990).

Los primeros estudios se hicieron hace 20 años, cuando se reportó un pequeño número de polipéptidos que fueron inducidos por un tratamiento de choque térmico moderado en glándulas salivares de *Drosophila melanogaster* (Tissieres *et al.*, 1974).

La temperatura es uno de los factores más importantes en el crecimiento y metabolismo de los organismos, por lo tanto es de esperarse que la inducción de las proteínas del estrés se haya estudiado en respuesta a este factor. En los últimos 15 años, el estudio de los organismos ha mostrado que cuando las células son sometidas a temperaturas ligeramente arriba de su temperatura óptima de crecimiento, responden induciendo la síntesis de un grupo de proteínas las cuales son conocidas como proteínas de choque térmico (PCHT), (Farber, J.M., y B.E. Brown, 1990). Ahora se ha establecido que esta respuesta es también inducida cuando los organismos son expuestos a otros tipos de estrés del ambiente diferente al calor, como son cambios en el pH (Heyde, M. y R. Portailer, 1990), la presencia de agentes oxidantes (Begonia, G.B., y M.L. Salin, 1991), cambios de presión (Qoronfleh, M.W., y U.N. Streips, 1987), la acción de alcoholes y metales pesados (Watson, K, 1990) y agentes que dañan ADN, tales como el ácido nalidíxico y la radiación ultravioleta (Kreuger, J. y Walker, G, 1984), de tal manera que el término "proteínas de estrés" se aplica para describir a esta clase de proteínas.

Las principales (PCHT) se han clasificado en cuatro familias de acuerdo a sus pesos moleculares: Las PCHT de elevado peso molecular de 83-90 kDa; PCHT 70, variando de 66-78 kDa; las PCHT 60, presentes en bacterias, mitocondrias y cloroplastos a las cuales se les ha llamado chaperoninas (Hemmingsen *et al.* 1988); y las PCHT pequeñas, un grupo diverso de proteínas de 15-30 kDa o mayores, encontradas en levaduras, células humanas y aproximadamente 30 formas diferentes encontradas en plantas superiores. Además se han encontrado PCHT de pesos moleculares elevados de entre 100-110 kDa con propiedades muy diferentes a las de las otras familias (Subject *et al.* 1983; Shyy *et al.*, 1986).

Escherichia coli es un procarionte altamente estudiado en este aspecto. De todas las PCHT de *E.coli*, dos han sido ampliamente estudiadas, la GroEL y la DnaK. Ambas se sintetizan en condiciones normales, sin embargo, durante un período de estrés la síntesis se ve incrementada notablemente (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990). La DnaK es una proteína inducible con una gran variedad de funciones, tiene un peso molecular de 69 kDa por lo que se le incluye en la familia de PCHT 70 (Herendeen, S.L., *et al.*, 1979), es considerada una chaperona molecular ya que se ha visto que tiene función mediadora en el ensamblaje correcto de las proteínas oligoméricas, también interviene en la disociación de agregados proteínicos y el mantenimiento de algunos polipéptidos en estado no plegado, lo que facilita la translocación a través de la membrana y el posterior aceleramiento del plegamiento y oligomerización (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990). Muy recientemente Bukau. *et al.* (1993), han

realizado trabajos de inmunolocalización y se ha establecido que la PCHT DnaK se localiza principalmente en el citosol, aunque un pequeño porcentaje se ha localizado en las membranas. La PCHT GroEL pertenece a la familia de PCHT 60. Esta familia está compuesta de 14 subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 58 kDa (Zeilstra-Ryalis, J. *et al*, 1991) y una característica importante, es que en un mismo organismo se ha encontrado la presencia de varias proteínas de diferentes pesos moleculares que son homólogas a la GroEL de *E.coli* (E. Wallington y P. Lund., 1994). Se cree que esta proteína tiene una función importante en la replicación de ADN y en la transcripción, y que facilita el plegamiento post-transcripcional y el transporte de proteínas oligoméricas a través de la membrana (Khandekar, S.S. *et al*, 1993). Además se cree que esta proteína puede actuar como antígeno causante de enfermedades autoinmunes en las diferentes formas de vida (Cohen, I.R, 1991). Se ha encontrado su localización en la membrana y en el citosol (Eschweiler *et al*, en 1993).

La respuesta al choque térmico tiene dos características muy importantes: a) es universal, ya que se ha encontrado en casi todos los organismos estudiados (Bosch, T.C.G., *et al.*, 1988), y b) las PCHT presentan un alto grado de conservación evolutiva, sobre todo la familia de los 70 kDa (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990) ya que se ha observado una homología del 70% entre las proteínas de 70 kDa del humano con la de *D. melanogaster* y de un 50% con la proteína homóloga de *E. coli* (Morimoto, R.I, 1990).

Mantis, N. J., et al, (1992), reportaron que *Agrobacterium tumefaciens* presentaba una respuesta similar a la mostrada por *E. coli* y dicha respuesta podía ser inducida por calor y además por otras condiciones de estrés como la exposición a pH ácido, etanol, cloruro de cadmio y en forma lenta por mitomicina C.

Frecuentemente los microorganismos se enfrentan a factores adversos del medio ambiente, tal es el caso de *Bacillus subtilis*, el cual debe de desarrollar diferentes estrategias de adaptación, entre ellas la inducción de proteínas de estrés. Hecker, et al, en 1990, determinan que hay en esta bacteria dos grupos de proteínas de estrés, en donde el primer grupo es específico de un factor (un solo estímulo) mientras que el segundo grupo es inducido por una condición restrictiva del crecimiento en general (calor, sales o inanición a la glucosa, oxígeno o fosfatos). Estudiando este mismo aspecto Bernhardt, J, et al, (1997) observaron la inducción de 42 proteínas de estrés general en *B. subtilis* cuando se sometió a choque térmico, a sales y etanol, además de inanición a glucosa y fosfatos. El análisis mediante electroforesis bidimensional de estas proteínas permitió clasificarlas en 5 subgrupos de acuerdo a su respuesta en cuanto al factor restrictivo del crecimiento siendo éstos: (I) proteínas nuevas sintetizadas en respuesta al estrés; (II) proteínas cuyo grado de síntesis se aumentó ; (III) proteínas en las que se observó una disminución en su síntesis después del cambio; y (IV) proteínas cuya síntesis fue totalmente bloqueada, determinando que el grado de síntesis de proteínas

de estrés general constituyó más del 40% de síntesis de proteína total en estas células estresadas.

El oxígeno usado durante la respiración aeróbica es uno de los muchos procesos celulares que crean problemas especiales a las células como lo es la acumulación de agentes oxidantes lo cual nos puede indicar una señal de estrés. La respuesta al estrés oxidativo ha sido muy estudiada en bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Ahern, H.1991).

A) PROTEÍNAS DE CHOQUE FRÍO

Se han realizado estudios en algunos organismos para probar si la baja temperatura da una respuesta homóloga a la del choque térmico, ya que la estabilidad de la mayoría de las proteínas celulares no cambia dentro del rango de temperatura normal sin embargo se ha observado que el nivel de inducción se aumenta o disminuye si las células se someten a temperaturas extremas (Herendeen, S.L, *et al.*, 1979).

Se han realizado un gran número de investigaciones sobre la respuesta al choque frío, en los cuales se han encontrado la expresión de un cierto número de proteínas, a las cuales se les ha llamado proteínas de choque frío (PCHF). Este tipo de respuesta se ha descubierto tanto en organismos procariones como en eucariotes, siendo las funciones de estas proteínas en general la de proteger a las células contra las condiciones estresantes.

Se ha demostrado que *E. coli* responde a temperaturas frías cuando se transfieren los cultivos celulares de 37 a 10 °C induciendo la formación de 13 polipéptidos, de los cuales ninguno de ellos corresponde a las proteínas de

choque térmico mencionadas anteriormente, (Jones, P.G., y R.A. VanBogelen, 1987). De las 13 proteínas, una, la F10.6 solo se sintetiza a bajas temperaturas; mientras que las otras 12 pueden producirse cuando la célula crece a su temperatura normal de 37 °C, sin embargo su síntesis se incrementa de 3 a 300 veces más a bajas temperaturas. Debido a que esta proteína (F.10.6) tiene el más alto grado de inducción en respuesta al choque frío ha sido designada la principal proteína de choque frío (PCHF).

Por otro lado Goldstein, J., et al., 1990, han observado que en *E. coli* la proteína citoplásmica de 7.4 kDa la cual no se detecta a 37 °C, es rápidamente inducida cuando se cambia la temperatura a 10 o 15 °C. El gene que codifica para esta proteína CS 7.4 ha sido designado *cspA* y se ha demostrado que codifica para una proteína de 70 residuos de aminoácidos. En el caso de *E. coli*, datos preliminares indican que esta proteína u otro factor similar producen protección en *E. coli* contra el daño debido a la formación de cristales de hielo (Goldstein, J., et al., 1990).

Se ha visto que la expresión del gene *cspA* de *E. coli* es específicamente inducida a bajas temperaturas y esta proteína (CS7.4 o CspA) alcanza niveles de un 13% de síntesis de la proteína total dentro de un periodo de 1-1.5 h después del cambio de la temperatura a 10 °C. Se ha logrado la clonación de este gene y se ha determinado su secuencia en el DNA (Goldstein et al., 1990). Asimismo se ha identificado la región promotora de este gene y se ha sugerido la existencia de un factor de transcripción para su expresión a bajas temperaturas. En estudios realizados por Sang, J.L et al., en 1994, se

determinó que *E. coli* contiene 4 genes *csp* de los cuales *cspA* y *cspB* son genes inducibles por un choque frío, mientras que los genes *cspC* y *cspD* no lo son y se pudo observar que la proteína CspA tienen una gran homología con las proteínas que enlazan el DNA a la caja Y en eucariotes por lo que se piensa que las proteínas Csp son altamente conservadas evolutivamente. Se ha determinado que esta proteína consiste de 70 residuos de aminoácidos entre ellos, 6 fenilalaninas, una tirosina, un triptofano y siete residuos de lisina (Goldstein *et al.*, 1990). Se ha considerado como una función general de la proteína CspA, la interacción con el DNA y posiblemente con el RNA resultando ser esencial como un activador transcripcional de choque frío principalmente durante la iniciación de la transcripción. También se le ha asociado a esta proteína con el desdoblamiento de moléculas plegadas de RNA particularmente a bajas temperaturas, esta función de "RNA chaperona" se ha reportado también en organismos eucarióticos (Jones, P.G, *et al.*, 1994). Otra de las funciones de esta proteína y su familia es que puede enmascarar a un grupo de mRNA para inhibir su traducción.

La respuesta fisiológica de *E. faecalis* JH2-2 al choque frío fue estudiado por Thammavongs, T., *et al* (1996), ellos observaron que el crecimiento de la bacteria a una temperatura subletal (8-16 °C) indujo una resistencia a temperaturas frías extremas observándose un incremento en la habilidad de las células para soportar periodos cortos de congelamiento/descongelamiento (-20°C/+37 °C). Por otra parte el incremento del periodo de incubación a una

temperatura baja subletal permitió un alto grado de adaptación a la baja temperatura.

En *B. subtilis*, la proteína CspB parece estar implicada en la tolerancia a temperaturas de congelamiento. Willimsky *et al.*, en 1992, han logrado identificar la principal proteína de choque frío en *B. subtilis* y han determinado la estructura del gene, observando que el producto de este gene contiene 67 residuos de aminoácidos y tiene un 61% de homología con la de *E. coli*.

Se han hecho estudios para determinar los cambios en el grado de síntesis de proteínas en la bacteria psicrófila de género *Vibrio sp* y se ha observado que después de un cambio en la temperatura de 0 a 13 °C se incrementa el grado de síntesis de al menos 25 proteínas, mientras que en un cambio de 13 a 0 °C se observó un incremento en la síntesis de 39 proteínas (Araki, T., 1991). Se sugiere que estas diferencias en el grado de síntesis de proteínas pueden estar asociadas con una respuesta regulatoria del nivel de transcripción y traducción, y se piensa que estos cambios representan una medida adaptativa para crecer eficientemente a estas temperatura.

La síntesis de proteínas ha sido implicada como uno de los principales factores en la habilidad de los microorganismos psicrófilos y psicrótrófos para crecer a bajas temperaturas tales como la de su crecimiento mínimo a 0 °C o menos (Gounot, A.M., 1991) Se ha demostrado que la disminución rápida de la temperatura ocasiona la síntesis de proteínas específicas de choque frío en muchos organismos, pero también se ha observado la síntesis de proteínas de aclimatación al frío (PAF) las cuales son sintetizadas en un alto grado

durante un crecimiento continuo del organismo a bajas temperaturas (Guy, C.L., 1987). Roberts, M.E, *et al.*, en 1992 estudiaron la inducción de PCHF y PAF en una bacteria psicofílica (*Aquaspirillum arcticum*), observando que los tratamientos de choque frío de 10 a 0 °C, 5 a 0 °C y 10 a 5 °C provocaron la inducción de 14 PCHF, de las cuales 6 fueron inducidas por los tres tratamientos. Por otro lado se observó la síntesis de 8 PAF como respuesta al crecimiento continuo a 0 °C, 5 de las cuales fueron PCHF. Se sugiere que estas proteínas pueden tener en parte una relación común en la adaptación a las bajas temperaturas.

Un determinante molecular de crecimiento psicotrófico puede involucrar cambios cualitativos y cuantitativos en la síntesis de proteínas a bajas temperaturas. En estudios realizados por Whyte e Innis (1992) en *Bacillus psychrophilus* y un mutante sensible al frío se ha determinado la inducción de PCHF y PAF cuando son sometidos a choques fríos de 20 a 0, 10 y 15 °C y a un crecimiento continuo a las mismas temperaturas. Se ha visto que la mayor inducción se presenta a medida que el tratamiento es más severo ya que en el CHF de 20 a 0 °C como en el crecimiento a 0 °C se observó la síntesis de un mayor número de proteínas, sin embargo se presentó la pérdida en la inducción de 2 PCHF de 61 y 34 kDa en el mutante sensible al frío. Se piensa que estas 2 proteínas pueden estar involucradas en la inhabilidad del mutante para crecer a bajas temperaturas pero que al mismo tiempo puedan ser importantes en la capacidad de esta bacteria psicotrofa para crecer en estas condiciones.

Se han realizado estudios en *Listeria monocytogenes*, acerca del efecto que tiene un choque frío y el crecimiento continuo a baja temperatura ya que se ha demostrado que este microorganismo tiene la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, representando esto un efectivo enriquecimiento para el organismo, Bayles, D.O. (1996). Se ha demostrado que cuando esta bacteria se cambia de 37 a 5 °C es capaz de sintetizar 12 PCHF (48, 41, 21.8, 21.1, 19.7, 19.2, 18.8, 18.2, 17.2, 15.5, 14.5 y 14.4 kDa). Cuando este microorganismo se cultiva en un crecimiento continuo a 5 °C, se observa la síntesis de PAF, cuatro de las cuales pertenecen a las PCHF.

De igual manera (Cloutier, J., *et al*, 1992) han realizado estudios en varias especies de *Rhizobium* y se ha observado que tanto las cepas mesofílicas como las psicotróficas muestran la síntesis de proteínas de choque frío (52, 38, 23, 22,17 y 11 kDa) a temperaturas no permisibles para el crecimiento como -2,-5 y -10 °C. Sin embargo se describe que esta adaptación al frío no proporciona una mayor supervivencia a temperaturas de congelación para estos microorganismos ya que ésta disminuyó en todas las cepas hasta un 50% con el choque frío.

El estudio de la respuesta al choque frío es relativamente reciente comparado con el estudio de la respuesta inducida por otro tipo de estrés, sin embargo se ha obtenido gran información acerca de la identificación de muchas proteínas de choque frío incluyendo una proteína que tiene en su secuencia una gran similaridad con otras proteínas procarióticas y eucarióticas, muchas

de estas proteínas están involucradas en una serie de procesos que llevan al organismo a ser tolerante a temperaturas frías extremas.

Debido a la importancia de *C. perfringens* como patógeno de alimentos pensamos que es de gran interés el estudio de la inducción de las PCHF ya que se cree que éstas facilitan la supervivencia del patógeno al proporcionar protección contra choques fríos, así mismo, estas proteínas pueden constituir una respuesta adaptativa de la bacteria que facilita su crecimiento a bajas temperaturas.

B) PROTEÍNAS DE CHOQUE ÁCIDO

El pH ácido es una de las condiciones desfavorables más frecuentemente encontradas por los microorganismos; el drenaje de las minas ácidas, la lluvia ácida, la materia orgánica en descomposición, los desechos industriales y los ácidos débiles producidos por ellos mismos contribuye al estrés ácido. La habilidad para detectar y responder a cambios potencialmente letales en el pH del medio ambiente es muy importante en la supervivencia de las bacterias (Foster, J.W., et al., 1995). El estrés ácido puede ser descrito como el efecto de la combinación biológica de un pH bajo y los ácidos orgánicos débiles presentes en el medio ambiente entre ellos ácidos grasos volátiles como el butirato, el propionato y acetatos producidos como un resultado de la fermentación.

Se ha reportado que algunos de los microorganismos sobre todo los neutrófilos tienden a desarrollar varios sistemas de supervivencia en medios de pH bajo. Estos organismos detectan el medio ambiente desfavorable y experimentan una respuesta molecular programada en donde se sintetizan proteínas inducidas por el estrés. Hasta hace 10 años se conocía muy poco acerca de los mecanismos de supervivencia ácida inducible. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae: *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* han sido los más estudiados con respecto al estrés ácido. En su habitat natural estas bacterias se enfrentan constantemente a diversos tipos de estrés del medio ambiente, pero el más común es el ácido, cuando viajan a través del tracto gastrointestinal en donde se enfrentan además a diversos ácidos grasos volátiles presentes en el intestino y heces. Muchas de estas condiciones de estrés son también parte de la defensa del huésped hacia la infección, por lo que la habilidad de la bacteria patógena para detectar y responder a estas condiciones desfavorables contribuye en gran manera en su patogenicidad (Foster, J. W, 1995).

Los microorganismos neutrófilos tales como *S. typhimurium* pueden crecer en un rango de pH de 5-9 debido a que el mecanismo de homeostasis de pH mantiene un pH intracelular constante sobre un gran rango de valores de pH externo durante el crecimiento.

Este fenómeno se basa en la modulación de la bomba de protones así como del sistema antiport de K^+ y Na^+ , el cual capacita a la célula para mantener en pH interior cerca de 2 unidades de pH mas alcalino con respecto

al pH exterior de la célula. Este sistema de control de la bomba de protones es de gran importancia para el crecimiento y la sobrevivencia en medio ambientes moderadamente ácidos, mas sin embargo este sistema de homeostasis de pH deja de funcionar cuando se incrementa la acidez (Foster, J. W, 1992).

Stocker, B. A, *et al* (1986), observaron que *Salmonella* sp tiene una gran habilidad de resistir medios ambientes ácidos, principalmente después de la invasión de la mucosa intestinal por esta bacteria (Finlay, B.B. 1989), lugar a que está expuesta a la acción de fagolisosomas dentro de los cuales puede sobrevivir a pesar de que ahí se presenta un pH de 3 o 4, normalmente bactericida *in vitro* para esta bacteria (Field, P.I, *et al.*, 1989).

Foster en 1990, probó la habilidad adaptativa de *S. typhimurium* para llegar a ser ácido tolerante, observando que después de transferir las células de un pH de 7.6 a 5.9 éstas fueron de 100 a 1000 veces mas resistentes a subsecuentes exposiciones a pH ácidos fuertes. Esta respuesta de tolerancia a la acidificación requirió de la síntesis de proteínas de choque ácido.

En estudios realizados por Foster, J. W. (1991) se encontró que la expresión de varios genes en *Salmonella* sp era controlada en parte por el pH y que el valor óptimo para su inducción era de 6.0, observándose también cambios muy notorios en el grado de crecimiento.

Se han realizado estudios con *S. typhimurium* y se ha demostrado que tiene la habilidad de sobrevivir a pH muy ácidos (pH 3.0 a 4.0), si primero es adaptada a un pH moderado (5.5 a 6.0), también llamado pre-choque o fenómeno conocido como respuesta a la tolerancia ácida (RTA), el cual

involucra la síntesis de un grupo de proteína conocido como proteínas de pre-choque y así mismo se ha observado que si se somete a las células a un choque ácido, que implica el cambio de las células de condiciones alcalinas (pH 7.7) a una ácida (pH 4.5 o menos), el microorganismo no se reproduce y experimenta un cambio en la expresión de por lo menos 52 proteínas. Se ha demostrado que la inducción de proteínas de pre-choque y de choque ácido son procesos independientes, sin embargo *S. typhimurium* sobrevive a condiciones de acidez extrema solo si se inducen ambos sistemas (Foster, J. W, 1991).

Se ha usado diferente terminología para describir los sistemas de respuesta al choque ácido: la resistencia ácida (RA), tolerancia ácida (TA) y adaptación ácida (AA) son términos usados para describir la supervivencia a un estrés de pH bajo.

El mecanismo de RA solo se presenta en células en fase estacionaria, creciendo en un medio complejo a diferencia de la TA que se presenta en células en fase exponencial y en medios mínimos.

Hickey, E. W, *et al.*, (1990) estudiaron el efecto inducido en *E. coli* y *S. typhimurium* por el pH bajo sobre la síntesis de proteínas cuando los cultivos se cambiaron de pH 7 a 5 y sobre el pH interno de las células cuando éstas crecieron a pH de 7.0 y de 5.0 en un medio mínimo suplementado (MMS). El análisis de las proteínas marcadas con $H_2^{35}SO_4$ durante 20 min reveló que en *E. coli* el grado de síntesis de 13 polipéptidos se elevó de 1.5 a 4 veces, mientras que en *S. typhimurium* se incrementó de 2 a 14 veces la síntesis de 19

polipéptidos con respecto al control. Sin embargo el crecimiento de *E. coli* en un caldo complejo a pH de 5.0 mostró la inducción de 5 polipéptidos específicos por bajo pH. También se mostró que el pH intracelular de *E. coli* disminuyó mas severamente que el de *S. typhimurium* a un pH externo de 5.0, ocasionando la disminución de un 50% en el grado de crecimiento con respecto a *S. typhimurium*, sugiriendo que al menos en un MMS, *S. typhimurium* es mas adaptativa al estrés por pH bajo que *E. coli*.

Gorden y Small en 1993, estudiaron la resistencia ácida en bacterias entéricas, demostrando que algunas especies de *Shigella*, *E. coli* y *Salmonella* tienen la capacidad de sobrevivir a pH 2.5 durante 2 h.

Las bacterias patógenas entéricas pueden estar sujetas a severas condiciones de estrés en el medio ambiente acuático, sin embargo estas bacterias presentan una vía oral de infección y deben se cruzar la barrera gástrica para causar la enfermedad en el huésped. Gauthier, M. J, *et al.*, (1994), estudiaron la habilidad de varias enterobacterias, incluyendo especies de *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Yersinia* para adquirir resistencia a condiciones ácidas semejantes a las del estómago (pH 2.5 por 2 h) después de su incubación en aguas oligotrópicas o agua de mar. Ellos observaron que la RA de *E. coli*, *Shigella* y *S. typhimurium* se incrementó de 100 a 100 mil veces después de 100 min en agua de mar y dependió de la fase de crecimiento de la bacteria y de la síntesis de nuevas proteínas.

Estudiando el mecanismo de RA en *Shigella flexneri* en fase estacionaria, Waterman, S. y P.L.C. Small, (1996), determinaron que la bacteria tenía la capacidad de sobrevivir a un pH de 2.5 y que esta resistencia podía contribuir en su patogenicidad. Así mismo se observó que este mecanismo dependía de la síntesis de proteínas así como del factor sigma (σ).

Estudios realizados por Heyde, M, y Portalier, R, (1990) con respecto a este mecanismo en *E. coli*, demuestran que después del cambio de pH de 6.9 a 4.3, se indujo la síntesis de por lo menos 16 proteínas, 7 de las cuales fueron específicas del cambio ácido y fueron llamadas proteínas de choque ácido (PCHA). La inducción de una de esas proteínas fue dependiente del σ , mientras que las otras fueron independientes de este factor.

La RTA en *S. typhimurium* involucra varios sistemas, en fase logarítmica y en fase estacionaria. Algunos de estos sistemas son dependientes de un σ alternante para RNA polimerasa, mientras que otros sistemas son independientes de este factor. Asociado a la RTA está la síntesis de una serie de proteínas inducibles por el choque ácido (PCHA), 51 para la RTA de fase logarítmica y 15 para la RTA de fase estacionaria. Algunas de estas proteínas requieren para su síntesis del factor sigma, mientras que otras requieren de la proteína Fur, regulador de la toma de hierro.

Investigando este mismo aspecto, Foster, J. W, (1991, 1992) observó que en *S. typhimurium* el sistema RTA produce una función homeostática de pH inducible que sirve para mantener el pH intracelular arriba de 5.0-5.5, siendo este mecanismo sensible a los inhibidores de síntesis de proteínas y opera

solamente para aumentar el pH intracelular cuando el extracelular es menor de 4.0. En contraste con esto se encontró que la homeostasis de pH constitutiva no fue afectada por los inhibidores de síntesis de proteínas y solamente fue efectiva a valores de pH extracelular arriba de 4.0, por lo tanto se demostró que en esta bacteria existen dos sistemas de homeostasis de pH; el primero que es un sistema constitutivo adecuado para actuar a un estrés de pH arriba de 4.0 y el segundo que es inducible y opera eficientemente cuando el pH externo es menor a éste. Se determinó también que la supervivencia de las células asociada a la RTA está muy relacionada con una ATPasa translocadora de protones durante la exposición a cambios ácidos severos y que esta tolerancia ácida adaptativa es importante para que las especies de *Salmonella* sobrevivan a condiciones ácidas tanto en el medio ambiente como en un huésped infectado.

Se ha observado que *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* también presenta una RTA. Cuando las células se sometieron a un pre-choque y posteriormente a un choque ácido a pH de 3.9 se pudo demostrar la inducción de 33 polipéptidos. Sin embargo no se observó variación en la RTA cuando se adicionó cloranfenicol durante el pre-choque. Se sugiere que la síntesis de proteínas no es necesaria para la supervivencia en condiciones de acidez extrema (Harthe, A., *et al.*, 1996).

El σ codificado por *rpoS* es un regulador crítico de la fisiología de células en fase estacionaria pero es también importante en células en fase exponencial y regula un aspecto importante de la tolerancia ácida. La inducción del factor

sigma por el choque ácido parece ser controlado por una proteína de 38 kDa codificada por el gene de la virulencia del ratón *mviA*. La proteína MviA controla la acumulación del factor y de las proteínas de choque ácido dependientes del factor regulando la proteólisis del mismo. Por lo tanto MviA estimula a que el factor sigma cambie en ausencia de estrés permitiendo su acumulación en presencia de éste (Bearson, S, *et al.*, 1997).

Estudios del mecanismo de tolerancia ácida en *S. typhimurium*, por Baik, S *et al.*, (1996), han demostrado que la RTA inducida era importante en la supervivencia, si previamente había una exposición a ácidos débiles. También observaron que el σ tenía un papel importante en la protección contra los efectos letales de los ácidos. Además se observó que este factor estaba involucrado en la RTA (Foster, J, W, 1993; Lee, S. I., *et al.*, 1994).

Lee, I.S., *et al.*, (1994) determinaron la capacidad de tolerancia ácida de células en fase estacionaria de *S. typhimurium*. Ellos encontraron que las células en fase estacionaria presentaron una ATR inducible a pH bajo (ATR de fase estacionaria) la cual proporcionaba un alto nivel de resistencia ácida pero involucró la síntesis de pocas proteínas y que es distinta de la RTA en fase logarítmica .

Estudiando este mismo aspecto, Yong, K.P, *et al.*, (1996), observaron que la RTA en *S. typhimurium* incluye los dos sistemas; en fase logarítmica y en fase estacionaria, pero que la RTA de fase log requiere de dos componentes para la máxima tolerancia ácida: un sistema de homeostasis inducible y una serie de proteínas de choque ácido. Así mismo determinaron

que la lisina descarboxilasa inducible por bajo pH contribuyó significativamente al mecanismo de homeostasis de pH en un medio ambiente de pH 3.0 y que ambas condiciones; la lisina descarboxilasa y las proteínas de choque ácido se requirieron para la tolerancia ácida.

Foster, J. W, (1993) determinó que durante la RTA en *S. typhimurium* se sintetizaron 43 proteínas de choque ácido pero que varias de estas proteínas importantes para la tolerancia a pH de 3.3 eran solo sintetizadas transitoriamente ya que su desaparición después de 30 a 40 min de un choque ácido a pH de 4.4 coincidió con su inhabilidad para sobrevivir a un subsecuente cambio a pH de 3.3, estableciendo que estas proteínas de choque ácido son una característica esencial para la tolerancia ácida inducible y que tanto la acidificación intracelular como la del exterior de la célula son una señal disparadora de su síntesis.

Hickey, E. W, *et al.*, (1990) estudiaron el efecto inducido en *E. coli* y *S. typhimurium* por el bajo pH, sobre la síntesis de proteínas cuando los cultivos se cambiaron de pH 7 a 5 y sobre el pH interno de las células cuando éstas crecieron a pH de 7.0 y de 5.0 en un medio mínimo suplementado (MMS). El análisis de las proteínas marcadas con $H_2^{35}SO_4$ durante 20 min reveló que en *E. coli* el grado de síntesis de 13 polipéptidos se elevó de 1.5 a 4 veces, mientras que en *S. typhimurium* se incrementó de 2 a 14 veces la síntesis de 19 polipéptidos con respecto al control. También se mostró que el pH intracelular de *E. coli* disminuyó más severamente que el de *S. typhimurium* a un pH

externo de 5.0, sugiriendo que al menos en un MMS, *S. typhimurium* es más adaptativa al estrés por pH bajo que *E. coli*.

En estudios realizados con *Streptococcus thermophilus* PB18, González, M.H, *et al.*, (1997) determinaron los patrones de proteínas en una y dos dimensiones de células creciendo en fase exponencial y estacionaria de crecimiento y ellos observaron la sobreexpresión en fase estacionaria de una proteína de 16 kDa en una electroforesis unidimensional después de 2 h del choque ácido, sin embargo no se expresó en células en fase estacionaria en un medio a una concentración mínima de lactosa en el cual el pH del medio fue de 5.5 comparado con el de 4.7 alcanzado en un medio con una concentración normal de lactosa. Los resultados mostraron que esta proteína es expresada en respuesta al medio ambiente ácido y no en respuesta a la fase de crecimiento. El análisis bidimensional mostró que 9 proteínas fueron expresadas solo durante la fase exponencial y otras 10 solo durante la fase estacionaria y que la banda observada de 16 kDa en el análisis unidimensional correspondió a una familia de proteínas de 16 kDa determinada en el análisis bidimensional, cuya expresión se incrementó 8.5 veces cuando el pH extracelular alcanzó valores abajo de 5.0.

La RTA en *L. monocytogenes* fue estudiada por Davis, M.J, *et al* (1996) en donde determinaron un incremento en la tolerancia ácida a pH 3.0 durante su crecimiento en fase exponencial después de una exposición previa a un pH 5.0/1 h y que la expresión total de la RTA requirió de la síntesis de nuevas proteínas ya que el cloranfenicol, inhibió la inducción de esta tolerancia.

Observaron un cambio en la expresión de por lo menos 23 proteínas, mostrándose inducción en 11 de ellas, mientras que 12 fueron reprimidas. *L.monocytogenes* también mostró resistencia ácida cuando las células crecieron en fase estacionaria sin embargo esta respuesta pareció ser independiente de la RTA observada durante el crecimiento exponencial.

También se investigó la respuesta de *Brucella suis* 1330 y *B. canis* RM6/66 durante su crecimiento a pH ácido y la inducción de la RTA y se observó que ninguna de las dos especies presentó una resistencia ácida de fase estacionaria dependiente de *rpoS*; sin embargo tanto *B. suis* como *B. canis* desarrollaron una importante RTA cuando se desarrollaron en una condición de acidez media (Kulakov, Y. K., *et al*, 1997).

Karem, *et al.*, (1994) estudiaron la respuesta de *Aeromonas hydrophila* al estrés ácido y demostraron que esta bacteria exhibía una importante RTA, capaz de proteger a la célula de una exposición a pH de 3.5 después de una exposición previa a un pH de 5.0 por 20 min. La importancia de la síntesis de proteínas en este proceso se observó mediante la adición de cloranfenicol al medio durante la adaptación al ácido, ya que impidió el desarrollo de la tolerancia.

El mecanismo de RTA también ha sido estudiado en *Mycobacterium smegmatis* en donde se observó que una exposición a un pH ácido subletal proporcionó protección a una subsecuente exposición a un pH letal. Además se determinó que esta adaptación dependía de la síntesis de proteínas (O'Brien, L. M, *et al.*, (1996).

Estos estudios se han realizado también en las bacterias malolácticas o bacterias del ácido láctico las cuales llevan a cabo la transformación del ácido málico a ácido láctico y CO₂ de gran importancia en la tecnología de la industria vinícola. Estas investigaciones realizadas por Cachon, D.Z., *et al.*, (1995) determinaron que *Leuconostoc oenos* cuyo límite ácido de crecimiento es de pH 3.0 sobrevivió a un pH de 2.6 después de que las células fueron sometidas a un pH adaptativo. La respuesta al estrés ácido resulta ser muy importante en bacterias del ácido láctico ya que su crecimiento y transición a la fase estacionaria es acompañado por la producción de ácido láctico el cual acidifica el medio, *inhibe la multiplicación y ocasiona la muerte celular*. Esta respuesta al estrés ácido fue estudiada en *Lactococcus lactis* MG 1363 donde se observó una tolerancia ácida ya que sobrevivió a un pH de 4.0 cuando las células se adaptaron primeramente a un pH entre 4.5 y 6.5 durante 5 a 15 min. Se determinó también que esta adaptación requirió de la síntesis de proteínas indicando esto que la condición ácida induce la expresión de nuevos genes sintetizados y que *L. lactis* presenta una respuesta inducible al estrés ácido en fase exponencial (Rallu, F, *et al.*, 1996).

En este mismo año Hartke, A, *et al.*, estudiaron también la respuesta de estrés al ácido láctico en *L. lactis* subespecie *lactis* y observaron un gran incremento en la supervivencia de las células a un pH de 3.9 cuando las células fueron tratadas previamente por 30 min con un pH de 5.5. Mediante el análisis del extracto de proteína total determinaron la inducción de 33 polipéptidos durante la respuesta a la tolerancia ácida.

La tolerancia a pH bajos es un mecanismo de gran interés que se ha estudiado también en bacterias del género *Rhizobium*. Correa, O.S, et al, (1997) probaron 7 cepas de *R. loti* para tolerancia ácida a valores de pH de 4.0 a 8.0, observando que las cepas que crecieron a pH 4.0, tuvieron una tolerancia ácida relacionada a la composición y estructura de la membrana ya que el pH provocó la expresión de una proteína de membrana de 49.5 kDa y tres proteínas solubles de 66.0, 58.0 y 44.0 kDa cuya expresión se incrementó cuando las células crecieron a pH 4.0, sugiriendo que la tolerancia ácida en *R. loti* involucra mecanismos constitutivos tales como la permeabilidad de la membrana junto con una respuesta adaptativa como lo es la expresión de algunas proteínas.

Graham, P, H, et al., (1994), establecieron que *R. leguminosarum* bacteria de nódulo de raíz y *E.coli* UB1301 creciendo en fase logarítmica presentaron una RTA cuando crecieron bajo condiciones acídicas medias. Determinaron la muerte celular bajo un choque ácido a pH de 3.0 y encontraron valores de letalidad considerablemente mayores tanto para *R. leguminosarum* como para *E. coli* cuando se trataron a pH de 5.0. Se observó también que las células en fase estacionaria de ambas cepas fueron mas tolerantes al ácido con valores de letalidad de 2 a 5 veces mayor que el de las células creciendo en fase exponencial.

Se ha establecido que las alteraciones en pH y temperatura de crecimiento induce cambios enzimáticos y metabólicos en las células y se pueden manifestar como una alteración en la composición y contenido de los

lípidos de la pared celular. Estas determinaciones fueron corroboradas por Bodnaruk, P. W, *et al.*, (1996) cuando examinaron por medio de cromatografía de gas los extractos de ácidos grasos de tres cepas de *Yersinia enterocolitica* las cuales crecieron a pH de 5, 7 y 9, observando que cuando las células se cultivaron a pH de 5.0 produjeron una gran cantidad de ciclopropano y ácidos grasos saturados, disminuyendo la cantidad de los ácidos grasos insaturados, comparados con los niveles producidos durante el crecimiento a pH de 9.0. Se determinó que a un pH de 5.0 los ácidos grasos saturados comprendieron de un 73-86% del total de ácidos grasos de la célula, mientras que a pH de 9.0 la proporción de ácidos grasos saturados disminuyó a un 47-72%.

La adaptación al ácido por los microorganismos es de gran importancia en la industria alimenticia. En la actualidad los ácidos propiónico, acético y butírico son comúnmente usados para la conservación de alimentos, se ha visto que estos ácidos son constituyentes comunes en diversos nichos ecológicos como el contenido intestinal de humanos, sin embargo, estos ácidos orgánicos pueden tener también un efecto contra el crecimiento y viabilidad de las bacterias (Guifoyle, D.E. y I.N. Hirshfield,1995). Estos investigadores demostraron que la tolerancia a pH ácido (3.5), de células inicialmente crecidas a pH cercano al neutro se incrementa por la exposición al ácido propiónico o butírico al 0.1%. Ellos observaron que la inducción de la arginina y la lisina descarboxilasa son importantes para la supervivencia de *E. coli* que fue expuesta a combinaciones de ácidos ligeros (pH 5.5) y a butirato al 0.5%. Este estudio sugirió que la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta podían

disparar una respuesta de adaptación que pudiera ser importante en la supervivencia de patógenos causantes de brotes por el consumo de alimentos contaminados.

En estudios realizados en *S. typhimurium* se determinó que una exposición de la bacteria a una acidez media a pH de 4.4 indujo una RTA la cual protegió a las células de los ácidos débiles tales como el butírico, acético o propiónico (Baik, H.S, *et al.* , 1996).

La adquisición de tolerancia al pH ácido y la síntesis de PCHA son un factor muy importante que puede influir en la supervivencia de *C. perfringens* y por lo tanto en su patogenicidad. Se sabe que durante su paso por el estómago, esta bacteria es sometida a ambientes ácidos los cuales soporta para llegar al intestino delgado donde finalmente produce la enfermedad. Además es de especial interés estudiar la capacidad de la bacteria para resistir a estos cambios de pH similares a los que son sometidos los alimentos durante su proceso y almacenaje; ya que la presencia del organismo en ellos puede ocasionar enfermedades alimentarias muy importantes. En general existen muchos estudios de las PCHA sobre todo en *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* , mas sin embargo no hay información sobre estas proteínas en *C. perfringens*, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue determinar su presencia en las células vegetativas de esta bacteria y ver su relación con el mecanismo de tolerancia ácida adquirida, ya que en las investigaciones realizadas a la fecha se ha establecido que hay organismos que presentan mecanismos de

adaptación a medios ambientes desfavorables como un cambio en la temperatura o en pH, y que esta supervivencia involucra la síntesis de proteínas, la adquisición de tolerancia, la inducción de proteínas inmunógenas, etc, que les permiten sobrevivir en estas condiciones.

RESPUESTA CRUZADA

Se han realizado diversas investigaciones en el área de la llamada protección cruzada, es decir, la adquisición de tolerancia o resistencia a un cierto tipo de estrés, al ser sometido previamente a un factor estresante diferente. Estudiando este aspecto Berg, G. R., *et al*, (1987), reportaron que las levaduras psicotrofas *Trichosporon pullulans* y *Sporobolomyces salmonicolor*, presentaron la inducción de PCHT cuando las células eran sometidas a anaerobiosis. En otra investigación realizada por Humprey, *et al*, (1991), se reportó que *Salmonella enteritidis* PT4 mostró adquisición de termotolerancia después de una exposición previa a condiciones alcalinas. Se determinó de esta manera, que la adquisición de termotolerancia fue debida a un estrés diferente del choque térmico. Así mismo se ha demostrado por Völker, U., *et al* (1992), que las células de *B. subtilis* podían adquirir halotolerancia al ser sometidas a un choque térmico subletal y al crecer a bajas concentraciones de sal inducía termotolerancia, aunque esta era menos efectiva que la adquirida por un choque térmico.

Estudiando la respuesta de protección cruzada en *Saccharomyces cerevisiae*, Iwahashi, H., *et al*, (1991), encontraron que un choque térmico

proveía de una protección contra un subsecuente daño por presión hidrostática; y que la protección contra altas temperaturas y alta presión podían estar muy relacionadas fisiológicamente.

Un importante efecto de resistencia al ácido acrílico y iones de cobre se observó en células de *E. coli* cuando fueron sometidas a un choque frío de 37 a 5 °C durante 60 min esto debido probablemente a que estos inhibidores pierden su capacidad de penetrar en el organismo debido a un cambio en las porinas después del choque frío. Sin embargo cuando el inhibidor logra penetrar al organismo se ha observado que éste tiene una mayor capacidad de reparación del daño causado ya sea a membranas, DNA o enzimas celulares por los inhibidores (Whiting, G. C., *et al.*, 1995).

Flahaut, S., *et al.*, (1996), observaron que cuando las células de *Enterococcus faecalis* fueron sometidas a un estrés osmótico moderado de NaCl al 6.5% o 52% de sacarosa, se observó la inducción de resistencia a alta presión osmótica en un medio complejo además de una respuesta cruzada al etanol al 22%, a los detergentes, al H₂O₂ y en menor grado a una temperatura letal de 62 °C.

Boutibonnes *et al.*, (1993) demostraron una respuesta cruzada en *E. faecalis* cuando observaron que las células al recibir un tratamiento previo con etanol al 2% ó 4% adquirían un aumento de su termotolerancia y cuando crecía a 45 ó 50 °C se aumentaba su tolerancia al etanol.

Para observar la posibilidad de que un choque térmico o un choque frío confiera protección a las células de *Thiobacillus ferrooxidans* a temperaturas

normalmente letales ya sea altas temperaturas o temperaturas de congelación se estudió la respuesta al choque térmico y al choque frío en diferentes cepas de *T. ferrooxidans*, Huebert *et al* (1995) encontraron que a diferentes temperaturas de choque térmico esta bacteria podía adquirir termotolerancia sin embargo ésta no proporcionaba protección contra la pérdida de viabilidad a la temperatura de congelación de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así mismo se observó la misma respuesta cuando las células se sometieron a un choque frío de 25 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de 25 a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. El análisis de las proteínas de choque térmico reveló al menos la presencia de una nueva proteína y la elevada inducción de ocho proteínas de choque térmico.

Varios estudios realizados nos muestran que la adaptación ácida confiere resistencia a una gran cantidad de condiciones de estrés, incluyendo calor, sales, H_2O_2 , cristal violeta y polimixina B. Sin embargo la adaptación a otros tipos de estrés no induce una significativa tolerancia al ácido. Esto implica que la exposición al ácido puede ser percibida por la bacteria como un indicador de estrés mas general, mientras que el calor, las sales y el H_2O_2 pueden ser señales de estrés mas específicos. Debido a que el choque ácido induce resistencia cruzada a una gran variedad de estrés se ha sugerido que las células que sufren un choque ácido en el estómago puedan ser preparadas para resistir las condiciones desfavorables que se encuentran posteriormente en el intestino (Bearson, S. *et al.*, 1997).

Estudios realizados al respecto en *E. coli* demostraron que el cambio de las células de un pH 7.0 a 5.5 o 6.0 , proporcionó sensibilidad al álcali (pH 9.5)

mediante una rápida respuesta fenotípica inducida. La sensibilidad se redujo a un pH extracelular de 5.0 y se eliminó a un pH de 6.5. Se determinó que esta respuesta fue disparada por una acidificación citoplásmica, más que una externa o periplásmica y fue necesario la síntesis de nuevas proteínas (Rowbury, R.J. et al., 1996).

La protección cruzada también se pudo observar en células de *E. coli* O157:H7 y no O157:H7 que presentaron una RTA y una elevada respuesta al choque ácido de células en fase estacionaria expuestas a ácido láctico; primeramente adaptadas a pH de 5.5 y posteriormente sometidas a un pH de 4.0 lo cual resultó en una protección contra elevadas concentraciones de cloruro de sodio (15%) y de lactato de sodio (30%), sugiriendo al observar esta protección cruzada, nuevas evaluaciones en cuanto a la combinación de este tipo de conservadores como control de este patógeno (Garren, D. M, et al., 1998).

El efecto del choque ácido sobre la resistencia térmica de *L. monocytogenes* también fue estudiada como un mecanismo de protección cruzada por Farber, J.M, (1992) en donde se determinó que una acidificación de las células con ácido clorhídrico o ácido acético por varios periodos de tiempo proporcionó tolerancia a las células de *Listeria* en leche calentada a una temperatura de 58 °C. Se estableció que las células acidificadas durante 1 h con HCl mostraron la mas alta termotolerancia con respecto a los controles cuando se expusieron a 58 °C.

La RTA inducida en *L. monocytogenes* Scott A fue estudiada por Okereke, et al., (1996), cuando cultivaron las células a un pH de 5.4 y posteriormente se transfirieron a un pH de 3.3 y 4.3. Ellos encontraron que las células tratadas con un pre-choque ácido y expuestas posteriormente a un pH de 3.3 fueron de 150 a 7500 veces más resistentes. Sin embargo, en las expuestas a un pH de 4.3 no hubo diferencia en cuanto a las células no tratadas. Así mismo se observó que cuando expusieron las células que presentaron resistencia al pH ácido, a diferentes concentraciones de nisina (0.03, 0.6, 1.2 y 1.5 g/ml), antimicrobiano que se usa en la industria de alimentos como conservador, se encontró que las células fueron ligeramente más resistentes a la nisina que los controles, lo cual indicó que la RTA confería una limitada protección cruzada contra este antibiótico.

Humphrey., et al., (1993), realizaron estudios similares en *S. enteritidis* PT4 y determinaron que cuando las células eran transferidas de una temperatura de 20 a 37-46 °C éstas presentaron una marcada tolerancia ácida y térmica, alcanzando la primera una máxima inducción durante los primeros 5-15 min después del cambio y esta respuesta era independiente de la síntesis de proteínas; en contraste con la tolerancia térmica la cual alcanzó una máxima inducción hasta los 60 min después del cambio y fue dependiente de la síntesis de proteínas, mostrando que aunque la resistencia ácida y térmica se pueden incrementar por una exposición previa a una alta temperaturas de incubación , los mecanismos involucrados son diferentes.

Se han realizado estudios relacionados con la tolerancia al estrés y protección cruzada en *E. faecalis* ATCC19433. Cuando estas células se expusieron a sales biliares, pH ácido o choque térmico, se observó que las células adaptadas a las sales biliares y al calor demostraron la inducción de una protección cruzada y tolerancia homólogas, sin embargo no hubo una protección cruzada de las células adaptadas al calor hacia la tolerancia al ácido y el pretratamiento con sales biliares trajo como resultado una sensibilización al mismo. En ese estudio Flahaut, S., *et al.*, (1996) observaron en el análisis de la proteína total que cada tratamiento indujo un juego específico de proteínas y que algunas de éstas eran inducidas por mas de un tratamiento.

Leyer, *et al.*, (1993) demostraron que un choque ácido desarrollaba una importante protección cruzada al calor, al estrés oxidativo, al estrés osmótico y a la polimixina B en *S. typhimurium*. Sin embargo ni el choque térmico, ni el osmótico indujeron tolerancia al ácido. Así mismo se observó que la adaptación ácida incrementaba la hidrofobicidad de la superficie celular ya que se indujo la síntesis de proteínas de la membrana externa sin embargo los componentes lipopolisacáridos no fueron alterados, por lo que se determinó que el mecanismo de la protección cruzada inducida por el ácido involucra cambios en las propiedades de la superficie celular además del conocido mecanismo de homeostasis de pH.

Este mecanismo se ha estudiado en aislados de *S. enterica* Enteritidis PT4 con elevada tolerancia al calor, al ácido y al H₂O₂, por Humphrey, T, J, *et al.*, (1996) cuando los usaron para infectar ratón, pollos o gallinas ponedoras,

en donde se observó que estos aislados fueron mas virulentos en ratón y mas invasivos en gallinas ponedoras, particularmente en tejido reproductivo, sin embargo no hubo diferencia de comportamiento en gallos.

Como podemos observar en las investigaciones realizadas, los organismos poseen la capacidad de adaptarse a las diferentes condiciones adversas que pueden enfrentar en el medio en que se desarrollan. De esta manera el estudio de la adquisición de tolerancia a bajas temperaturas en *C. perfringens* debido a un tratamiento con un choque frío subletal resulta ser muy importante a fin de entender más sobre la capacidad de supervivencia de este patógeno, para poder establecer medidas de control contra este microorganismo, por su posible influencia en la calidad sanitaria de los alimentos, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue investigar en este aspecto.

PCHF Y PCHA COMO ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES

Se ha observado que la respuesta al choque térmico, está ubicada a lo largo de los reinos procarionte y eucarionte y se considera que las PCHT son moléculas evolutivamente muy conservadas (Jindal, S. *et al.*, 1989). Debido a esto, estas proteínas pudiera predecirse para ser escasamente inmunogénicas, sin embargo, la evidencia sugiere que pueden ser alguno de los mas importantes inmunógenos de algunos agentes infecciosos. Investigaciones posteriores corroboran lo anterior indicando que las PCHT eran buenos inmunógenos en muchas infecciones y sugirieron que podía ser debido al estrés impuesto por el hospedero durante la infección (Kaufmann, S, 1990).

Una característica importante es que la mayoría de las PCHT inmunodominantes que se han encontrado, pertenecen a la familia PCHT60 y PCHT70. El papel de las PCHT en inmunidad es extenso. Se ha establecido que las PCHT tienen funciones importantes en diferentes aspectos de la inmunidad. Además estas proteínas de un gran número de patógenos, figuran entre los principales antígenos reconocidos por el sistema inmune. Durante las infecciones bacterianas, la interacción entre el patógeno y el hospedero genera situaciones de estrés para ambos organismos. Se sabe que algunas de las proteínas del estrés del patógeno son antígenos inmunodominantes e incluso son factores de virulencia por lo que se ha visto la posibilidad de utilizarlas como vacunas contra un grupo de enfermedades debido a la gran homología entre éstas en los diferentes organismos (Jaattela, M y D. Wissing, 1992).

En un estudio realizado con *Y. enterocolitica* se estableció que el antígeno inmunodominante de 60 kDa, era una proteína de choque térmico y se ha visto que esta PCHT se ha encontrado en un amplio rango de bacterias (Ogata *et al.*, 1987). Este antígeno fue designado proteína antigénica de reacción cruzada (PARC) y fue originalmente identificada como una proteína inmunodominante en el suero de pacientes con yersiniosis y en ratones infectados experimentalmente con *Y. enterocolitica* (Ogata, S. *et al.*, 1987). Esta PARC fue producida bajo las condiciones de choque térmico en *Y. enterocolitica* pero se ha encontrado como un antígeno bacterial común el cual es distribuido en al menos 20 géneros bacterianos (Ogata, *et al.*, 1987; Yamaguchi, H. *et al.*, 1989). Esta proteína mostró identidad inmunológica para

la proteína GroEL de *E. coli*, (Yamaguchi, H. *et al.*, 1990). En adición a esta PARC, otras 9 proteínas de choque térmico fueron detectadas en *Y. enterocolitica*.

En algunos estudios se ha sugerido una relación entre la supervivencia de las bacterias patógenas en el hospedero mamífero con la síntesis de proteínas de estrés durante la infección. En el caso de *S. typhimurium*, se ha encontrado que la DnaK y GroEL son las proteínas de mayor inducción después de su entrada a los macrófagos del hospedero en cultivos celulares (Buchmeier, N.A. y Hebron, F., 1990). Además una proteína de choque térmico de 66 kDa es la responsable de la unión de esta bacteria a la mucosa intestinal en cobayos, por lo que se reconoce como un importante factor de virulencia en el desarrollo de la salmonelosis (Engraber, M. y Loos, M.N, 1992).

Los miembros de la familia GroEL están altamente conservadas en el reino procarionte y son potentes inmunógenos los cuales están reconocidos fuertemente por el sistema inmune del hospedero durante la infección. Diversos homólogos de la proteína GroEL de *E.coli* pertenecientes a la familia de 60 kDa han sido encontrados e involucrados en varias enfermedades ocasionadas por diversas bacterias como *Clamidia psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (Jaattela, M y D. Wissing, 1992), *Bordetella pertussis*, *Legionella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* (Young, D.B. y T.R. Garbe, 1991).

Trabajando con *B. abortus*, Lin, J, *et al* (1992) encontraron que una proteína de choque térmico de 62 kDa era un antígeno reconocido

predominantemente. Por otro lado, en *Pasteurella multocida* se han encontrado 4 proteínas de choque térmico (70, 60, 40 y 36 kDa) que actúan como antígenos inmunodominantes (Love, B. C. y D. C. Hirsch, 1994). De la misma forma (Young, D., et al., 1991) reconocieron las PCHT de *M. tuberculosis* DnaK, GroEL y GroES inducidas por un cambio de temperatura de 37 a 42 °C.

También en diversos estudios realizados por Wu, Y. et al., 1994, encontraron 4 proteínas de estrés de peso molecular de 45, 64, 10 y 12 kDa cuando las células se sometieron a choque térmico, a un tratamiento alcalino o a ambos. Además, estas proteínas fueron los antígenos mejor reconocidos por anticuerpos presentes en suero y mucosas intestinales. Así mismo cuando se analizaron los perfiles proteicos de *Haemophilus ducreyi* por electrotransferencia y detección inmunológica utilizando suero de conejo inmunizado y de pacientes enfermos con cancrrosis, se encontró que una PCHT de 58.5 kDa era altamente inmunogénica (Brown, T. et al., 1993).

De la misma forma (Heredia, N. et al., 1998) al caracterizar las proteínas que *C. perfringens* sintetizaba durante un choque térmico, se encontraron 7 proteínas diferentes, la mayoría asociadas a membrana, mientras que solo una se presentaba principalmente en el citoplasma. Se observó que 2 de estas PCHT se encuentran relacionadas inmunológicamente con GroEL y DnaK de *L. lactis* y *E. coli*.

Debido a la importancia que presentan las proteínas de estrés que pueden actuar como antígenos inmunodominantes y por lo tanto intervenir en el proceso de patogenicidad de cualquier agente infeccioso, consideramos de

gran interés determinar si el microorganismo sintetiza PCHF y PCHA inmunodominantes, ya que pensamos que esto puede contribuir al entendimiento de la relación patógeno-huésped que se presenta en el desarrollo de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

C. perfringens es capaz de inducir la síntesis de proteínas de choque frío y proteínas de choque ácido y adquirir resistencia a condiciones frías y ácidas extremas, cuando previamente es sometido a bajas temperaturas y pH ácido respectivamente.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el efecto del choque frío y choque ácido sobre el crecimiento de células vegetativas de *C. perfringens*
- 2.- Demostrar el efecto del choque frío y choque ácido en la adquisición de tolerancia a bajas temperaturas y pH ácidos extremos en células vegetativas.
- 3.- Determinar la duración de la tolerancia adquirida al frío y a la acidez respectivamente.
- 4.- Establecer el efecto del choque frío y choque ácido sobre el patrón de proteínas producidas por la bacteria.
- 5.- Determinar los pesos moleculares de las principales PCHF y PCHA producidas.
- 6.- Establecer la presencia de anticuerpos contra PCHF y PCHA de *C. perfringens* en animales enfermos de gangrena gaseosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

MANTENIMIENTO DE LA CEPA.

En este trabajo se utilizó la cepa de *C. perfringens* FD- 1041 enterotoxigénica, proporcionada amablemente por el Dr. Stanley Harmon de la FDA, Washington, D.C. E.U.A.

La bacteria se mantuvo como cultivo esporulado de reserva, en medio de carne cocida según Robertson (Willis, A.T., 1960) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se resembró cada 12 meses.

INOCULO:

A partir del cultivo de reserva se tomó una alícuota y se añadió en un tubo con 10 ml de caldo con tioglicolato y posteriormente se colocó en un baño de agua a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min para activar el proceso de germinación de las esporas. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h.

EFFECTO DEL CHOQUE FRÍO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *C. perfringens*

A partir de la cepa activada, se inocularon al 1% tubos con 4 ml de caldo con tioglicolato de reciente preparación. Los cultivos se incubaron a $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ en

un baño de agua y cuando alcanzaron la parte media de la fase logarítmica (A_{600} 0.30-0.35, en un espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340), se transfirieron a baños de agua a 15, 20, 25, y 28 °C por diferentes periodos de tiempo. Posteriormente los cultivos se retomaron a la temperatura de incubación original (43 °C), hasta alcanzar 8 h.

El crecimiento de los cultivos se determinó cada h mediante lecturas espectrofotométricas y cuenta viable en placa, utilizando medio nutritivo compuesto de 1.0% extracto de levadura Difco, 1.5% tripticasa peptona, BBL y 1.5% agar, Difco. Una vez que las cajas solidificaron, se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 24 a 48 h.

EFFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN LA ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA AL FRÍO.

La cepa FD-1041 se activó de la forma anteriormente descrita. Se inocularon tubos al 1% conteniendo 4 ml de caldo con tioglicolato y se incubaron los cultivos en un baño de agua a 43 °C y cuando alcanzaron la mitad de la fase logarítmica se transfirieron a un baño de agua a 28 °C durante 60 min.

Después de aplicar el choque frío, las células se transfirieron a un baño de agua a 10 °C por diferentes intervalos de tiempo y posteriormente se determinó la supervivencia de las células mediante una cuenta viable en placa. Se realizaron las curvas de muerte por duplicado (\log_{10} del número de células sobrevivientes contra el tiempo de exposición a una temperatura específica)

para cada caso, y se determinó el valor "D" (tiempo que tarda en disminuir un logaritmo la población bacteriana).

Se empleó el método de regresión lineal y para la comparación de pendientes se utilizó el análisis de distribución de "t" para muestras pequeñas. Los experimentos se realizaron por duplicado y al menos tres repeticiones de cada uno de ellos.

DURACIÓN DE TOLERANCIA AL FRÍO

Para determinar la duración de la tolerancia al frío adquirida, una vez que fueron sometidos los cultivos al choque frío, se retomaron a la temperatura de incubación original (43 °C) y se mantuvieron por 1, 2, y 3 h. Enseguida se determinó la tolerancia a 10 °C como se mencionó anteriormente.

EFFECTO DEL CHOQUE FRÍO SOBRE EL PATRÓN DE PROTEÍNAS

Se activó la cepa como se mencionó anteriormente y a partir de ella se inocularon tubos con 2 ml de caldo con tioglicolato y se incubaron a 43 °C en un baño de agua. Cuando los cultivos llegaron a la mitad de la fase logarítmica se sometieron a una temperatura de 28 °C y a los 5 min se le agregó 100µCi/ml de una mezcla de cisteína y metionina marcadas con ³⁵S (Trans ³⁵S-label, ICN Biomedical) y se continuó la incubación durante 55 min más. Posteriormente se adicionó 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% frío para parar la incorporación y las muestras se colocaron en un recipiente conteniendo agua con hielo a una temperatura de 2-4 °C durante 15 a 20 min.

Durante este periodo se tomó una muestra del cultivo (5µl), cada 5 min y se colocó en el centro de un filtro de fibra de vidrio (Whatman, GF/A). La muestra se secó y se colocó en una caja petri con TCA al 10% durante 5 min, posteriormente el filtro se lavó en solución salina al 0.85% y finalmente en etanol al 95% por 5 min. Los filtros secos se colocaron en frascos de centelleo conteniendo cada uno 5 ml de difeniloxazol (PPO) al 5% disuelto en tolueno. La radioactividad se determinó mediante un contador de centelleo líquido Tm Analytic Delta (mod. 300) y se utilizó un estándar de carbono para las lecturas. Las muestras se analizaron durante 1 min cada una.

EFFECTO DEL CHOQUE ÁCIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DE

C. perfringens

A partir de la cepa activada, se inocularon al 1% tubos con 4 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC) pH 7.0 de reciente preparación. Los cultivos se incubaron a 43 °C en un baño de agua y cuando alcanzaron la parte media de la fase logarítmica (A_{600} 0.30-0.35, en un espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340), se sometieron a diferentes grados de acidez a pH de 2.0-5.0 utilizando HCl 2M (Sigma Chemical Co) por diferentes periodos de tiempo. Posteriormente los cultivos se retomaron a su pH original de 7.0 con NaOH 2M (Sigma Chemical Co), hasta alcanzar 8 h.

El crecimiento de los cultivos se determinó cada h mediante lecturas espectrofotométricas y cuenta viable en placa, utilizando medio nutritivo

(extracto de levadura 1.0%, tripticasa peptona 1.5%, y agar 1.5%). Una vez que las cajas solidificaron, se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 24 a 48 h.

EFFECTO DEL pH ÁCIDO EN LA ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA

INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA A LA TOLERANCIA AL ÁCIDO (RTA)

La cepa FD-1041 se activó de la forma anteriormente descrita. Se inocularon tubos al 1% conteniendo 4 ml de caldo ICC pH 7.0 y se incubaron los cultivos en un baño de agua a 43 °C y cuando alcanzaron la mitad de la fase logarítmica (A_{600} de 0.30 a 0.35) se sometieron a un choque ácido a pH de 4.5 por 20 min. Después de este tiempo, las células se sometieron a los ensayos de tolerancia al ácido.

MEDICIÓN DE LA RTA:

Después de aplicar el choque ácido a pH 4.5 por 20 min, las células se sometieron a un pH de 3.5 por diferentes intervalos de tiempo y posteriormente se determinó la supervivencia de las células mediante una cuenta viable en placa. Se realizaron las curvas de muerte por duplicado (\log_{10} del número de células sobrevivientes contra el tiempo de exposición a una temperatura específica) para cada caso, y se determinó el valor "D" (tiempo que tarda en disminuir un logaritmo la población bacteriana)

Para el trazado de la línea recta se empleó el método de regresión lineal y para la comparación de pendientes se utilizó el análisis de distribución de "t" para muestras pequeñas. Los experimentos se realizaron por duplicado y al menos tres repeticiones de cada uno de ellos.

DURACIÓN DE LA RTA

Para determinar la duración de la tolerancia adquirida al ácido, una vez que fueron sometidos los cultivos al choque ácido, se retornaron a su pH original de 7.0 y se mantuvieron por 1, 2, 3 y 4 h. Enseguida se determinó la tolerancia a pH 3.5, como se mencionó anteriormente.

EFFECTO DEL CHOQUE ÁCIDO SOBRE EL PATRÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la incorporación del isótopo ^{35}S , primeramente se activó la cepa como se mencionó anteriormente y a partir de ella se inocularon tubos con 4ml de caldo ICC y se incubaron a 43 °C en un baño de agua. Cuando los cultivos llegaron a la mitad de la fase logarítmica (A_{600} 0.30 a 0.35) se sometieron a un choque ácido de pH 4.5 por 20 min y a los 5 min se le agregó 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de una mezcla de cisteína y metionina marcadas con ^{35}S (Trans ^{35}S -label, ICN Biomedical) y se continuó la incorporación durante 15 min más. Posteriormente se adicionó 4ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% frío para parar la incorporación y las muestras se colocaron en un recipiente conteniendo

agua con hielo a una temperatura de 2-4 °C durante 15 a 20 min. La incorporación del isótopo se determinó de la manera ya descrita.

MÉTODOS DE ROMPIMIENTO CELULAR

Se probaron dos métodos a fin de obtener la mayor solubilidad de las células para el análisis de proteínas:

Método de Abraham y Rood:

El paquete celular se resuspendió en 2 ml de amortiguador TES (Tris-HCl 30 mM pH 8.0, EDTA 5 mM y NaCl 50 mM). En seguida se adicionó 0.4 ml de lisozima de huevo (10 mg/ml en TES). Esta mezcla se incubó a 37 °C/30 min. En seguida se agregó 0.8 ml de EDTA 250 mM y se incubó nuevamente a 37 °C por 5 min. Finalmente se adicionó 0.5 ml de SDS al 10% y se incubó a 37 °C/ 5 min (Abraham, J.L. y J.I. Rood, 1995).

Método modificado de Qoronfleh y Streips:

El paquete celular obtenido después de la centrifugación de 2 ml de cultivo, se resuspendió en 2 ml de amortiguador Tris-HCl 30 mM, pH 7.6, además se adicionó lisozima de huevo a una concentración de 500 µg/ml y DNAsa a una concentración de 50 µg/ml. Se homogenizó y se incubó a 37°C por 30 min, finalmente la suspensión se congela a -20 °C durante toda la noche. Las muestras se secaron para su concentración en un Liofilizador (Labconco, Freeze Dry System 4.5) durante 8-10 h.

Electroforesis en gel de poliacrilamida:

Para determinar las proteínas totales de las muestras obtenidas anteriormente, se agregó a esta muestra 500 μ l de agua bidestilada y un volumen igual de amortiguador de muestra 4X de electroforesis (β -mercaptoetanol al 20 %, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0.02%, glicerol al 40% y Tris al 3% con un pH final de 6.8) se homogenizó y después se colocó en un baño de agua a 100 °C por 2-3 min (Lopes Gomes, S., et al , 1986, Wallington, E.J., 1994). En todas las muestras se determinó la radiactividad (cpm) mediante el ensayo de incorporación mencionado anteriormente.

Se utilizó el método de Qoronfleh y Streips para la solubilización de las células en las muestras marcadas. Estas fueron ajustadas a 100,000 cpm y se colocaron en un volumen de 15-50 μ l. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes con un gel concentrador (2.5%) y un gel separador (10%). Se aplicó 110 V para su concentración y 130 V para su separación; se mantuvo durante todo el proceso una temperatura de 5 °C mediante un sistema de enfriamiento en la cámara (O'Farrel, P.H. 1975). Una vez terminada la electroforesis, el gel se colocó en una solución colorante de azul de Coomasie R- 250 al 0.1%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 2 h en agitación constante. Posteriormente el gel se colocó en una solución desteñidora de ácido acético al 10% con agitación constante y se hicieron varios cambios a fin de eliminar el exceso de colorante y poder determinar la ubicación de los marcadores de peso molecular: anhidrasa

carbónica bovina (PM 29 kDa), albúmina de huevo (PM 66 kDa), fosforilasa B (PM 97.4 kDa), β galactosidasa (PM 116 kDa), y Miosina (PM 205 kDa), los cuales se adquirieron en la Compañía Sigma Chemical Co.

Fluorografía:

Después de la electroforesis y el tinte de los geles, estos se colocaron en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) concentrado durante 1 h y se hicieron 2 recambios más permaneciendo los geles en agitación constante. Posteriormente los geles se colocaron en una solución de difenil oxazol (PPO) al 22% disueltos en DMSO y se mantuvo en agitación durante 12 h. En seguida el gel se lavó con agua durante varias ocasiones con agitación constante hasta eliminar el exceso de PPO (Harlow, E. y D. Lane, 1988). Este método se realizó para intensificar la señal y tener mejores resultados.

Secado del gel:

Después de la fluorografía el gel se colocó en una solución que contenía metanol al 20%, ácido acético al 7% y glicerol al 5% por 20 min en agitación constante. El gel se deshidrató en un secador de geles marca Bio Rad modelo 543. Se colocó primeramente una capa de papel filtro humedecida con agua y sobre ella el gel una vez sacado de la solución de metanol, ácido acético y glicerol. El gel y el papel filtro se cubrieron con plástico a fin de evitar contaminación con radiactividad y se aplicó una temperatura de 60 °C durante 1.5 h.

Autoradiografía:

Cuando el gel estuvo seco, en un cuarto oscuro se colocó éste sobre un cassette de exposición y enseguida se colocó una película Kodak X-Omat. El cassette se guardó en bolsas de plástico y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 a varias semanas. Después se reveló la película colocándola en una solución reveladora (Kodak), de la cual se tomó 103 ml y se aforó a 473 ml con agua destilada y se mantuvo durante 2 min. Posteriormente para detener la reacción se pasó a una solución stop bath (Kodak) durante 30 seg de la cual se tomaron 20 ml y se aforaron a 500 ml con agua destilada. En seguida se colocó en una solución fijadora (Kodak) por 2 min, de la cual se tomó 103 ml y se aforó a 473ml con agua destilada. Finalmente se pasó la película a un recipiente con agua en circulación y después se deja secar al aire.

DETECCIÓN DE PCHF y PCHA INMUNODOMINANTES

INDUCCIÓN DE PCHF Y PCHA:

La inducción de las proteínas se hizo de la manera ya descrita, sin agregar aminoácidos ya marcados. Las células se solubilizaron por el método de Qoronfleh y Streips y se ajustaron a una concentración de 0.4mg por ml (Bradford, M.M, 1976) y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes utilizando un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10%. El sistema se corrió a 120V por 4 h aproximadamente y las proteínas separadas fueron transferidas a una

membrana de nitrocelulosa (electrotransferencia) para posteriormente realizar la inmunodetección.

ELECTROTRANSFERENCIA

Después de la electroforesis el gel se colocó en un amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 25 mM pH 6.8, glicina 192 mM y metanol al 20%) por 15 a 20 min. La electrotransferencia se llevó a cabo en una cámara Bio Rad, modelo 200/0.2. En la placa del portagel se colocó una esponja humedecida con el amortiguador antes mencionado, después una hoja de papel filtro humedecido también y sobre éste el gel. La membrana de nitrocelulosa humedecida con el amortiguador de equilibrio se colocó sobre el gel y sobre ésta, otra hoja de papel filtro y finalmente otra esponja humedecida. El sistema se colocó en la cámara de transferencia llena con amortiguador de equilibrio frío y se corrió a 360 mA por 4 h con un sistema refrigerante a 4 °C.

INMUNODETECCIÓN

La detección de proteínas inmunodominantes se realizó mediante la inmunodetección utilizando suero de conejos infectados previamente con la bacteria, en los cuales se desarrolló un cuadro gangrenoso localizado.

Una vez concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se colocó en una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 con NaCl 500 mM y leche descremada en polvo al 5% p/v y se mantuvo por 12-16 h a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se eliminó la solución y se

lavó en tres ocasiones con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y Tween 20 al 0.05%. Las membranas lavadas se pusieron en contacto con el suero de conejo enfermo de gangrena gaseosa (1:500 en TBS: Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5 con gelatina 1%) por espacio de 3 h a temperatura ambiente y agitación constante. En seguida se lavó nuevamente por tres ocasiones con TBS y después se agregó el anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical Co) el cual se diluyó 1:2500 en TBS con gelatina al 1%. La reacción se llevó a cabo por espacio de 3 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Finalmente se agregó el sustrato de la enzima: peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical) al 0.06% (v/v) y una solución reveladora: HRP 4-cloro-1-naftol (Bio Rad) para llevar a cabo la detección colorimétrica en los sitios donde hubiese reconocimiento entre las proteínas separadas y el suero del animal. Se dejó en incubación hasta la aparición de bandas color magenta y la reacción se detuvo lavando las membranas con agua destilada en tres ocasiones.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE BRADFORD.- Se tomó 100µl de la solución problema y se añadió 5 ml del reactivo de Bradford (azul brillante Coomassie G-250, 100 mg, 50 ml de metanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%, la mezcla se aforó a 1 litro con agua bidestilada). Se mezcló y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm. Se utilizaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina como estándares. Las proteínas en las muestras se determinaron mediante una curva estándar Fig.1 (Bradford, M.M., 1976).

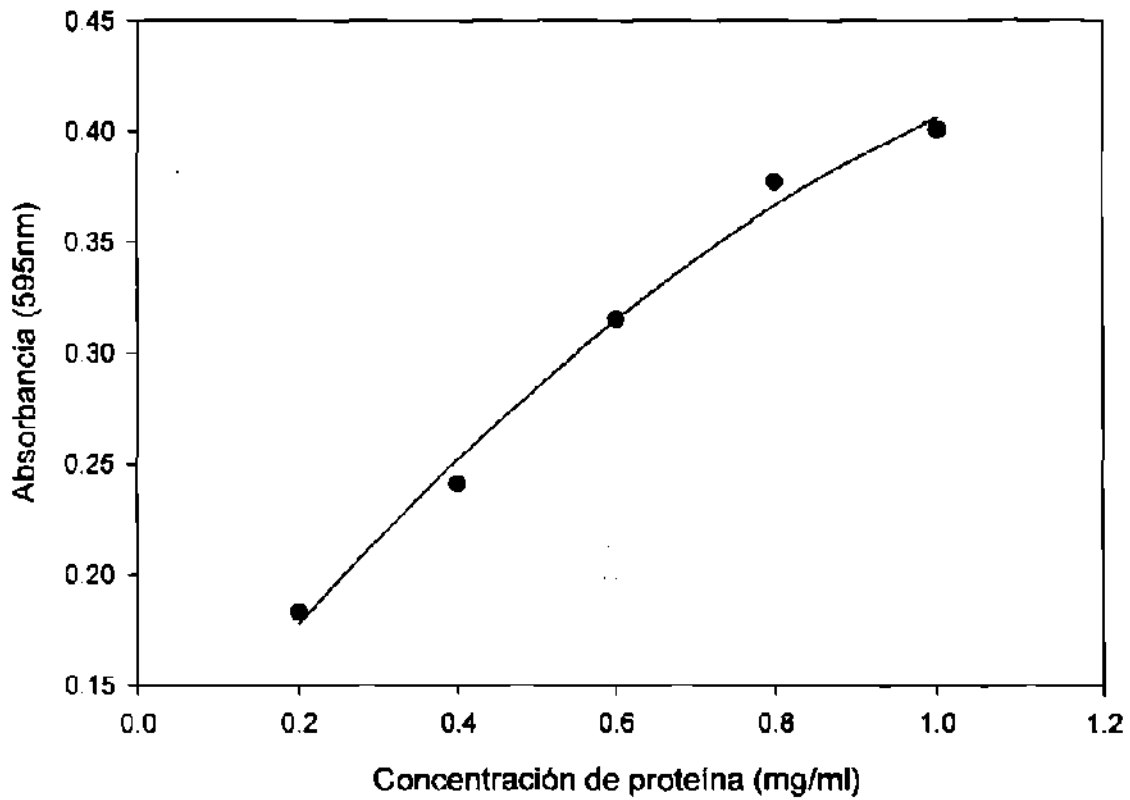


Fig 1.- Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford

RESULTADOS

EFFECTO DE UN CHOQUE FRÍO EN EL CRECIMIENTO DE *C. perfringens*

Para la aplicación del choque frío, las células se sometieron a diferentes temperaturas con el fin de establecer aquella que provocara un daño subletal a la célula, de modo que le permitiera recuperarse posteriormente. Cuando las células se sometieron a choques fríos de 43 °C a 10, 15 y 20 °C por diferentes periodos de tiempo (20 30 y 60 min) se observó una disminución en la densidad celular o la falta de crecimiento lo cual no permitió la recuperación de las células (Figs. 2, 3 y 4) por lo que descartamos estas temperaturas ya que probablemente las células fueron dañadas sin una recuperación aparente.

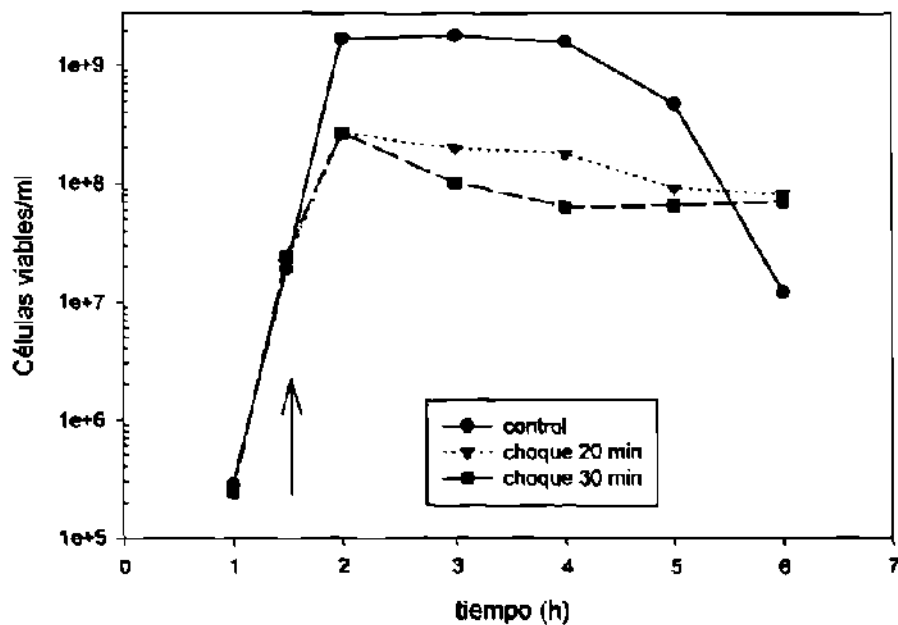


Fig 2.- *C. perfringens* cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 10°C

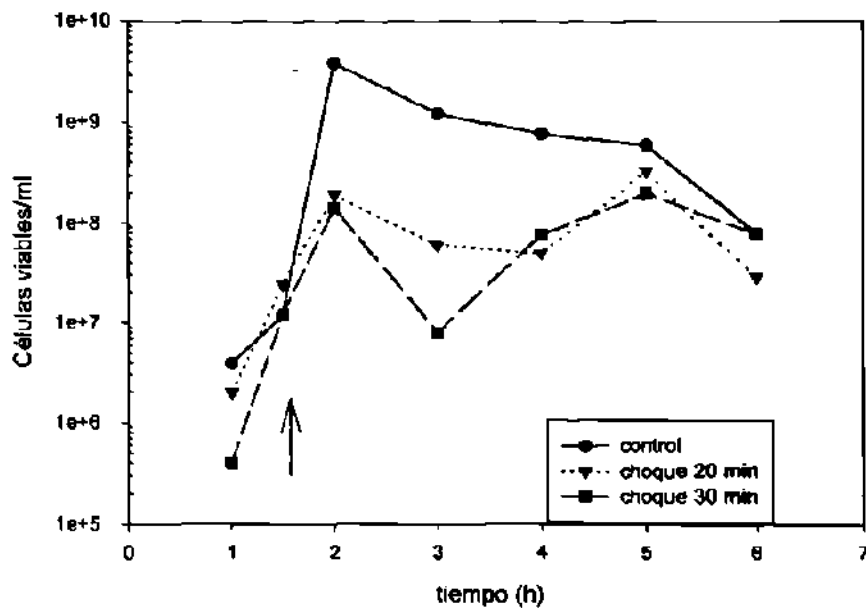


Fig 3.- *C. perfringens* cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 15 °C

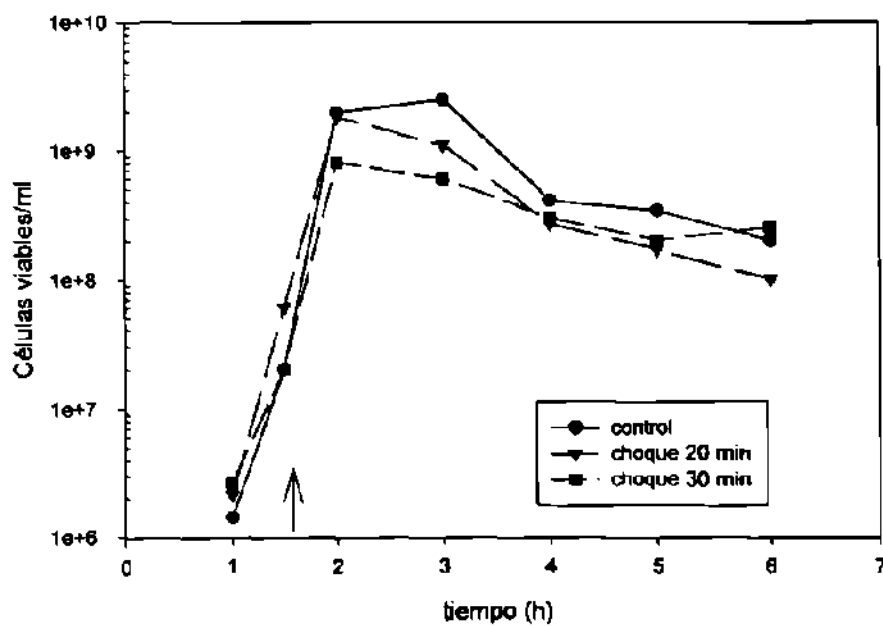


Fig 4.- *C. perfringens* cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 20 °C

Cuando aplicamos un choque frío de 43 a 28°C por 60 min se observó que la densidad óptica de los cultivos fue muy similar a la de las células control. Así mismo cuando realizamos la curva de crecimiento y llevamos a cabo una cuenta viable en placa observamos que las células sometidas al choque frío crecieron de una manera muy similar alcanzando números semejantes a los del control (Fig 5). De tal manera que escogimos esta temperatura de choque como la condición subletal para las células de *C. perfringens*

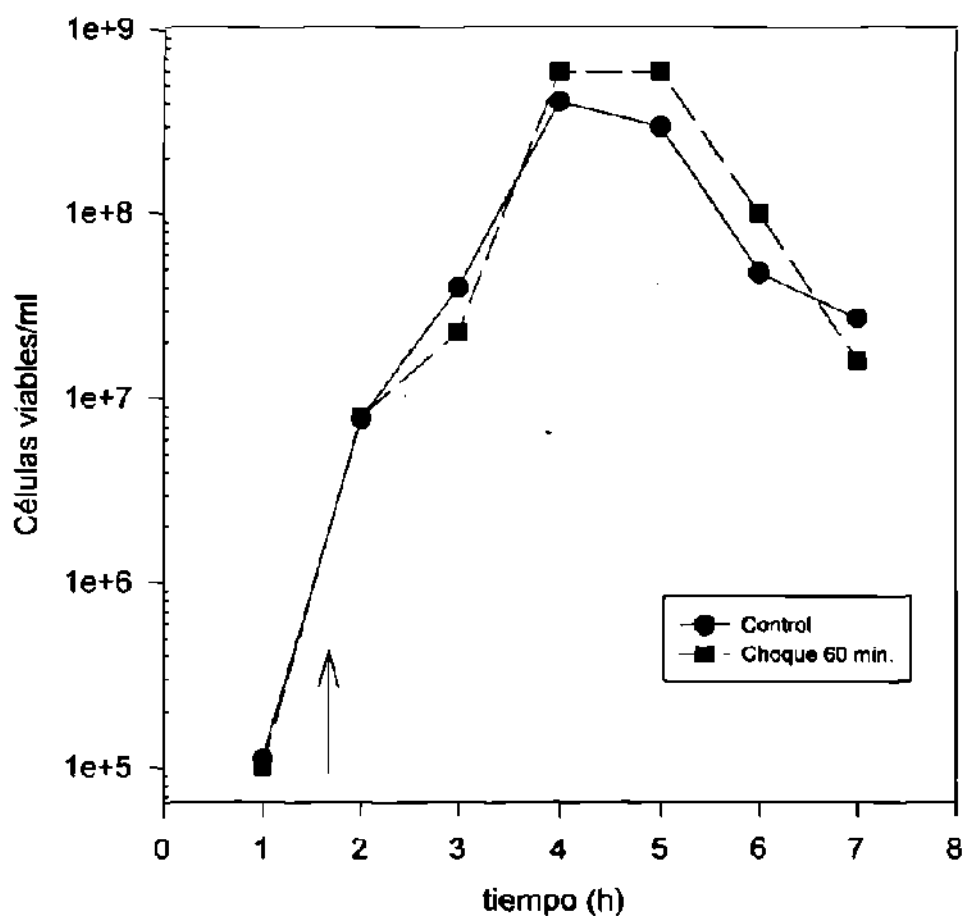


Fig 5.- *C. perfringens* cultivado en medio de tioglicolato de sodio y sometido a un choque frío de 43 a 28 °C

TOLERANCIA AL FRÍO POR UN CHOQUE FRÍO PREVIO

Con respecto a los ensayos de tolerancia al frío nosotros pudimos observar que las células tratadas con un choque frío subletal de 28 °C por 60 min (pre-choque) adquirieron mayor tolerancia a 10 °C que las células control. En la curva de muerte (Fig 6) podemos observar la sobrevivencia de las células tratadas a través del tiempo. A partir de las curvas de muerte obtenidas se determinaron los valores de letalidad "D" para este tratamiento (Tabla 1). Se pudo observar que la aplicación de un pre-choque frío elevó significativamente la tolerancia de las células a 10 °C con respecto al control.

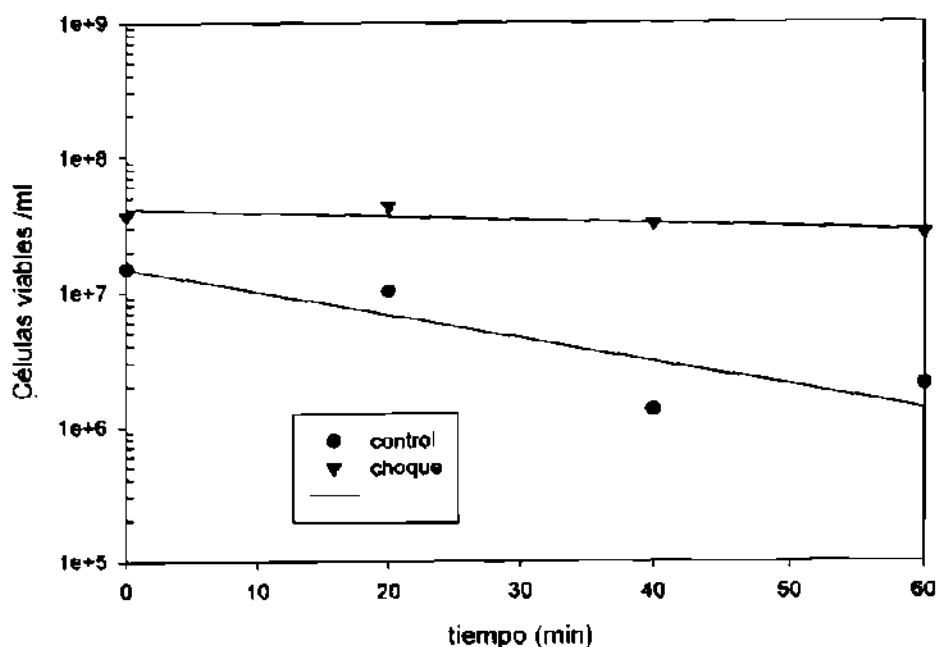


Fig 6.- Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. Inmediatamente después se sometió a 10 °C

C. perfringens FD-1041	D10(min)	Media (X)	Desv. Std.	Diferencia estadística P< 0.05
CONTROL	30	38.7	+/-15	Significativa
CHOQUE	455	326.7	+/-127	

Tabla 1.- Valores de letalidad a 10 °C de células de *C. perfringens* FD-1041, incubadas a 43 °C y sometidas previamente a un choque frío de 28 °C por 1 h. El ensayo de tolerancia se realizó inmediatamente después del pre-choque frío.

DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ADQUIRIDA AL FRÍO

Al estudiar la supervivencia de las células a 10 °C aplicado inmediatamente después del pre-choque, pudimos observar que las células fueron mas tolerantes a esa temperatura que los controles y que cuando se analizó 2 h después del pre-choque frío, se mostró una tendencia muy similar ya que las células no tratadas fueron mucho mas sensibles que aquellas que recibieron el pre-choque (Fig 7). Sin embargo cuando aplicamos el tratamiento a las 2.5 h después del pre-choque frío, pudimos observar que las células que recibieron el tratamiento mostraron una sensibilidad similar a la de los controles (Fig 8). Los valores D para cada tratamiento se muestran en la Tabla 2.

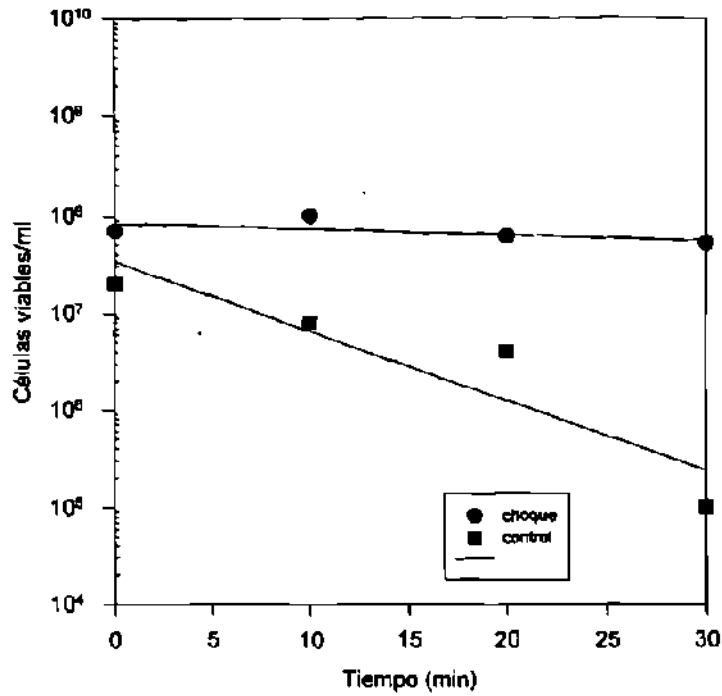


Fig 7. - Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. 2 h después se sometió a 10 °C

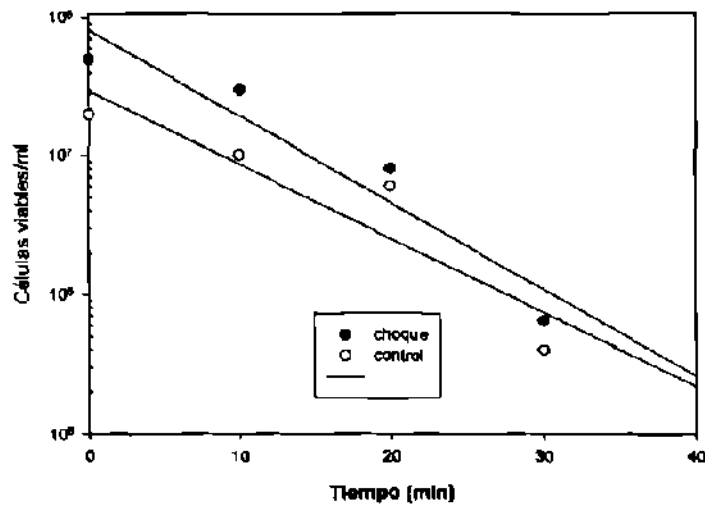


Fig 8. - Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a 43 °C y sometido a un pre-choque de 28 °C por 60 min. 2.5 h después se sometió a 10 °C.

TIEMPO DE TOLERANCIA (h)	D10 (min)		Desv Std.		Diferencia estadística P<0.05
	Control	Choque	control	choque	
0	30	455	15	127	Significativa
2	16	130	2.08	16.07	Significativa
2.5	23	20	2.83	1.41	No significativa

Tabla 2.- Valores de letalidad a 10 °C de células de *C. perfringens* FD-1041 incubadas a 43 °C y sometidas previamente a un choque frío de 28 °C por 1 h. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del pre-choque frío.

EFFECTO DE UN CHOQUE FRÍO SOBRE EL PATRÓN DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE ROMPIMIENTO CELULAR

Se probaron los dos métodos reportados, el de Abraham y Rood y el de Qoronfleh y Streips modificado. Sin embargo cuando aplicamos el primero detectamos una gran dilución de la muestra dificultando su concentración. En el segundo método logramos concentrar mas la muestra para la determinación de las proteínas, por lo que decidimos para las siguientes determinaciones usar el método modificado de Qoronfleh y Streips.

CONCENTRACIÓN DEL ISÓTOPO A UTILIZAR

En estudios previos se utilizaron varias concentraciones del isótopo a fin de establecer la concentración ideal para una mayor incorporación. Se utilizaron concentraciones que fueron desde 12-75 $\mu\text{Ci/ml}$ encontrándose muy poca incorporación. Sin embargo cuando se utilizaron 100 $\mu\text{Ci/ml}$ se obtuvo una buena respuesta como podemos observar en la Fig 9.

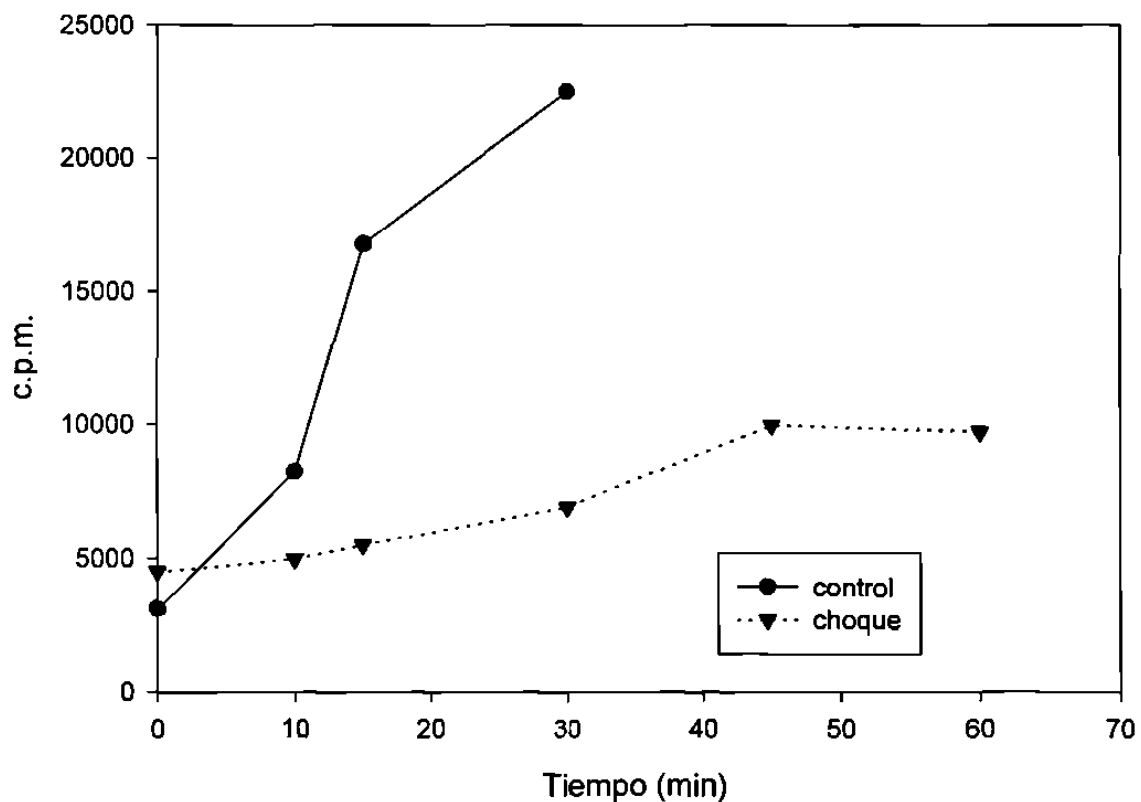


Fig 9.- Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *C. perfringens* durante un choque frío de 28 °C por 60 min

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PROTEÍNAS DE CHOQUE FRÍO (PCHF)

Al analizar los perfiles proteínicos de las células tratadas con un choque frío de 28 °C por 60 min pudimos observar que éste indujo la síntesis de PCHF en la bacteria. Se demostró la inducción de al menos 7 proteínas como respuesta a este tratamiento (Fig 10) y sus pesos moleculares fueron de 200, 105, 82, 70, 50, 45 y 10 kDa. De estos polipéptidos, cinco (PM 82, 70, 50, 45 y 10 kDa) presentaron un nivel de síntesis muy aumentado, en cambio las proteínas 105 y de 200 kDa se indujeron en menor proporción.

DETERMINACIÓN DE PCHF INMUNODOMINANTES

Después de que se realizó la inducción de las PCHF, se rompieron las células, se separaron las proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se realizó la inmunodetección utilizando los sueros de los conejos con gangrena gaseosa, tanto antes y después de la inoculación con la bacteria.

Al analizar la reacción del suero inicial con las proteínas de *C. perfringens* por medio de la inmunodetección, no se observó ninguna banda que nos indicara una posible exposición previa del animal con el microorganismo. En la reacción con suero del conejo con gangrena gaseosa, observamos varias bandas con diferencias entre los patrones de proteínas de la bacteria cuando fue sometida al choque frío y al control (Fig 11). Se

encontraron 4 bandas correspondientes a 105, 82, 70 y 10 kDa, en las cuales su síntesis se incrementó debido al choque frío.

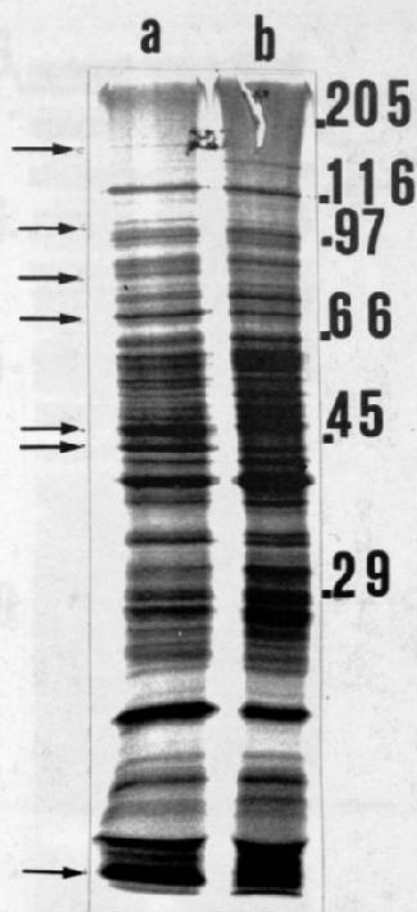


Fig 10.- Autoradiografía de los patrones de proteína total de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en caldo con tioglicolato a 43 °C, a) sometido a un choque frío (28 °C por 60 min) a la mitad de la fase logarítmica, y b) controles. Los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el lado derecho.

EFFECTO DE UN CHOQUE FRÍO EN EL TRATAMIENTO DE *C. perfringens*

Se analizaron las proteínas de células de *C. perfringens* sometidas a un choque frío con el fin de determinar

los cambios que se producen en el patrón de proteínas de estas células sometidas a un choque frío por diferentes periodos de tiempo (20 y 30 minutos). Se observó un aumento en la densidad de las bandas de proteínas de pesos moleculares de 116, 97, 66, 45 y 29 kDa, lo que sugiere un aumento en la síntesis de estas proteínas en respuesta al choque frío.

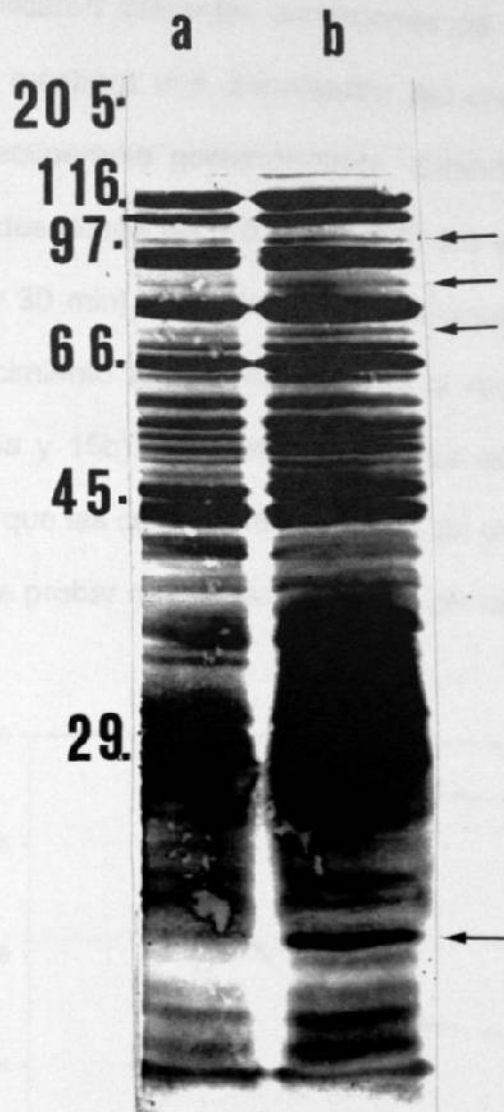


Fig 11.- Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens*. Carril (a), control y (b), proteínas de células sometidas a un choque frío. Los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el lado izquierdo.

EFFECTO DE UN CHOQUE ÁCIDO EN EL CRECIMIENTO DE *C. perfringens*

Se aplicaron diferentes condiciones de acidez con el fin de establecer aquella que mostrara una disminución del crecimiento pero que a la vez le permitiera recuperarse posteriormente. Cuando las células se sometieron a choques ácidos desde pH 7.0 a 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 por diferentes periodos de tiempo (20 y 30 min). Se detectó una disminución en la densidad celular o la falta de crecimiento lo cual no permitió la recuperación de las células (Figs 12,13,14, 15a y 15b). Así que descartamos estas condiciones de pH ya que observamos que las células eran dañadas sin una recuperación aparente, por lo que hubo que probar otras condiciones de pH mas altas.

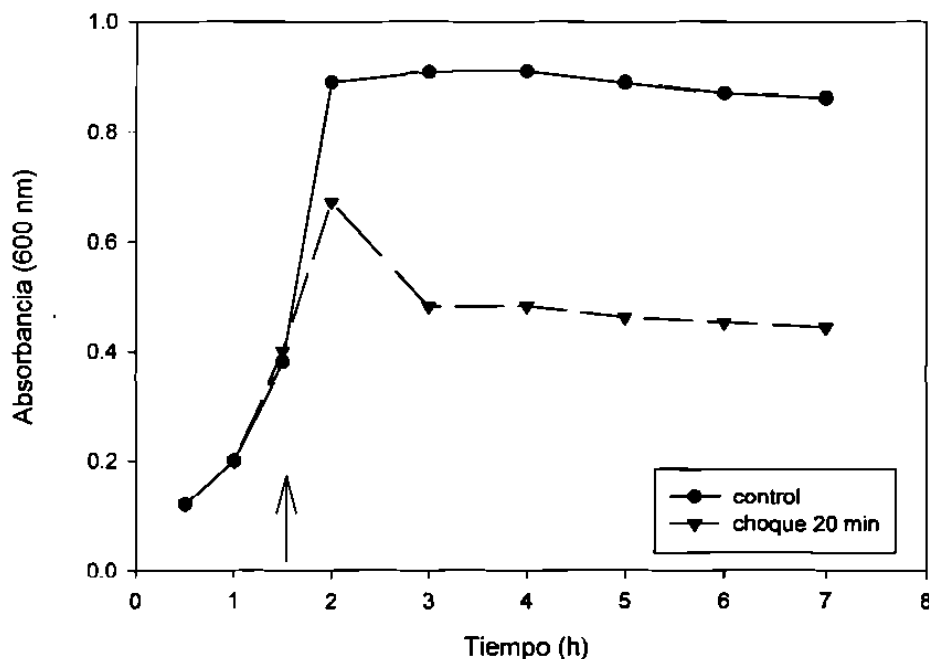


Fig 12.-*C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 2.0

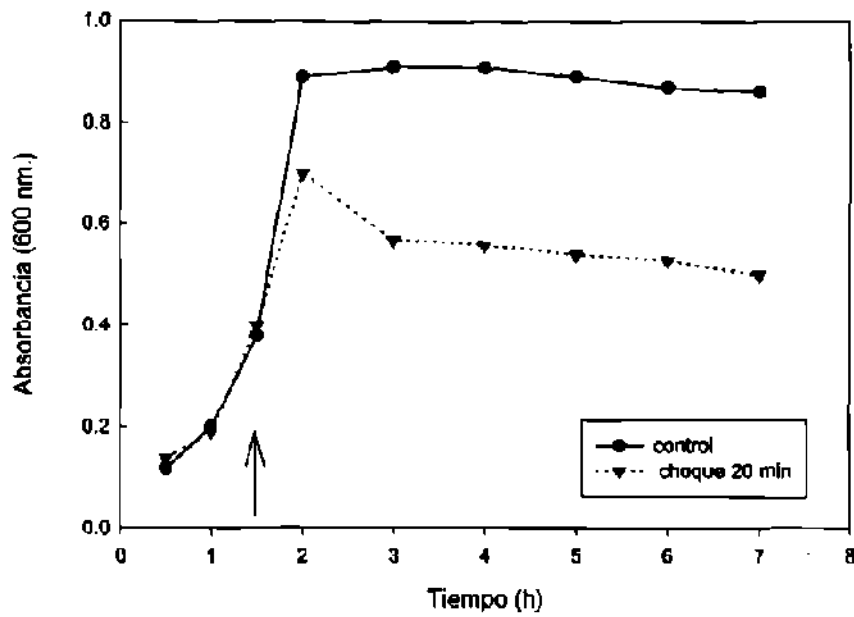


Fig 13.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 2.5

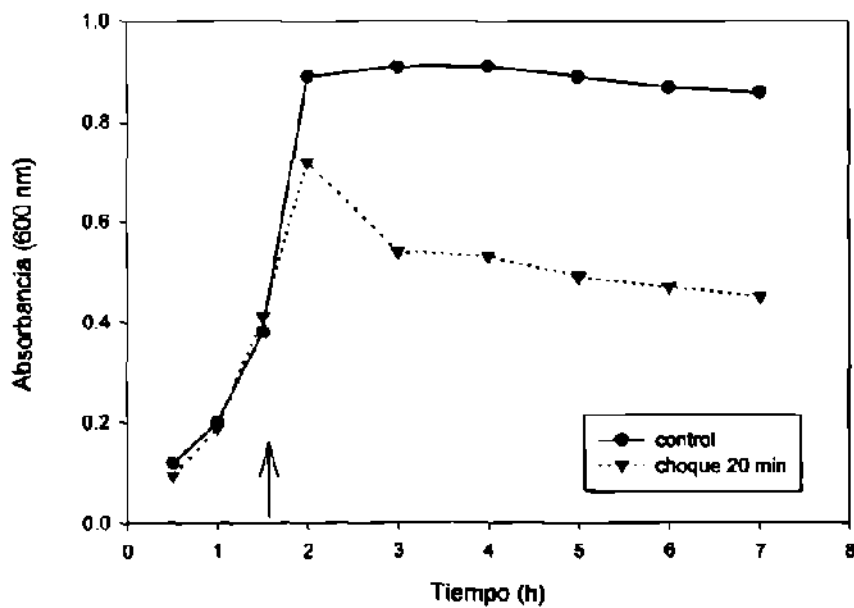


Fig 14.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 3.0

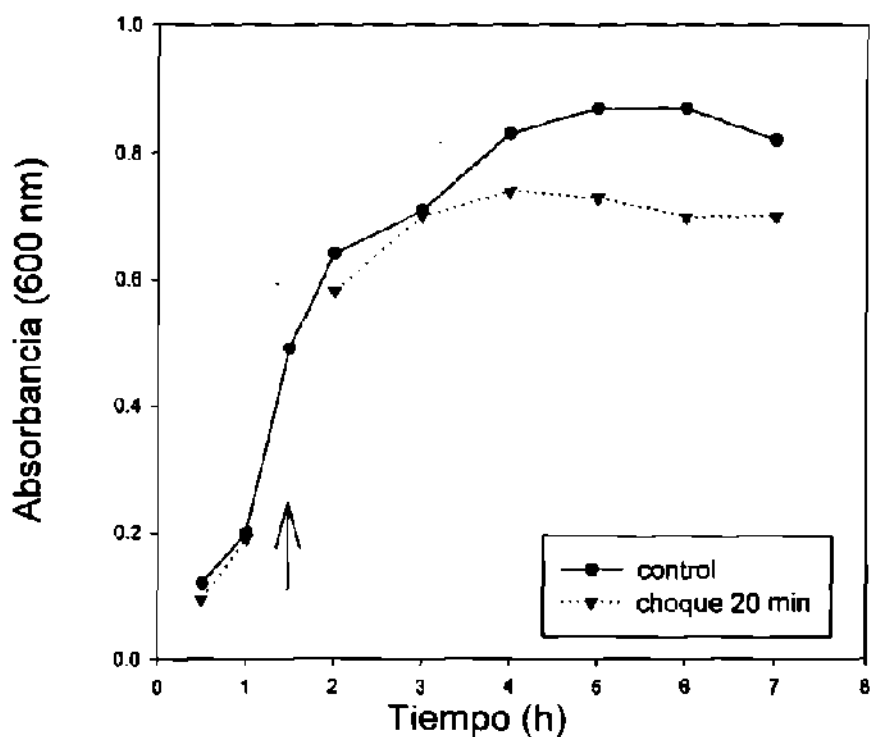


Fig 15a.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.0

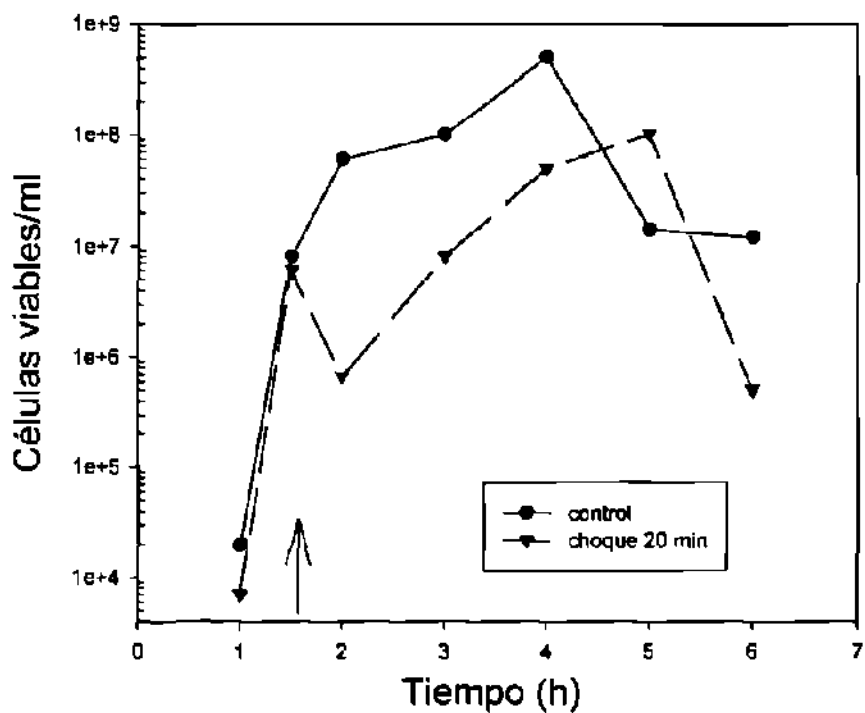


Fig 15b.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.0

Cuando aplicamos un choque ácido a pH de 7.0 a 4.5 por 20 min se observó una detención moderada en la densidad celular pero posteriormente las células fueron capaces de recuperarse (Fig 16a). Así mismo cuando realizamos la curva de crecimiento y llevamos a cabo una cuenta viable en placa observamos que las células sometidas al choque ácido presentaron una disminución moderada en la viabilidad inmediatamente después del choque ácido, sin embargo las células se recuperaron alcanzando cifras semejantes a las del control (Fig 16b). De tal manera que escogimos esta condición de pH subletal para las células de *C. perfringens*.

INDUCCIÓN DE LA RTA DEBIDO A UN CHOQUE ÁCIDO PREVIO

Con respecto a los ensayos de tolerancia al ácido se pudo observar que las células tratadas con un choque ácido subletal de pH 4.5 por 20 min (pre-choque) adquirieron mayor tolerancia a un pH de 3.5 que las células control. En las curvas de muerte (Fig 17) podemos observar la sobrevivencia de las células tratadas a través del tiempo. A partir de éstas se determinaron los valores de letalidad "D" para este tratamiento (Tabla 3). Se pudo observar que la aplicación de un pre-choque ácido elevó la tolerancia al ácido hasta 15 veces a pH 3.5 con respecto al control

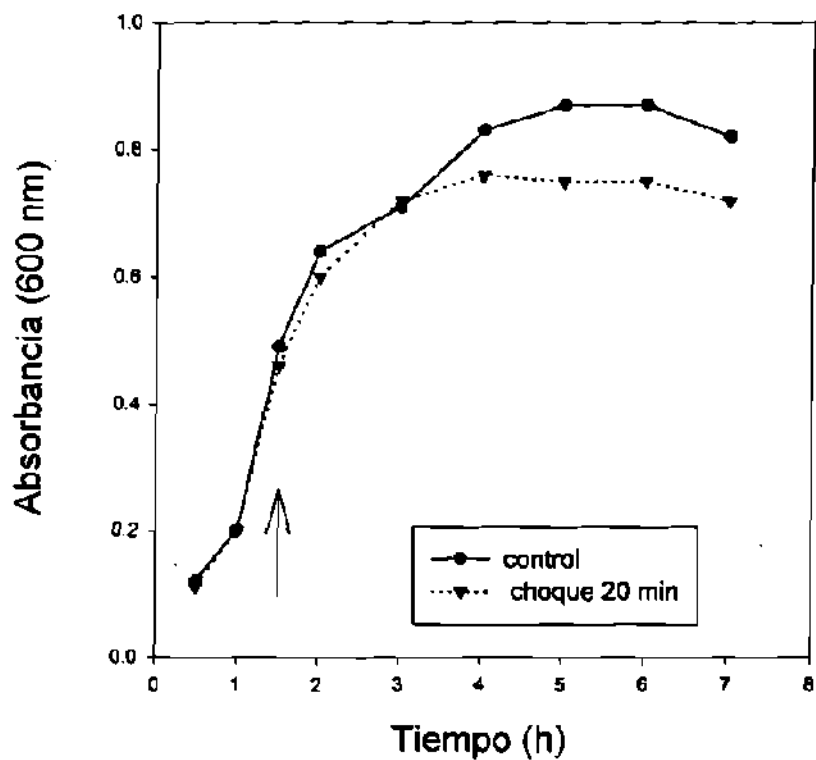


Fig 16a.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.5

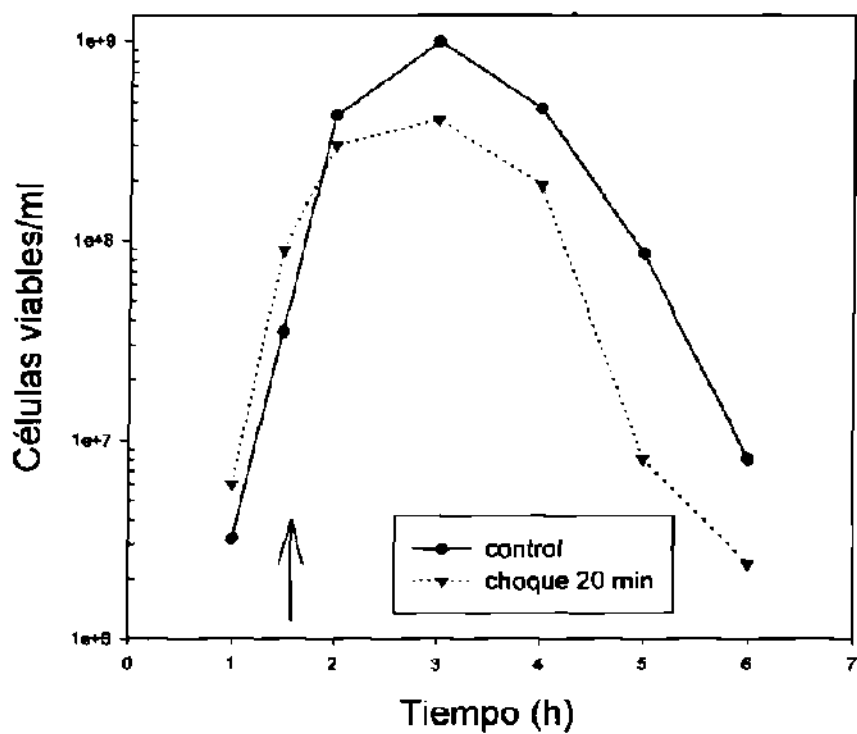


Fig 16b.- *C. perfringens* cultivado en medio ICC y sometido a un choque ácido de pH 7.0 a 4.5

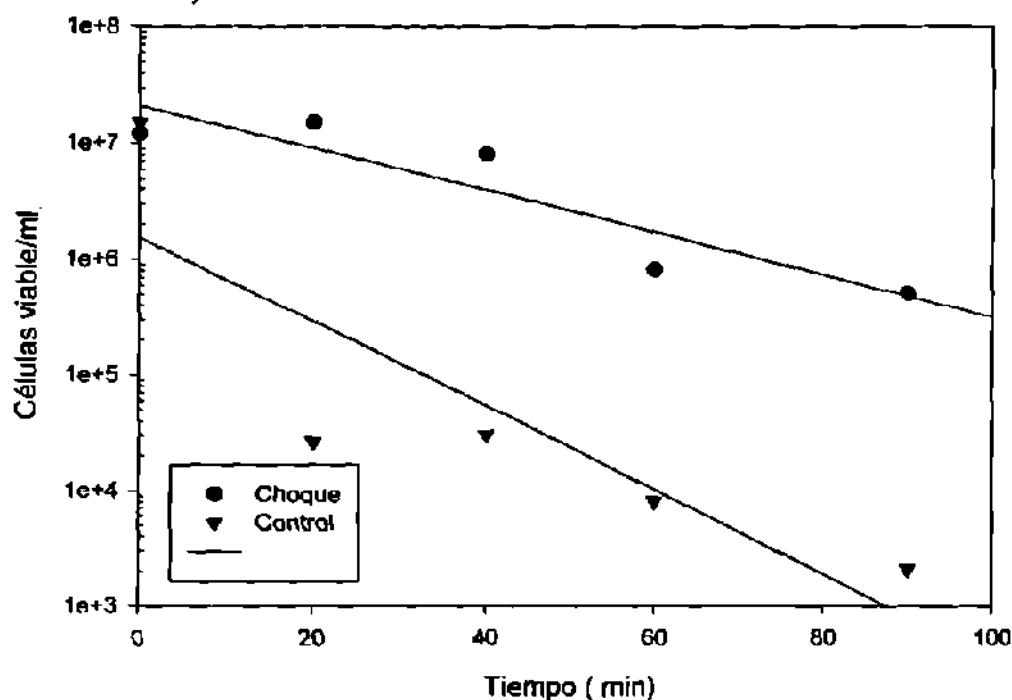


Fig 17.- Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. Inmediatamente después se sometió a pH 3.5

<i>C. perfringens</i> FD-1041	D3.5 (min)	Media (X)	Desv Std	Diferencia estadística (P< 0.05)
CONTROL	4.8	6.97	+/-2.71	Significativa
CHOQUE	75	85.33	+/-15.37	

Tabla 3.- Valores de letalidad a pH 3.5 de células de *C. perfringens* FD-1041 incubadas a pH 7.0 y sometidas previamente a un choque ácido de pH 4.5 por 20 min. El ensayo de tolerancia se realizó inmediatamente después del pre-choque ácido

DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ADQUIRIDA AL ÁCIDO

Cuando estudiamos el efecto del choque ácido a pH 3.5 aplicado inmediatamente después del pre-choque, pudimos observar que estas células fueron hasta 15 veces mas tolerantes al ácido que los controles. Cuando aplicamos este mismo tratamiento a la segunda h después del pre-choque ácido, la tolerancia al ácido se mantuvo aunque mas moderada ya que las células fueron aproximadamente 7 veces mas tolerantes que el control (Fig 18). En la curva de muerte pudimos observar que esta tolerancia se mantuvo aún a la tercera h posterior al tratamiento, obteniéndose células hasta 4 veces mas tolerantes (Fig 19). Finalmente cuando aplicamos el tratamiento a las 3.5 h después del pre-choque ácido (Fig 20), no se encontró diferencia significativa entre la tolerancia al ácido de las células tratadas con el pre-choque y los controles, ya que las células que recibieron el tratamiento fueron sensibles al ácido de forma similar que las células no tratadas. Los valores D para cada tratamiento se muestran en la Tabla 4.

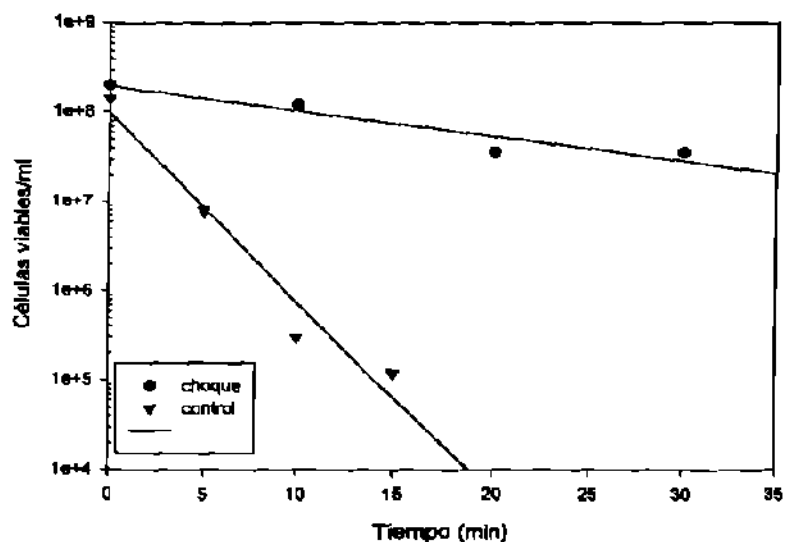


Fig 18.- Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. 2 h después se sometió a pH 3.5

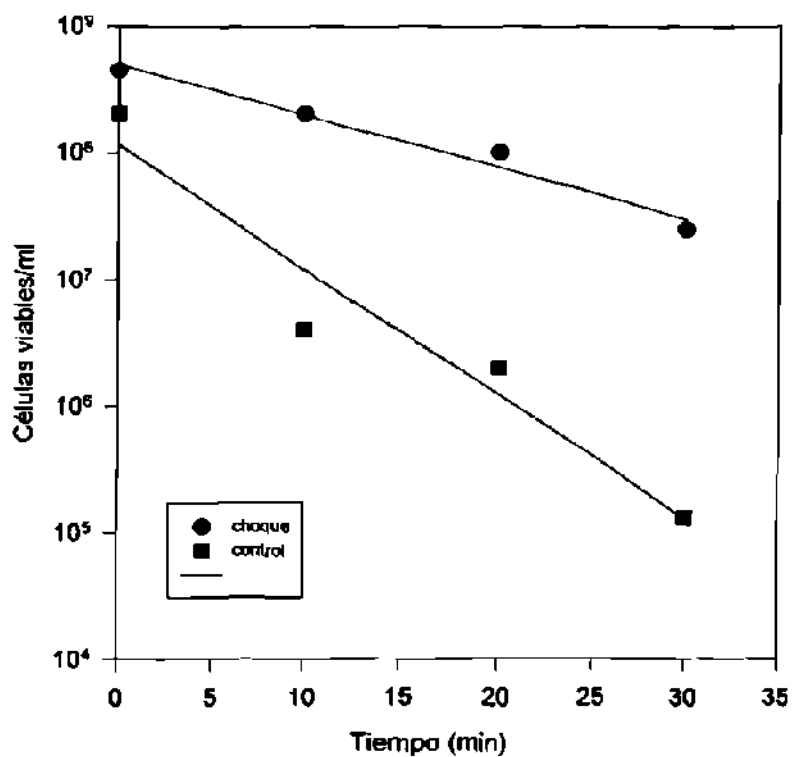


Fig 19.- Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5 por 20 min. 3 h después se sometió a pH 3.5

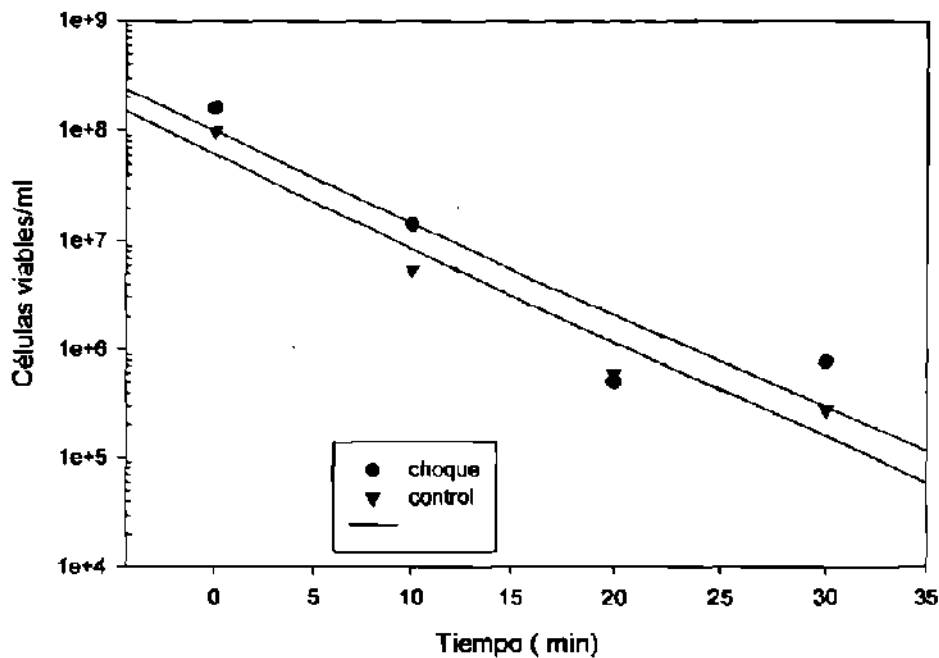


Fig 20.- Curva de supervivencia de *C. perfringens*, cultivado a pH 7.0 y sometido a un pre-choque de pH 4.5. 3.5 h después se sometió a pH 3.5

TIEMPO DE TOLERANCIA (h)	D3.5 (min)		Desv Std		Diferencia estadística P< 0.05
	control	Choque	control	choque	
0	4.8	75	2.71	15.37	Significativa
2	5	35	1.79	1	Significativa
3	11	42	0.91	12.47	Significativa
3.5	9.4	12	0	0	No significativa

Tabla 4.- Valores de letalidad a pH 3.5 de células de *C. perfringens* FD-1041 incubadas a pH 7.0 y sometidas previamente a un choque ácido de pH 4.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del pre-choque ácido.

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PCHA

El método de rompimiento celular que se utilizó para este fin fue el mencionado anteriormente al igual que la concentración del isótopo utilizada fue así mismo de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ en donde obtuvimos una buena incorporación (Fig21).

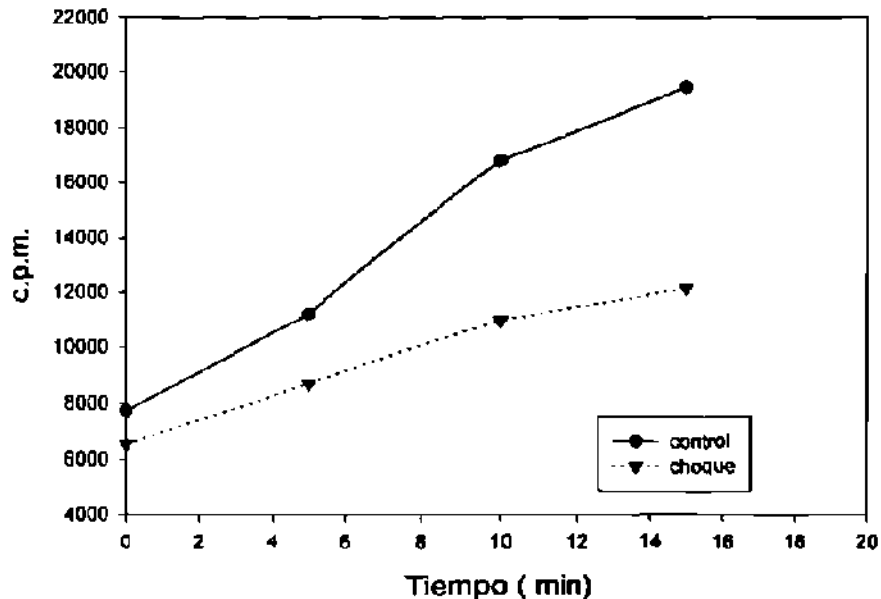


Fig 21.- Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *C. perfringens* durante un choque ácido a pH 4.5 por 20 min

Al analizar los perfiles proteínicos de las células tratadas con un choque ácido de pH 7.0 a 4.5 pudimos observar que este choque ácido indujo la síntesis de PCHA en la bacteria. Se demostró la inducción de al menos 5 proteínas como respuesta a este tratamiento (Fig 22) y sus pesos moleculares fueron de 120, 84, 58, 45 y 17 kDa. De estos polipéptidos, tres (PM 84, 58, y 17 kDa) presentaron un nivel de síntesis muy aumentado, en cambio las proteínas de 120 y de 45 kDa presentaron una menor inducción.

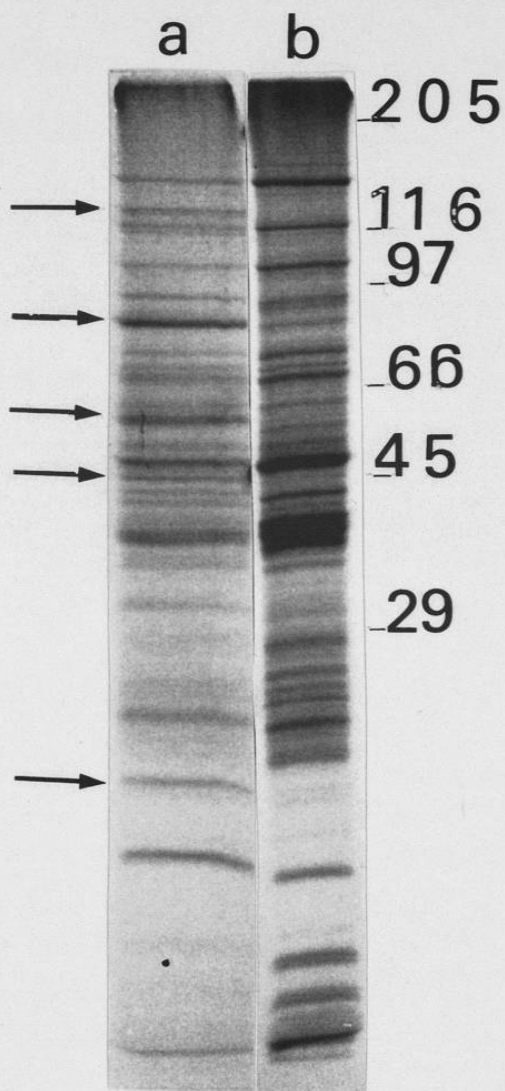


Fig 22.- Autoradiografía de los patrones de proteína total de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en medio de ICC a pH 7.0 y a) sometido a un choque ácido (pH 4.5 por 20 min) a la mitad de la fase logarítmica, b) controles. Los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el lado derecho.

DETERMINACIÓN DE PCHA INMUNODOMINANTES

Después de que se realizó la inducción de las PCHA, se rompieron las células, se separaron las proteínas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó la inmunodetección de la forma anteriormente descrita.

En la reacción con suero obtenido de conejos con gangrena gaseosa no observamos diferencia notoria entre las proteínas del choque ácido y las del control (Fig 23) ya que lo perfiles proteínicos fueron muy similares en ambos casos.

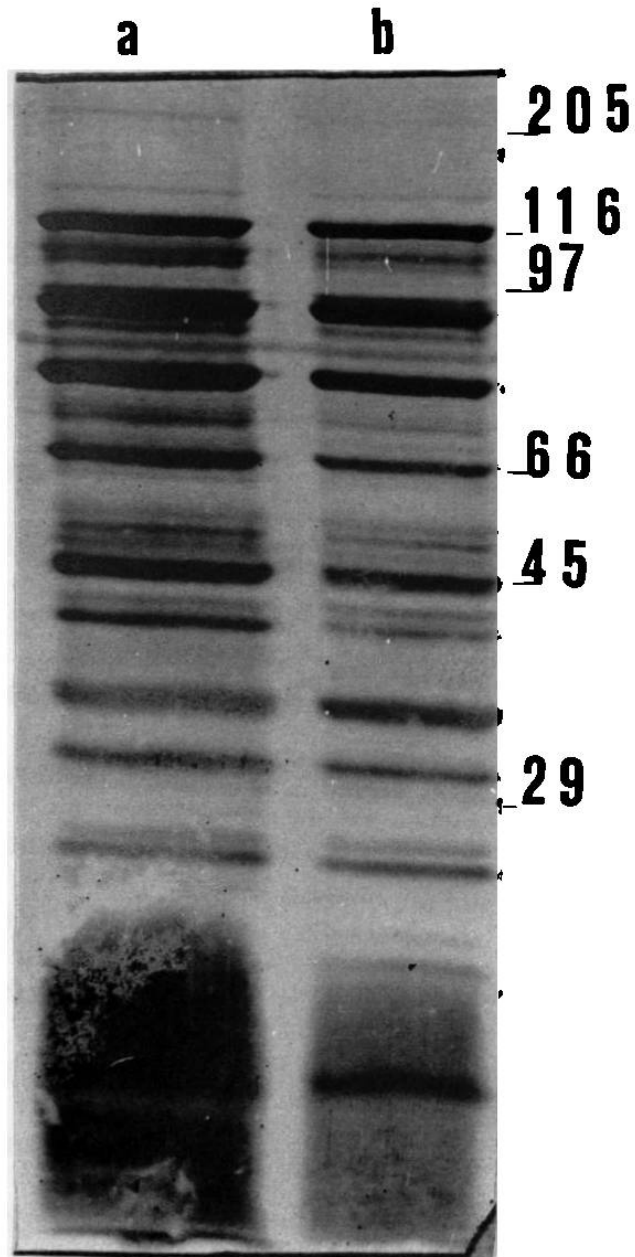


Fig 23.- Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens*. Carril (a), proteínas de células sometidas a un choque ácido y b) control. Los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el lado derecho.

DISCUSION

Durante esta investigación consideramos de gran importancia observar el efecto de la baja temperatura y el pH ácido en *C. perfringens* ya que estos factores gobiernan varios procesos metabólicos importantes en las células que pueden ocasionar cambios en el comportamiento de las mismas ya sea durante su crecimiento, en su capacidad de supervivencia y en la producción de proteínas y antígenos inmunodominantes.

Hace 20 años los organismos grampositivos se habían considerado resistentes al choque frío (Traci, P.A., et al, 1974). Muchas de las investigaciones en este aspecto se han realizado en *E. coli* y otros organismos gramnegativos. Sin embargo un fenómeno similar se ha reportado en células de *Streptomyces hydrogenans*, *B. subtilis*, y *L. monocytogenes* (Ring, K, 1965, Jones, P.J, 1994, y Bayles, D.O. 1996).

Durante los experimentos para determinar las condiciones ideales del choque frío en las células vegetativas de *C. perfringens*, pudimos observar que cuando aplicamos las temperaturas de 43 a 10 y 15 °C por 20 y 30 min se presentó una disminución muy marcada en la viabilidad de las células al grado de no permitir una recuperación posterior, debido probablemente a la muerte de las células. Cuando las células se sometieron a un choque frío de 43 a 20 °C durante 20 y 30 min, se observó una disminución moderada en la viabilidad de las células, sin embargo no se logró una buena recuperación. Se ha

demostrado que la temperatura mínima para detectar la muerte de las células por un choque frío está entre 17 y 23 °C para estas células (Traci, P.A, y C.L. Duncan, 1974) lo cual apoya nuestros resultados al observar una disminución de más de una unidad logarítmica en la población bacteriana en los anteriores tratamientos. Cuando aplicamos un cambio en la temperatura de 43 a 28 °C por 60 min se pudo observar una pequeña disminución en la velocidad de crecimiento mas sin embargo no se detectó letalidad en la población celular, alcanzando posteriormente niveles semejantes a los del control.

Se ha demostrado que las células desarrollan un aumento en su habilidad para sobrevivir a temperaturas extremas bajas, fenómeno conocido como respuesta a la tolerancia al frío, si primeramente se adaptan a una temperatura subletal fría (Thammavongs, T., et al, 1996).

La temperatura es uno de los factores que más se utiliza en el control sanitario de los alimentos. En muchos procesos sanitarios se utiliza la baja temperatura como control microbiológico, esto pudiera conferir a la bacteria en el alimento o producto una respuesta de resistencia a una mas baja temperatura lo cual traería graves consecuencias. Por tal motivo resultaba interesante el estudio en *C. perfringens* de aquellos factores que pudieran proporcionarle protección y así mismo favorecer su supervivencia.

En los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que esta bacteria es capaz de adquirir tolerancia al frío a una temperatura de 10 °C, al ser tratada previamente con un choque subletal frío de 28 °C por 60 min. Esto nos

demuestra que la bacteria tiene una buena capacidad de adaptación a esta condición desfavorable, lo cual concuerda con otras investigaciones realizadas anteriormente con otros organismos, en donde la exposición del microorganismo a una temperatura subletal fría, le confiere resistencia a un choque frío letal posterior (Jones, P.G, et al. 1994; Huebert, et al. 1995, Thammavongs, T, et al. 1996). Además pudimos observar que esta tolerancia al frío se mantenía durante 2 h. Esto es importante si tomamos en cuenta que la baja temperatura es uno de los factores que mas se utiliza en la conservación de los alimentos.

Cuando estudiamos la síntesis de proteínas durante el choque frío tuvimos que utilizar una concentración del marcador (³⁵S-cisteína y ³⁵S-metionina) superior a la que la mayoría de los investigadores utiliza. En este caso utilizamos 100μCi por ml para poder obtener una incorporación aceptable por parte de las células, esto debido probablemente a que las células se cultivaron en un medio muy rico (caldo con tioglicolato) lo cual dificultaba su incorporación.

Probamos dos métodos de rompimiento celular a fin de obtener el mejor resultado y la posterior solubilización de las células. Cuando utilizamos el método de Abraham y Rood no logramos obtener buenos perfiles de proteínas debido probablemente a que teníamos muy poca concentración en nuestras muestras, quizá por la gran cantidad de lisozima y detergente que se utilizan en esta técnica. El método de Qoronfleh y Streips nos dio mejores resultados,

logramos un buen rompimiento celular y una posterior concentración de la muestra lo cual nos permitió obtener los patrones de proteínas.

Cuando estudiamos los patrones de proteínas producidas durante el choque frío, pudimos observar la inducción de al menos 7 PCHF con pesos moleculares diferentes.

Varios investigadores han encontrado que las principales PCHF presentan pesos moleculares pequeños, como lo es en *E. coli* (Jones, P.G., 1987), en *B.* (Whyte e Innis, 1992) y *L. monocytógenes* (Bayles, D.O., 1996). A diferencia de estos reportes, nosotros encontramos algunas PCHF de peso molecular elevado (200 y 105 kDa con poca inducción, y de 82 y 70 kDa con una mayor inducción) pero también observamos la inducción de algunas proteínas de peso molecular pequeño como lo fueron las proteínas de 50, 45 y 10 kDa con una mayor inducción.

Para el análisis de las PCHF inmunodominantes utilizamos a) suero de conejo de dos semanas posteriores al desarrollo de la infección por la bacteria, b) suero de animales sanos y c) controles. Cuando analizamos por inmunodetección el suero de los animales sanos (antes de inocularlos), con las proteínas de *C. perfringens*, no se observaron bandas que nos indicaran la presencia de anticuerpos contra las PCHF de la bacteria. Al analizar la reactividad de los sueros extraídos después de inoculado el animal obtuvimos bandas las cuales nos mostraban una diferencia entre los patrones de proteína de los animales enfermos y los de los controles. Se observó que *C. perfringens*

produce al menos 4 PCHF que pueden actuar como antígenos inmunodominantes.

Aunque se ha reportado que las principales PCHT inmunogénicas pertenecen a las familias de los 60, 70 o 90 kDa, se ha encontrado que *V. cholerae* presenta PCHT de 46, 23 y 16 kDa que son altamente inmunógenas (Gautam, K. S, *et al.*, 1994), así como *Campylobacter jejuni* en la cual se detectaron 4 proteínas inmunogénicas de 64, 45, 12 y 10 kDa cuando las células se sometían a un choque térmico, alcalino o a ambos.

Las proteínas inmunodominantes que encontramos tuvieron pesos moleculares de 105, 82, 70 y 10 kDa, lo cual nos indica que tenemos PCHF inmunodominantes que pertenecen a la familia de PCHT 70 y 90 kDa, pero también obtuvimos proteínas de bajo peso molecular como lo fue la de 10 kDa.

En este trabajo, investigamos también el efecto que pudiera tener el pH ácido en las células vegetativas de la bacteria ya que se conoce que es una de las condiciones desfavorables mas frecuentemente encontradas por los microorganismos tanto en la naturaleza como en forma patogénica (Bearson, S., 1996).

Durante los experimentos para la determinación de las condiciones ideales del choque ácido observamos que cuando los cultivos llegaban a la mitad de la fase logarítmica, el medio de cultivo (caldo con tioglicolato) tenía un pH cercano a 4.5, esto debido a la gran cantidad de carbohidratos utilizados por los microorganismos. Esta condición no era adecuada para llevar a cabo

nuestros experimentos en los cuales deseábamos aplicar choque ácido de un pH neutro a diversos grados de acidez. Por lo tanto decidimos cambiar de medio de cultivo a caldo infusión de cerebro y corazón (ICC) en donde encontramos una buena capacidad para mantener el pH cercano a la neutralidad durante el tiempo de los experimentos.

En los análisis en donde aplicamos diferentes grados de acidez en las células vegetativas, pudimos observar que durante los choques ácidos de pH 7.0 a 2.0, 2.5 y 3.0 se presentaba una disminución en la viabilidad celular sin una recuperación aparente, esto debido probablemente a la muerte o daño de las células. Sin embargo cuando aplicamos un choque ácido de pH 7.0 a 4.0 pudimos ver que aunque la densidad celular no disminuía considerablemente después del choque, la viabilidad celular disminuía en más de un logaritmo por lo que decidimos aplicar un pH de 4.5. En este pH que aunque se detectaba una pequeña disminución en la velocidad de crecimiento, no había una disminución en la viabilidad celular por lo que decidimos aplicar esta condición apoyados en los reporte de Lyn M. O'Brien en 1996, que nos indican que un pH adaptativo es el más bajo pH en el cual las células aún se replican.

Debido a las enfermedades que produce este microorganismo, consideramos de gran importancia estudiar el efecto de este estrés en la adquisición de tolerancia ácida. Se ha observado que un choque ácido medio provoca resistencia a pH normalmente letales para las células (Foster, J. W, 1991; Park, K. Y., et al, 1996; O' Hara, W. G, y A. R. Glenn, 1984). Muchos de

los procesos de control sanitario utilizan ácidos (propiónico, acético y butírico) como conservadores de alimentos. La adaptación al ácido por los microorganismos es de gran importancia en la industria alimentaria. Si en los alimentos prevalece un grado de acidez media, esto pudiera inducir la adquisición de tolerancia a un pH mas ácido, permitiendo la supervivencia del patógeno (Guifoyle, D. E, y I. N. Hirshfield, 1995).

En nuestros resultados observamos que *C. perfringens* mostró significativamente mayor supervivencia a un pH letal de 3.5 cuando se sometió a un pH subletal de 4.5 por 20 min comparado con las células control. Esta RTA mostró células hasta 15 veces mas resistentes que los cultivos no adaptados. Este efecto puede jugar un papel muy importante en la supervivencia de la bacteria ya que como patógeno de alimentos, se podría someter a una acidez moderada que es común en un alimento y posteriormente pudiera ayudar a la bacteria a sobrevivir en un medio a pH mas bajo como el del estómago o resistir a una acidez mayor en un tratamiento posterior. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Davis, J. M., et al, (1996) en *L. monocytogenes*, Karem, K., et al, (1994) en *A. hydrophila*, y Hartke, A, et al., (1996) en *L. lactis*, por lo que debemos de tomar en cuenta la capacidad de esta bacteria ya que como patógeno de alimentos, el estudio de los factores que pudieran favorecer su supervivencia resulta muy importante. Por otro lado pudimos observar que la RTA permaneció durante 3 h. Se ha comprobado que la intoxicación alimentaria producida por este microorganismo, ocurre después de ingerir alimentos

contaminados con gran número de células viables; este microorganismo al ser ingerido debe de pasar por los entornos ácidos del estómago y parte del intestino delgado para posteriormente esporular y producir la enterotoxina causante de la enfermedad. Por lo que una bacteria con buena capacidad de supervivencia al pH ácido podría ser capaz de resistir a estas condiciones.

Al estudiar la síntesis de proteínas durante el choque ácido empleamos las mismas condiciones que en el caso anterior en cuanto a la cantidad del marcador de polipéptidos (^{35}S -cisteína y ^{35}S -metionina) y el método de solubilización, sin embargo el medio de cultivo que utilizamos para estos experimentos (ICC) nos dificultó un poco la incorporación por parte de las células debido probablemente a que este medio es muy rico nutricionalmente ya que contiene una gran cantidad de cisteína y metionina, provocando una competencia entre los aminoácidos marcados y los del medio de cultivo para incorporarse en las proteínas. Esta observación concuerda con el trabajo de L. Phan-Thanh y T. Gormon, en 1995 en *L. monocytogenes* en donde el medio ICC dificultó la incorporación del ^{35}S durante un choque frío y térmico por lo que en ese caso hubo la necesidad de utilizar un medio mínimo específico para esta bacteria.

Al estudiar la síntesis de proteínas inducidas por un choque ácido, pudimos observar la inducción de al menos 5 PCHA de las cuales presentaron una mayor inducción la de 84, 58 y 17 kDa, logrando observarse poca inducción en las proteínas con pesos moleculares de 120 y 45 kDa. Se ha relacionado a

las PCHA con la RTA en muchos microorganismos y se cree que estas son responsables de la supervivencia de las células en medios de pH ácido fuerte (Foster, J. W, 1991). En nuestros resultados demostramos la presencia de PCHA y RTA en *C. perfringens*.

Para el análisis de las PCHA inmunodominantes probamos también el suero de los animales sanos para ver si estos habían estado expuestos al microorganismo y obtuvimos los mismos resultados que mencionamos anteriormente al no observar reactividad con las proteínas de la bacteria. Cuando analizamos el suero de los animales enfermos no fue posible detectar diferencias entre los patrones de proteínas de éstos y los controles, ya que obtuvimos patrones proteínicos similares, por lo que pensamos que *C. perfringens* no produce PCHA inmunodominantes en el caso de gangrena gaseosa. Similarmente a nuestros resultados, a la fecha no hemos encontrado reportes acerca de PCHA que actúen como antígenos inmunodominantes, esto pudiera apoyar nuestros resultados al respecto y solo se ha reportado adicionalmente a las PCHT inmunodominantes algunas proteínas inmunógenas producidas por *C. jejuni* por medio de un estrés alcalino.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- 1.- Las células vegetativas de *C. perfringens* desarrollaron tolerancia al frío (10 °C) como consecuencia de un choque frío previo de 28°C por 60 min.
- 2.-La tolerancia de las células al frío (10 °C) se elevó de 2 a 3 veces con respecto al control, después de someterse a un choque frío previo (28 °C por 60 min).
- 3.- La tolerancia al frío en esas condiciones se prolongó durante 2 h después de aplicar el tratamiento.
- 4.- Las células de *C. perfringens* responden a un choque frío de 43 a 28 °C induciendo 7PCHF de 200, 105, 82, 70, 50, 45 y 10 kDa.
- 5.- En un cuadro de gangrena gaseosa se identificaron 4 PCHF inmunodominantes de 105, 82, 70, y 10 kDa.
- 6.- *C. perfringens* desarrolló una RTA al adquirir tolerancia a pH 3.5 como consecuencia de una exposición previa a un pH de 4.5 por 20 min.
- 7.- Un choque ácido previo de pH 7.0 a 4.5 por 20 min, aplicado a las células vegetativas de *C. perfringens* elevó la tolerancia al ácido (pH 3.5) hasta 15 veces con respecto al control.

- 8.- La tolerancia al ácido en esas condiciones, se prolongó durante 3 h después de aplicar el choque ácido.
- 9.- El choque ácido a pH de 4.5 indujo la síntesis de 5 PCHA con pesos moleculares de 120, 84, 58, 45 y 17 kDa.
- 10.- No se identificaron PCHA inmunodominantes

PERSPECTIVAS DE ESTUDIO DEL MECANISMO DE TOLERANCIA AL FRÍO Y AL pH ÁCIDO Y DEL ANÁLISIS DE LAS PCHF Y PCHA EN *C. perfringens*.

- 1) Se sabe que durante el proceso y almacenaje de los alimentos, éstos se ven sometidos a bajas temperaturas y pH ácido ya que son algunos de los factores mas utilizados en su conservación. En este trabajo se demostró que las células vegetativas de *C. perfringens* adquieren tolerancia a bajas temperaturas y pH ácido después de ser sometidas a condiciones subletales previas. Pensamos que sería importante estudiar este aspecto en diversos alimentos ya que sabemos que existen varias condiciones o factores que pueden eliminar, disminuir o aumentar esta respuesta como lo son, la actividad de agua, el oxígeno presente, la consistencia del alimento, etc.
- 2) Varios estudios realizados nos muestran que la adaptación ácida confiere resistencia a una gran cantidad de condiciones de estrés, incluyendo calor, sales, H₂O₂ y polimixina B. Debido a que el choque ácido induce resistencia cruzada a una gran variedad de estrés, sería de gran importancia conocer si las células que sufren un choque ácido pueden ser prepararse para resistir condiciones desfavorables como las que se encuentran en el intestino (alcalinidad, ácidos grasos volátiles, etc). Además a un choque térmico, el cual es muy frecuentemente utilizado en el control de los microorganismos o al NaCl, o lactato de sodio que son conservadores empleados frecuentemente en el control sanitario de los alimentos.

- 3) Un estudio futuro sobre las proteínas de choque ácido y proteínas de choque frío encontradas podría enfocarse al aislamiento y purificación para determinar sus secuencias y observar si existen homologías entre éstas, y otras proteínas encontradas en diversos microorganismos.

- 4) Sería muy importante investigar la función de las proteínas de choque frío inmunodominantes reportadas en este trabajo y su posible relación con la virulencia de este patógeno; y determinar si estas proteínas pueden causar inmunidad contra la infección por esta bacteria y ser utilizadas como vacuna para la prevención o tratamiento de infecciones por este microorganismo.

LITERATURA CITADA

- Abraham, J.L. and J.I. Rood. 1985. Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **161**: 636-640
- Ahaern, H. 1991. Cellular responses to oxidative stress. *Features.* **57**: 627- 630
- Araki, T. 1991. Changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature. *Can. J. Microbiol.* **37**: 840-847
- Baik, S.H., S. Bearson, S. Dunbar and J. Foster. 1996. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiol.* **142**: 3195-3200
- Bayles, D.O., A. Bassam and B.J. Wilkinson. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 1116-1119
- Bearson, S., B. Bearson and J.W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**: 173-180
- Begonia, G. B. and M. L. Salin. 1991. Elevation of superoxide dismutase in *Halobacterium halobium* by heat shock. *J. Bacteriol.* **173**: 5582
- Berg, G.R., W.E. Inniss, J.J. Heikkila. 1987. Stress proteins and thermotolerance in psychrotrophic yeasts from arctic environments. *Can. J. Microbiol.* **33**: 383-389

- Bernhardt, L., U. Völker, A. Völker, H. Antelmann, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker. 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*- a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology*. **143**: 999-101
- Bodnaruk, P. W. and D. A. Golden. 1996. Influence of pH and incubation temperature on fatty acid composition and virulence factors of *Yersinia enterocolitica*. *Food Microbiol.* **13**: 17-22
- Borriello, S.P., A.R. Welach, H.E. Larson, F. Barclay, M.F. Stringer and Bartholomew, B. 1984. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* **1**:305-307
- Borriello, S.P., P.E. Barclay, A.R. Welch, M.F. Stringer, G.N. Watson, R.N. Williams, D.V. Seal and K. Sullens. 1985. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *J. Med Microbiol.* **20**: 363-366
- Bosch, T.C.G., S.M. Krylow, R. Bodeh and E. Steeler. 1988. Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 7927-7931
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brown, T.J., J. Jardine and C.A. Ison, 1993. Antibodies directed against *Haemophilus ducrey* heat shock proteins. *Microbiol. Path.* **15**: 131-139

- Buchmeier, N. A. and F. Hefron. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection in macrophages. *Science*. **248**: 730-732
- Bukau, B., P. Reilly, J. McCarty and G.C. Walker. 1993. Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. *J. Gen Microbiol.* **139**: 95-99
- Cachon, Z. D., J. Guzzo, J. F. Cavin and C. Divies. 1995. Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**: 140-145
- Cloutier, J., D. Prevost, P. Nadeau, and H. Antoun. 1992. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 2846-2853
- Cohen, I.R. 1991. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 567-589
- Correa, O. S. and A. J. Bameix. 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 153-157
- Davis, M.J., P.J. Coote and C. P. O'Byrne. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiol.* **142**: 2975-2982
- Duncan, C. L. and D.H. Strong. 1969. Experimental production of diarrhoea in rabbits with *Clostridium perfringens*. *Can J. Microbiol.* **15**: 765-770

- Engraber, M. and M. Loos. 1992. A 66-Kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.* **60**: 3072-3078
- Eschweiler, B., B. Bohrmann, B. Gerstenecker, E. Schiltz and M. Kist. 1993. *In situ* localization of the 60 kDa protein of *Helicobacter pylori*, which belong to the family of heat shock proteins, by immuno-electron microscopy. *Zbl. Bakt.* **280**: 73-85
- Farber, J. M. and F. Pagotto. 1992. The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**: 197-201
- Farber, J.M. and B.E. Brown. 1990. Effect of a prior heat shock an heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1584-1587
- Field, P.I., R.V. Swanson, C.G. Haideris and F. Heffron. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive with the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 51-89
- Flahaut, S., A. Benachour, C.J. Giard, P. Boutibonnes and Y. Auffray. 1996. Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch. Microbiol.* **165**: 317-324
- Flahaut, S., A. Hartke, CH. J. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes and Y. Auffray. 1996. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **138**: 49-54

- Foster, J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* **173**: 6896-6902
- Foster, J.W. 1992. Beyond pH homeostasis: the acid tolerance response of *Salmonellae*. *ASM News.* **58**: 266-270
- Foster, J.W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of ket acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 1981-1987
- Foster, J.W. 1995. Low adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: 215-237
- Foster, J.W. and H.K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**: 771-778
- Foster, J.W. and H.K. Hall. 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron and pH regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 4317-4323
- Fynlay, B.B. and S. Falkow. 1988. A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species. In: M.A. Horwits (ed). *Bacteria-host cell interaction*. Alan, R. L., Inc, New York. P 227
- Garren, D. M., M. A. Harrison and S. M. Russell. 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *J. Food Protect.* **61**: 158-161
- Gautan, K.S., R. Chowdhury and J. Das. 1994. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **62**: 5624-5631

- Gauthier, M. J. and R. L. Clément. 1994. Effect of a short period of starvation in oligotrophic waters on the resistance of enteric bacterial pathogens to gastric pH conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14** : 275-284
- Goldstein, J., N.N. Pollit and M. Inouye. 1990. Major cold shock proteins of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 283-287
- González, M. H., C. Perrin, P. Bracquart, Ch. Guimont and G. Linden. 1997. A 16 kDa protein family over expressed by *Streptococcus thermophilus* PB 18 in acid environments. *Microbiol.* **143**: 1587-1594
- Gorden, J. and P. L. C. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61**: 364-367
- Gounot, A.M. 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 386-397
- Graham, P. H., K. J. Draeger and M. L. Ferrey. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance de *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can. J. Microbiol.* **40**: 198-207
- Guilfoyle, D. E. and I. N. Hirshfield. 1996. The survival benefit of short-chain organic acid and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 393-396
- Guy, C.L. and D.Haskell. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* **84**: 872-878

- Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N.Y. pp. 636-652
- Hartke, A., S. Bouché, CH.J. Giard, A. Benachour. and P. Boutibonnes. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **33**: 194-199
- Hatheway, C. L. 1990. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 66-98
- Hecker, M. and U. Völker. 1990. General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 197-214
- Heredia, N.L., G.A. García, R. Luévanos, J.S. García-Alvarado and R.G. Labbé. 1997. Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* by sublethal heat shock. *J. Food Protect.* **60**: 998-1000
- Heredia, N.L., R.G.Labbé and J.S. García-Alvarado. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production and protein synthesis by *Clostridium perfringens* type A following heat shock. *J. Food Protect.* In press
- Herendeen, S.L., R.A. Van Bogelen and F.C. Neidhardt. 1979. Levels majors proteins of *E. coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**: 185-194
- Hew, C.L., G.K. Scott and P.L. Davis. 1986. In living in the cold: Physiological and biochemical adaptation (ed). Heller, H.C. (Elsevier, New York), pp 117-123
- Heyde, M. and R. Portalier. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 19-26

- Hickey, E. W. and I. N. Hirshfield. 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1038-1045
- Holmsquist, L., A. Jouper-Jaan, D. Weichart, R. Nelson and S. Kjelleberg, 1993. The induction of stress proteins in three marine *Vibrio* during carbon starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 185-194
- Holland, K.T., J.S. Knapp and J.G. Shoemith. 1987. *Anaerobic bacteria*. Chapman and Hall Publishers, N.Y. pp 154-158
- Hubert, W.A., L.G. Leduc and G.D. Ferroni. 1995. Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* **31**: 10-14
- Humphrey, J.T., P.N. Richardson, L.H.A. Gawler and J.M. Allen. 1991. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 258-26
- Humphrey, J.T., A. Williams, K. McAlpine, M. S. Lever, J. Guard-Petter and J. M. Cox. 1996. Isolates of *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. *Epidemiol. Infect.* **117**: 79-88
- Humphrey, T. J., N. P. Richardson, K. M. Statton and R. J. Rowbury. 1993. Effect of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3120-3122

- Iwahashi, H., S.C. Kaul, K. Obuchi and Y. Komatsu. 1991. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 325-328
- Jaattela, M. and D. Wissing. 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann. Med.* **24**: 249-258
- Jindal, S., A. K. Dudani, B. Singh, C. B. Harley and R. S. Gupta. 1989. Primary structure of a human-mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65kDa mycobacterial antigen. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2279-2283
- Jones, P.G. and M. Inouye. 1994. Micro review. The cold-shock response- a hot topic, *Mol. Microbiol.* **11**: 811-818
- Jones, P.G. and R.A. VanBogelen. 1987. Induction de proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 2092-2095
- Karem, K. L. , J.W. Foster and A. K. Bej. 1994. Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiol.* **140**: 1731-1736
- Kaufman, S. H., B. Schoel, A. Wand-Wurttener, U. Steinhoff, M. E. Munk and T. Koga. 1990. T-cell, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **155**: 125-141
- Khandekar, S.S., B.M. Bettencourt, K.C. Kelley and M.A. Recny. 1993. A simple and rapid method for the purification of GroEL, an *Escherichia coli* homolog of the heat shock protein 60 family of molecular chaperonins. *Prot. Expression and purification.* **4**: 580-584

- Kulakov, Y. K., G. Talet, M. R. Ramuz. and D. O' Callaghan. 1997. Response of *Brucella suis* 1330 and *B. canis* RM6/66 to growth at acid pH and induction of an adaptive acid tolerance response. *Res. Microbiol.* **148**: 145-151
- Labbé, R. G. 1989. *Clostridium perfringens*, p. 191-234. In Doyle, M.P. (De) Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. pp. 191-234
- Labbé, R. G. 1991. *Clostridium perfringens*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**: 711-718
- Lee, S.I., L. J. Slonczewski and J.W. Foster. 1994. A low-pH-inducible stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 1422-1426
- Leyer, G. J. and E. A. Johnson. 1993. Acid adaptation induced cross protection against environmental stress in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1842-1847
- Lin, J., G. Adams and T.A. Fitch. 1992. Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect. Immun.* **60**: 2425-243
- Lopes Gomes, S., M.E. Juliani, J.C.C. Maia and L.M. Silva. 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **168**: 923-930
- Love, B.C. and D.C. Hirsch. 1994. *Pasteurella multocida* produces heat shock proteins in turkeys. *Infect. Immun.* **62**: 1128-1130

- Mantis, N.J. and S.C. Winans. 1992. Characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* heat shock response: Evidence for a sigma 32-like sigma factor. *J. Bacteriol.* **174**: 991-997
- Matches, J. R., J. Liston and D. Curran. 1974. *Clostridium perfringens* in the environment. *Appl. Microbiol.* **28**: 655-66
- McClane, B.A., P.C. Hanna and A.P. Wnek. 1988. Mini-review. *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Microbial Pathogenesis.* **4**: 317-323
- McDonel, J.L. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* type A, B, C, D, and E, p 477-517. In Damer, F. and H. Drews (ed). *Pharmacology of bacterial toxins.* Oxford: Pergamon Press. London
- Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Georgopoulos. 1990. The stress response, function of the proteins and perspectives, pp. 1-59. In Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Georgopoulos (ed). *Stress proteins in biology and medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. pp. 1-59
- Murrel, T.G.C., B.G. Ingham, R.J. Moss and W.B. Taylor. 1987. A hypothesis concerning *Clostridium perfringens* type A enterotoxin (CPE) and sudden infant death syndrome (SIDS). *Med Hypothesis* **22**:401-40
- Neidhardt, F.C. and R.A. VanBogelen. 1987. Heat shock response. In Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Magasanik and H.E. Umbarger (Ed). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.* Vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nillo, L. 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet. J.* **21**:141-150

- Nystrom, T., M.R.Olsson and S. Kjelleberg. 1992. Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *Vibrio sp.* Strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 55-65
- O'Brien, L. M., S. V. Gordon, I. S. Roberts and P. W. Andrew. 1996. Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 11-17
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021
- O'Hara, W.G. and R.A. Glenn. 1994. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **161**: 268-292
- Ogata, S., M. Kanamori, H. Yamaguchi and H. Taguchi. 1987. Properties of protein antigen common to *Yersinia enterocolitica* and other Gram-negative bacteria. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**: 201-212
- Okereke, A. and S. T. Sterling. 1996. Induced acid-tolerance response confers limited nisin resistance on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **59**: 1003-1006
- Park, K.Y., B. Bearson, H.S. Bang, S.L. Bang and J.W. Foster. 1996. Internal pH crisis, lysine descarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **20**: 605- 611
- Phan- Thanh, L. and T. Gormon. 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **16**: 444-450

- Qoronfleh, M.W. and U.N. Strieps. 1987. Initial subcellular localization of heat-shock proteins in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. **43**: 373-377
- Rallu, F., A. Gruss and E. Maguin. 1996. *Lactococcus lactis* and stress. Antonie van Leeuwenhoek. **70**: 243-251
- Ring, K. 1965. The effect of low temperatures on permeability in *Streptomyces hydrogenans*. Biochem. Bioph. Res. Commun. **19**: 576-581
- Robert, M.E. and W.E. Inniss. 1992. The synthesis of cold shock protein and cold acclimation proteins in the psychrophilic bacterium *Aquaspirillum arcticum*. Curr. Microbiol. **25**: 275-278
- Rodríguez-Romo, L.A., N.L. Heredia, R.L. Labbé and J.S. García-Alvarado. 1997. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in México by dot blotting using a DNA probe. J. Food Protect. **61**: 201-204
- Rood, J. I. and S. Y. Cole. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev. **55**: 521-648
- Rowbury, R. J. and N. H. Hussain. 1996. Exposure of *Escherichia coli* to acid habituation conditions sensitizes it to alkaline stress. Lett. Appl. Microbiol. **22**: 57-61
- Sang, J. L., A. Xie, W. Jiang, J. Pierre, P. G. Jones and M. Inouye. 1994. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. Mol. Microbiol. **11**: 833-839
- Shandera, W.X., C.O. Tacket and O.A. Blake. 1983. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. J. Infect. Dis. **147**: 167-171

- Smith, L. D. and B. L. Williams. 1984. The pathogenic anaerobic bacteria, 3rd ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill.
- Stocker, B.A. and P.H. Makela. 1986. Genetic determination of bacterial virulence with special reference to *Salmonella*. Curr. Top. Microbiol. Inmunol. **124**: 149-153
- Subjeck, J.R., T. Shyy, J. Shenand and R. Johnson. 1983. Association between the mammalian 110,000 dalton heat shock protein and nucleoli. J. Cell Biol. **97**: 1389-1395
- Suton, R.G.A. and B.C. Hobbs. 1965. Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. J. Hyg. Camb. **66**:135-138
- Thammavongs, T., D. Corroler, J.M. Panoff, Y. Auffray and P. Boutibonnes. 1996. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. Lett. Appl. Microbiol. **23**: 398-402
- Tissieres, A., H.K. Mitchell and U. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. **84**: 389-398
- Traci, P.A. and C.L. Duncan. 1974. Cold shock lethality and injury in *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. pp 815-821
- Völker, U., H. Mach, R. Schmid and M. Hecker. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. **138**: 2125-2135

- Wallington, E.J. and P.A. Lund. 1994. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. *Microbiol.* **140**: 113-122
- Waterman, S. R. and P. L. C. Small. 1996. Identification of σ -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **21**: 925-940
- Watson, K. 1990. Microbial stress proteins *In* Rose, A. H. and D. W. Tempest. *Advances in Microbial Physiology*, **31**: 1050-1062
- Whiting, G.C. and R.J. Rowbury. 1995. Increased resistance of *Escherichia coli* to acrylic acid and to copper ions after cold-shock. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 240-242
- Whyte, L.G. and W.E. Inniss. 1992. Cold shock proteins and cold acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1281-1285
- Willmsky, G. 1992. Major cold shock protein of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 6326-6335
- Willis, A.T. 1960. *Anaerobic bacteriology in clinical medicine*. Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London
- Wnek, A.P. and B.A. McClane, 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infect. Immun.* **57**: 574-581
- Wu, Y.L., L.H. Lee, D.M. Rollins and W.M. Ching. 1994. Heat shock-and alkaline pH-induced protein of *Campylobacter jejuni* characterization and immunological properties. *Infect. Immun.* **62**: 4256-4260

- Yamagishi, T., T. Serikawa, R. Morita, S. Nakamura and S. Nishida. 1976. Persistent high numbers of *Clostridium perfringens* in the intestine of Japanese aged adults. Jap. J. Microbiol. **20**: 397-403
- Yamaguchi, H., T. Yamamoto, H. Taguchi and S. Ogata. 1990. *Yersinia enterocolitica* immunodominant 60 kDa antigen, common to a broad range of bacteria is a heat-shock protein. J. Gen. Bacteriol. **136**: 1091-1097
- Yong, K.P., B. Bearson, S. H. Bang, L. S. Bang and J.W. Foster. 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. **20**: 605-611
- Yotis, W.W. and C. Castimpolas. 1975. Scanning isoelectric focusing and isotachopheresis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. **39**:147-154
- Young, D.B. and T. R. Garbe. 1991. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **59**: 3086-3093
- Zeilstra-Ryalls, J., O. Fayet and C. Georgopoulos. 1991. The universally conserved GroE (Hsp 60) chaperonins. Annu. Rev. Microbiol. **45**: 301-325

