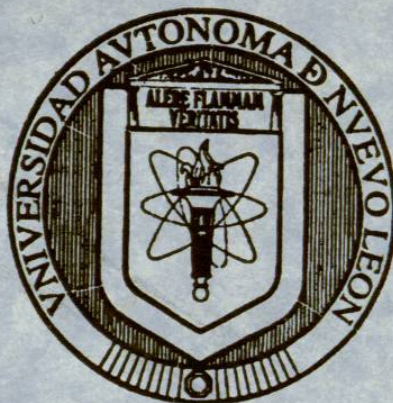


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE SOBRENADANTES DE CULTIVO SOBRE
LA ESPORULACION DE CEPAS NATIVAS
DE *Clostridium perfringens* Tipo A**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.**

PRESENTA

Q.B.P. GERARDO ALBERTO GARCIA MORENO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. JUNIO DE 2001

TM

SB975

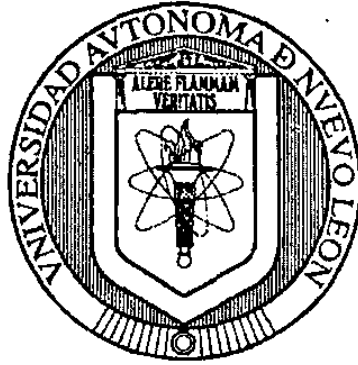
.G37

2001

c.1



1080124366



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFFECTO DE SOBRENADANTES DE CULTIVO SOBRE LA
ESPORULACION DE CEPAS NATIVAS
DE *Clostridium perfringens* Tipo A

TESIS

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

Q.B.P. Gerardo Alberto García Moreno

SAN NICOLAS DE LOS GARZA N. L.

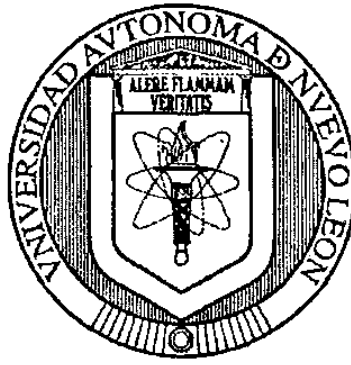
JUNIO DE 2001

J.B.P.

27
1982

FTM
SB975
-G137
2001





FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

POR:

Q.B.P. GERARDO ALBERTO GARCIA MORENO

COMISION DE TESIS
APROBADA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Santos García Alvarado", written over a horizontal line.

Dr. José Santos García Alvarado
PRESIDENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Norma L. Heredia Rojas", written over a horizontal line.

Dra. Norma L. Heredia Rojas
SECRETARIO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carlos E. Hernández Luna", written over a horizontal line.

Dr. Carlos E. Hernández Luna
VOCAL

Consumatum est

DEDICATORIA

A alguien que desde arriba nos mira.....

A mi hermano Agustín García Moreno (†)

A mis padres y mis hermanos quienes siempre me han apoyado en todo momento

A ti Rosy López L. que siempre que con amor y cariño has estado a mi lado en todo momento.

A mis amigos: Nereida, Ricardo, Joel, Verónica, Cesar, Genoveva, Guadalupe, Amelia y a los demás a quienes omití por falta de espacio sorry!

A la memoria del Físico Albert Einstein y del Dr Martin Luther King por ser pilares en crear, defender y hacer realidad sus sueños en pro de la humanidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 91712 otorgada para los estudios de Maestría realizada.

Al Dr. José Santos García Alvarado por ser mi director de tesis, por asesorarme y por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A la Dra. Norma L. Heredia Rojas por la co-dirección del trabajo y la paciencia en la revisión de la tesis.

Al Dr. Carlos E. Hernández Luna por tus comentarios la revisión de la tesis y la ayuda otorgada.

Al Dr. Ronald G. Labbe por su asesoría, comentarios y cepas proporcionadas en este trabajo

Al personal del Lab. de Bioquímica y Genética Microbiana de la Fac. de Ciencias Biológicas .

A ti por leer este trabajo que es un granito de arena más dentro del gran área de investigación

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA MICROBIANA Y GENETICA DE MICROORGANISMOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA U. A. N. L. BAJO LA DIRECCION DEL DR. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO Y LA CODIRECCION DE LA DRA. NORMA L. HEREDIA ROJAS

INDICE

| | |
|---|----|
| DEDICATORIA | 1 |
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| INDICE | 4 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 5 |
| RESUMEN | 6 |
| SUMMARY | 8 |
| INTRODUCCION | 9 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| <u>Esporulación de <i>Clostridium perfringens</i></u> | 14 |
| <u>Inducción de la Esporulación</u> | 23 |
| <u>Factores Extracelulares que Inducen la Esporulación en <i>C. perfringens</i></u> | 28 |
| HIPOTESIS | 33 |
| OBJETIVO | 34 |
| METODOLOGIA | 35 |
| RESULTADOS | 39 |
| DISCUSION | 53 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFIA | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| GTP | GuanidinTrifosfato |
| °C | grados centígrados |
| min | minutos |
| kDa | kiloDaltones |
| u.f.c./m | unidades formadoras de colonias por mililitro |
| u.f.c. ml ⁻¹ | unidades formadoras de colonias por mililitro |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| mM | unidad de concentración miliMolar |
| NTCC | Colección Nacional de Cultivos Identificados |
| RNA | Acido Ribonucleico |
| ATCC | Colección Americana de Cultivos Identificados |
| r.p.m. | revoluciones por minuto |
| µm | micras |
| GMP | Guanidin Monofosfato |

RESUMEN

La esporulación es el proceso que ocurre solamente en bacterias Gram positivas y específicamente en el género *Bacillus*. Este proceso inicia cuando las células vegetativas las cuales a pasar por una etapa carencial de nutrientes y la liberación de varias rutas metabólicas para la formación de esporas y posteriormente la liberación de estas. De este modo, las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un papel importante dentro del metabolismo de este proceso y la reducción de los niveles de esta última se ha visto que dispara el proceso de esporulación. En base a esto se han diseñado medios para la obtención de estas estructuras las cuales tienen gran importancia ya que durante la formación de las esporas y su liberación cuando se liberan toxinas las cuales están involucradas en intoxicaciones alimentarias. Ultimamente, se ha visto que ciertos metabolitos secundarios generados en el medio de cultivo donde crecen pueden estimular la esporulación. En este trabajo se determinó el efecto de los sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* y *S. Typhimurium* producidos en medio de esporulación de Duncan y Strong los cuales fueron agregados a cepas nativas de *C. perfringens* para ver el efecto que tienen estos sobrenadantes para inducir e incrementar la esporulación. Los resultados que se obtuvieron fueron que los sobrenadantes de *C. perfringens* estimularon aumentado significativamente (9.58 veces) la cantidad de esporas de las cepas nativas de *C. perfringens* con respecto al control, mientras que el sobrenadante de *S. Typhimurium* en estas mismas cepas estimuló la esporulación de cepas nativas al menos 1.9 veces con respecto al control.

Por otra parte, como un control positivo se utilizó medio de Duncan y Strong liofilizado y este fue agregado a las cepas nativas donde se observó un incremento al menos 1.3 veces con respecto al control utilizado en donde no se adicionó el medio. Por lo tanto, se concluyó que el medio de Duncan y Strong influye en forma muy modesta para incrementar la esporulación de este microorganismo. Sin embargo, un incremento substancial se observó cuando agregaron los sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* fueron inoculados.

SUMMARY

Sporulation is the process that occurs only in Gram positive bacteria and specifically of the genus *Bacillus*. This process starts when vegetative cells pass through a nutrient starvation stage and activates many metabolic pathways to spore formation and release it. Thus, the sources of carbon and nitrogen play an important role in the metabolism of this process. When the levels of nitrogen source decrease, the sporulation process begins. Many media have been designed to obtain spores, which has a big importance, because during the spore formation and release of this structure, many toxins are synthesized and released and these toxins are involved in food poisoning diseases. Recently, certain secondary metabolites generated in the media can stimulate the sporulation. This work, determines the effect of culture supernatants of *C. perfringens* y *Salmonella. enteritidis* var Typhimurium produced in sporulation media of Duncan Strong, which was added to native strains of *C. perfringens* to induce and increase the levels of spores. The results obtained after adding supernatant increased 9.58 fold the quantity of spores with respect to control. Meanwhile, the supernatant culture of *S. Typhimurium* growth in DS media, stimulated 1.9 fold with respect to control. A positive control was made with Duncan Strong and aggregated to native strains where it increased 1.3 fold versus control. We demonstrated that Duncan and Strong media does not influence to raise the sporulation with respect to other treatments done in this work, where the supernatant culture were inoculated.

INTRODUCCION

Los miembros del género *Clostridium* son de las principales bacterias anaerobias patógenas que afectan tanto a animales como humanos. Los organismos pertenecientes a este género presentan algunas características muy particulares, son organismos gram positivos, crecen en ausencia de oxígeno, forman esporas y pueden llegar a producir potentes toxinas. *C. perfringens* es uno de los microorganismos anaerobios que se encuentra más ampliamente distribuido, ya que se ha encontrado en el suelo, agua, aire, alimentos e intestino del hombre y animales (Rood J.I. et al, 1991).

Esta bacteria, posee una temperatura óptima de crecimiento de 43 a 45°C, en un rango que va de 15 a 50°C. Se ha reportado que en ciertas cepas que crecen a su temperatura óptima el tiempo de generación puede ser tan corto como 7.1 min, siendo este el menor tiempo reportado para cualquier bacteria patógena (Willardsen R.R. et al 1978). A través de los años, se le ha asociado como el principal productor de la gangrena gaseosa y a principios de la década de los cuarenta, Knox y Mc Donald en Inglaterra y Mc Clung en E.U.A. reportaron por primera vez, que este microorganismo era también responsable de una intoxicación alimentaria. Esta enfermedad era producida al ingerir alimento contaminado con células vegetativas, las cuales al esporular en el intestino, producían conjuntamente la enterotoxina. Además, se reportó que los síntomas característicos incluían: diarrea y dolor abdominal severo principalmente (Labbe et al 1981)

Por otra parte, el proceso de esporulación bacteriana es un fenómeno que se presenta únicamente en miembros de los géneros *Bacillus* spp y *Clostridium* spp. Este proceso implica la activación de vías metabólicas alternativas, cambios estructurales y como resultado, se observa la formación de una estructura de resistencia denominada espora. Este proceso puede ser inducido en gran parte por la reducción de los niveles de guanidinatrifosfato (GTP) y ribonucleótidos, debido a los bajos requerimientos nutricionales de las fuentes de carbono, así como a una baja en el nivel de nitrógeno del medio. Por lo anterior, las esporas formadas son bioquímica y morfológicamente diferentes a las células vegetativas (Sauer U. *et al* 1995).

C. perfringens secreta 12 tipos de toxinas extracelulares, siendo una de las más importantes la enterotoxina (Ent.) de 35.000 kDa causante de una intoxicación alimentaria. Aunado a lo anterior, este microorganismo también posee distintos atributos que pueden contribuir a causar una intoxicación alimentaria como son: 1) la habilidad de formar endoesporas resistentes, permitiendo sobrevivir en alimentos incompletamente cocinados 2) una amplia distribución en diversos hábitats entre los que se incluyen, suelo, agua, aire y 3) una gran habilidad de rápido crecimiento en alimentos contaminándolo a niveles necesarios para producir la intoxicación.

De acuerdo con lo anterior, la intoxicación en humanos ocurre cuando el alimento está contaminado con un gran número de células vegetativas (10^6 u.f.c. ml⁻¹), las cuales son expuestas a la acidez del estómago y al lograr sobrevivir, pasan al intestino delgado donde se multiplican y por último esporulan (Tang *et al* 1987, Labbe *et al* ,1991 y Shih N.J *et al*. 1995).

Es durante este proceso de esporulación en el cual se expresa la enterotoxina (Ent) representando entre el 15 y 30 % de la proteína sintetizada por las células en esporulación. Por lo tanto, la enterotoxina es acumulada en las tales células y después es liberada junto con la espora madura por la influencia de enzimas líticas. La toxina se une a un receptor de la membrana del intestino delgado incrementando la permeabilidad y a formación de poros. lo que provoca una pérdida del equilibrio de la presión osmótica, resultando en la destrucción de la membrana y por último la muerte de la célula (McClane *et al* 1996. Boquet *et al* 1998

C. perfringens puede ser encontrada formando parte de la microflora del suelo en forma de espora latente, siendo aislado con mayor frecuencia las cepas del tipo A, a niveles de 10^3 - 10^4 ufc/ml. Otras formas de encontrarlo esporulado, es en heces fecales de humanos. Se ha visto que en este material se encuentra en un rango de 10^4 - 10^6 esporas por gramo, donde la mayoría de las cepas aisladas de esta fuente son cepas termoresistentes, y por último también es encontrada como célula vegetativa en alimentos procesados o congelados (Labbe, R.G. *et al*, 1989).

C. perfringens es una de las principales bacterias anaerobias causante de enfermedades transmitidas por alimentos a escala mundial y estas representan un riesgo significativo para la salud de la población tanto en países en vía de desarrollo como en los desarrollados. De tal forma, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que un alto porcentaje de los 1,500 millones de casos de diarrea y las tres millones de muertes resultantes en menores de cinco años son debidas a alimentos contaminados. Tan solo en América Latina en 1995, se reportaron 15 brotes, de los cuales existieron 815 casos. Los principales alimentos más involucrados en la intoxicación por *C. perfringens* incluyen: carnes rojas, hígado, pollo, mortadela y mayonesa. Además, se ha visto que algunas especias utilizados para la preparación de diversos alimentos, son una fuente potencial de contaminación por esporas (OMS-OPS 1997).

Rodriguez-Romo *et al* (1998) demostraron que especias de amplio uso en México tales como ajo y pimienta, contienen cantidades considerables hasta de 500 u.f.c. por gramo de especia. Ellos detectaron el gene de la enterotoxina en 8 cepas de 188 demostrando así que el 4.25% de las muestras aisladas fueron potencialmente enterotoxigénicos.

De esta manera, el profundizar los estudios de estimulación de la esporulación por medio de factores extracelulares formados por las cepas de la misma u otra especie de genero bacteriano, nos adentrará más, sobre las causas por la cual se gobiernan y se estimulan los procesos de esporulación, debido a que es de vital importancia los cambios bioquímicos y morfológicos que sufre esta bacteria para la formación de la espora, así como la síntesis de la enterotoxina, la cual es determinante para provocar la intoxicación alimentaria causada por *C. perfringens*.

ANTECEDENTES

La Esporulación de *Clostridium perfringens*:

Las esporas, las cuales son una de las formas de sobrevivencia más importantes que se conocen, son estructuras producidas por los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, los cuales pueden resistir temperaturas tan altas como el punto de ebullición del agua y condiciones extremas de desecación. Algunos reportes han indicado que el tratamiento térmico a esporas de *C. perfringens* pueden resultar en esporas muertas, esporas sobrevivientes y esporas no dañadas. algunas de éstas últimas, pueden tener dañado el sistema de germinación lo cual hace necesario adicionar lisozima o nitratos para su germinación (Adams D.C. *et al* 1973 y 1974, Ando *et al* 1980 y 1986 Barach J.T. *et al* 1974, Cassier M. *et al* 1969 y Duncan C.L. *et al* 1972

Durante la esporulación bacteriana se generan cambios estructurales de la célula y bioquímicamente se implica la activación de rutas metabólicas alternas. Se ha demostrado que este proceso es similar entre las mismas especies de clostridios, mientras que si difiere en diversos aspectos de formación del esporangio en comparación con los del género *Bacillus*. La resistencia térmica de las esporas puede estar relacionada con tres factores significantes; a) deshidratación del protoplasto, b) mineralización y c) adaptación térmica (Roper G. *et al* 1976).

En *B. megaterium* se ha visto que la deshidratación del protoplasto de las esporas puede influir en el aumento de la termotolerancia. La adaptación térmica ha sido asumida a ser inherente o un componente intrínseco molecular, el cual está genéticamente determinado. Esto es, que las esporas de especies termofílicas son más resistentes que las especies mesófilas y estas que las de organismos psicrófilas. Sin embargo, existen especies que crecen a su temperatura máxima y son más resistentes que aquellas que crecen a su temperatura óptima o mínima; estos factores parecen impuestos por elementos genéticos (Beaman T.C. *et al* 1986). Por su parte, Heredia *et al* (1997) han reportado en *C. perfringens* que la producción de las esporas termotolerantes aumenta drásticamente después de haber aplicado un choque térmico subletal durante la esporulación.

Piggot *et al.* establecieron que la esporulación consta de 7 etapas (Fig.1): la primera consiste en condensación de la cromatina; la etapa II implica la formación de un septo por medio de una invaginación de la membrana hacia un polo de la célula. En la etapa III ocurre la formación de un protoplasto en la célula madre; la etapa IV consiste de un depósito de peptidoglicano entre las dos membranas del protoplasto de la espora. La etapa V se caracteriza por un depósito de proteínas alrededor de la membrana externa. La etapa VI es la maduración de la espora en cuyo tiempo desarrolla sus características de resistencia. Finalmente en la etapa VII ocurre la lisis de la célula madre y la liberación de la espora completa (Piggot *et al* 1976).

Aunado a la esporulación, otro aspecto importante, es la germinación de las esporas, la cual es descrita como la serie de reacciones bioquímicas degradativas e irreversibles, que rompen la latencia de la spora (Billon *et al* 1996).

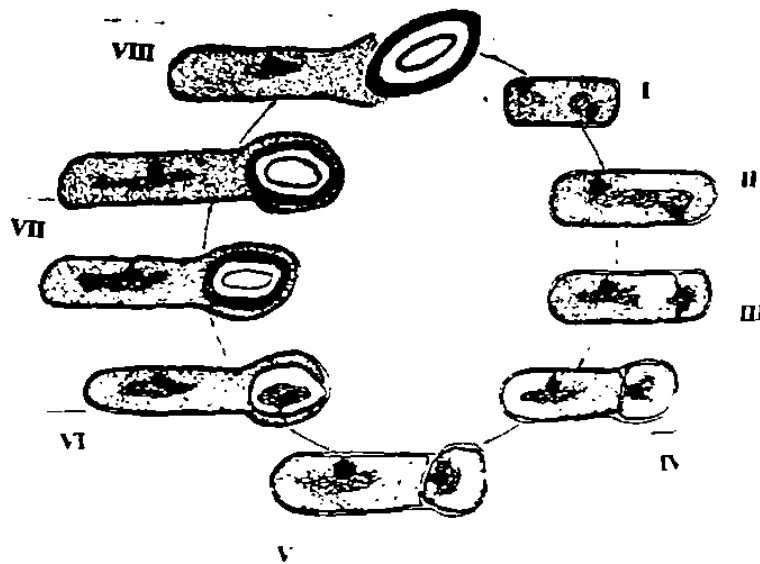


Fig. 1 Esquema del proceso de la esporulación del género *Bacillus*

Debido a que *C. perfringens* no produce fácilmente esporas *in vitro*, varias estrategias han sido desarrolladas para lograr este fin. Diversos grupos de investigadores han desarrollado medios especiales de esporulación, entre los cuales se incluyen al medio Ellner, el SEC, un medio basado en extracto de levadura-tripticasa, el medio Same, y un medio modificado llamado Ellner-SEC que fueron probados con cepas del tipo A (Hoeniger J. *et al* 1968). Estos mismos investigadores establecieron que con el medio Ellner obtuvieron un porcentaje de 80 a 100% de esporulación de *C. perfringens* tipo D observando, su citología por medio de un microscopio de luz y de contraste de fase.

La temperatura de incubación y el pH son dos parámetros físico-químicos que no solo pueden influir fisiológicamente en el medio de cultivo durante la formación de esporas, sino que también en la producción de enterotoxina. Se ha reportado que la temperatura de esporulación es de un rango de 35-40°C. En medios complejos como el de Duncan y Strong los máximos niveles de esporulación son alcanzados en 7 h a 37°C. La temperatura a la cual las esporas son formadas tiene un efecto apreciable en su termoresistencia. García-Alvarado *et al* (1992) encontraron que las esporas formadas a una temperatura de 37° C eran menos termoresistentes que aquellas que fueron formadas a 43°C. Otro factor que interviene es el pH, cuyo rango adecuado va de 6.0-8.0 (Labbe *et al*, 1981).

Labbé *et al* (1977) marcaron la relación existente entre la esporulación y la síntesis de enterotoxina en medios químicamente definidos. Ellos encontraron en la cubierta esporal cantidades significativas de enterotoxina y concluyeron que la enterotoxina era un componente de la cubierta de la spora. Sin embargo, Ryu y Labbé (1989) continuaron con la investigación acerca de esto y encontraron que la enterotoxina, es una proteína de 35 kDa, no era un componente estructural mayor de la cubierta de esporas de *C. perfringens*. Ellos determinaron que las proteínas relacionadas con la enterotoxina se presentaban en un 2.7% de las cepas positivas para enterotoxina y en un 0.8% de las cepas negativas.

Por su parte, aportando un poco más a lo anterior, Goldner *et al* (1986) demostraron que la síntesis de enterotoxina podía ser llevada a cabo en cultivos normales no esporulantes, dentro de un quimicostato en sistema de cultivo continuo, cuando las células eran crecidas en un medio químicamente definido. Sin embargo, si se observó la presencia de células vegetativas en cultivos batch durante el crecimiento exponencial.

Existe un reporte por el cual la enterotoxina de *C. perfringens* se relacionaba con el proceso de esporulación sin embargo, no estaba involucrado de manera directa. Czeczulin *et al* (1993), clonaron, secuenciaron y expresaron el gene de la enterotoxina en *E. coli*. Demostraron que el gene, codifica para un polipéptido de 319 residuos de aminoácidos. deduciendo con este es el peso molecular exacto de la enterotoxina el cual es de 35,317 daltones. Además, la expresión de la enterotoxina fue más fuerte en las células esporulantes que en la células vegetativas de *C. perfringens* o que en la recombinante de *E. coli*. Posteriormente, este mismo autor sugirió fuertemente que en cepas del tipo A,B,C enterotoxina negativa, producían un factor asociado con el proceso de esporulación y que estos factores influyan tal vez en la expresión de otros genes de este microorganismo (Czeczulin *et al* 1993, 1996).

Por otra parte se ha reportado la formación de inclusiones intracitoplasmáticas en la familia *Bacillus*. En el caso de *C. perfringens*. Loffler y Labbé (1985) lograron el aislamiento de un cuerpo intracelular durante la esporulación de la bacteria, ellos encontraron que dichas inclusiones estaban serológicamente relacionadas a la enterotoxina.

Posteriormente estos mismos investigadores en 1986 aislaron y caracterizaron dichos cuerpos parasporales. Se analizó el peso molecular, su composición y se secuenció el péptido. donde se reveló, que existían grandes similitudes entre el cuerpo parasporal y la enterotoxina.

Las fuentes de carbono representan un papel muy importante para que la esporulación se lleve a cabo correctamente. Carbohidratos tales como el almidón del medio de Duncan y Strong, se ha utilizado satisfactoriamente para aumentar la formación de esporas (Duncan *et al* 1968). Estudiando métodos para promover la esporulación en un medio definido, Sacks *et al* (1978) observaron que algunas cepas de *C. perfringens* incrementaron su nivel de esporulación cuando se les agregó una fuente de energía de carbohidratos. Se estableció que la dextrina era mucho mejor para la producción de las esporas.

La composición específica de carbohidratos del medio de esporulación también puede afectar este proceso. Altas concentraciones de estas sustancias pueden inhibir de esporulación de *C. perfringens*. por ejemplo en el caso de la glucosa, maltosa, manosa, lactosa y sacarosa a 15 mM. Sin embargo, este proceso no se ve afectado a concentraciones de 30 mM para carbohidratos como la ribosa, galactosa o fructosa (Shih *et al* 1995). En un medio químicamente definido la presencia de glucosa a 8 mM junto con almidón soluble y de dextrina permite la esporulación adecuada de esta bacteria (Labbe *et al* 1976).

En trabajos anteriores realizados por Labbe *et al* (1979, 1980) se demostró que al sustituir el almidón por rafinosa en el medio de Duncan y Strong se aumentaba la esporulación y la cantidad de enterotoxina en ciertas cepas de *C. perfringens*. De igual manera, se ha reportado que el medio de esporulación Duncan-Strong prereducido incrementaba aún más la esporulación del microorganismo en comparación a cuando se preparaba en condiciones normales (Craven *et al* 1988).

Además de las fuentes de carbono, la presencia de algunos iones metálicos es importante durante la esporulación, aumentando o disminuyendo la formación de las esporas. Se ha reportado en *B. subtilis* la necesidad de iones de manganeso (Mn^{+2}) para el crecimiento y esporulación de este microorganismo ya que se observó que la enzima fosfoglicerato fosfomutasa requería estrictamente este ion y cuando estuvo ausente, no esporuló en el medio normal de esporulación (Vashanta *et al* 1979).

La adición de otros iones de transición como cobre, zinc etc., cuando fueron agregados en concentraciones de 1 mM, aumentaron al menos 1 logaritmo la cantidad de esporas en *C. botulinum* (Kihm *et al* 1988). Otra cuestión interesante, que existe durante la ingesta de un alimento contaminado con *C. perfringens*, es que se ha reportado que la célula vegetativa durante el trayecto hacia el intestino delgado, sufre de una falta de alimento y esporula influenciado por medio de la acción de ciertos agentes como el jugo gástrico y las sales biliares (Labbe *et al* 1988).

En ensayos con sales y jugo biliar *In vitro*, se observó que ayudaba a aumentar la esporulación en algunas especies de clostridios, sin embargo, un exceso en la concentración de estas sales reducían la cantidad de células esporuladas. (Heredia *et al* 1991 y Wilson *et al* 1983)

Inducción de la Esporulación :

Además de las modificaciones de los medios de cultivo que se han realizado para *C. perfringens* y otras especies del género *Bacillus*, existen diversos iones y compuestos diversos los cuales han sido añadidos de manera extracelular para aumentar la esporulación *In vitro* entre los miembros de este género bacteriano.

Se ha demostrado que la adición de aminoácidos al medio de cultivo, es fundamental para la síntesis de proteínas *de novo* durante el proceso de esporulación. Así Kennedy *et al* (1970), observaron que la concentración de ácido glutámico y otros aminoácidos disminuyen durante la esporulación. Por lo que cuando este aminoácido era agregado a un medio definido para *B. cereus*, aumentaba la cantidad de esporas cerca del 90% en relación con aquellos a los cuales no se les adicionó. Mientras tanto, la adición de ácido glutámico aumentó también los efectos en las propiedades de la spora, ya que fueron más termotolerantes y resistentes a la acción de la luz ultravioleta, provocando el aumento de ácido diaminopimérico (DPA) Por su parte, Hawiro *et al* demostraron que la adición de isoleucina al medio de esporulación químicamente definido para *C. botulinum* del tipo E, no tuvo una buena eficiencia en el aumento de la esporulación, sin embargo, este era esencial para la germinación de las esporas termoactivadas, demostrando que la isoleucina es acumulada en una reserva ácido soluble prominente durante la germinación de este microorganismo.

Además de la deficiencia nutricional, existen reportes de otros factores tales como el exceso de glucosa, iones amonio y fosfato que inducen el proceso de esporulación. Así, Vasantha *et al* en 1980 demostraron en *B. subtilis* que la esporulación realizada con las condiciones de exceso mencionadas anteriormente, aunado con la adición de decoyina, incrementaba la actividad de las enzimas tales como: proteasas intra y extracelulares y la aspartato transcarbamilasa. Sin embargo, al agregar el inductor, se obtenía una gran disminución en la actividad enzimática. Mientras que enzimas tales como la fosfatasa alcalina y la glucosa deshidrogenasa aumentaron después de que se les agregó el inductor.

En una búsqueda alternativa para obtener la estimulación de la esporulación, se utilizaron compuestos analogos de purinas, los cuales intervienen de alguna manera e inducen la esporulación probablemente por una reducción de los niveles de GTP que hace que se dispare a esporulación (Setlow *et al* 1983).

Sacks *et al* (1997), estimularon la esporulación por medio de metilxantinas tales como la cafeína, la teofilina y la isobutilmetilxantina. observando en muchos casos, grandes incrementos en la cantidad de esporas de *C. perfringens*. sin embargo, también encontraron que no dependia totalmente de tales sustancias, sino que lo hacían en gran parte de la fuente de carbono utilizada en diferentes concentraciones.

Otro informe en *B. subtilis*, demostró que algunas sustancias relacionadas con las metilxantinas indujeron la esporulación, tal fue el caso del nucleosido decoyinina y el compuesto hadacinina, los cuales estimularon el proceso de esporulación mediante la reducción de los niveles de GTP, aumentando la cantidad de esporas producidas de este microorganismo (Sacks *et al* 1990). Sacks *et al* (1982), encontraron que los niveles de esporulación se incrementaban con la adición de papaverina y con la teofilina aunque el efecto de esta última era menor.

Por su parte, Craven *et al* (1982), demostraron en *C. perfringens*, que el uso de nucleosidos derivados como el hidrocloreto de papaverina e imidazol en distintas concentraciones agregados al medio de Duncan-Strong modificado al cual al cambiar la peptona proteosa por peptona y de rafinosa por almidón, aumentaba la cantidad de enterotoxina. Además, se observó que la adición del imidazol no tuvo efecto alguno en la formación de esporas ni de enterotoxina en cepas del tipo A. Esto dejó en claro que el aumento de la esporulación dependía en parte de la concentración, pero también del tipo de un análogo de nucleósido utilizado, además del tipo de peptona y carbohidrato agregado al medio (Craven *et al* 1982).

Este medio fue utilizado por Juneja *et al* (1993) y demostró que a las 3 h de incubación se obtenían cantidades detectables de enterotoxina y esporas termoresistentes a las 6 h., sin embargo, estos incrementos dependían del tipo de cepa y de la concentración de las sustancias mencionadas.

Otro compuesto relacionado con la papaverina es la inosina que es un nucleosido de purina. Su adición al medio indujo la esporulación en *B. subtilis*. Este compuesto revirtió una inhibición selectiva de la esporulación, mientras que nucleosidos de pirimidinas no fueron eficientes en la inducción de la esporulación (Sekar *et al* 1981).

Con respecto al papel que juegan los carbohidratos sobre la esporulación Sacks *et al* (1983) determinaron su influencia, los cuales fueron añadidos junto con la guanosina en un medio químicamente definido. Se observó que cuando la dextrina y guanosina fueron añadidas, se induce la producción de altas cantidades de esporas, así como de la formación de enterotoxina en este medio. Mientras que la ausencia de guanosina, disminuyó el crecimiento de esta bacteria.

Shih *et al* (1994), encontraron que la glucosa y otros azúcares tuvieron efecto sobre la esporulación y la producción extracelular de α -amilasa en *C. perfringens* NTCC 8679. Ellos encontraron que concentraciones entre 6 a 10 mM de tales azúcares con excepción de la fructosa estimularon la producción de α -amilasa . Así mismo, la concentración de glucosa, manosa y lactosa a 8 mM reprimieron el proceso de esporulación. También, se observó que los niveles de esporas termoresistentes disminuyó conforme disminuía la concentración de estos carbohidratos. Con esto sugirieron que los mecanismos de represión catabólica de la producción de amilasa y de la esporulación son distintos en esta cepa.

Factores Extracelulares que Inducen la Esporulación en *C. perfringens*

La diferenciación en células procarióticas a menudo involucra la comunicación. De esta manera, la esporulación bacteriana al ser considerada una etapa más de diferenciación celular, en ocasiones requiere de comunicación química entre las mismas células para poder llevar a cabo esta etapa dentro de su ciclo celular. Esta comunicación es regulada por medio de una variedad de señales químicas, que en ocasiones pueden ser péptidos u otros compuestos liberados por las células cuando existe un factor adverso. Debido a esto, se ha establecido que existen distintas clases de moléculas que actúan en diferentes tipos de microorganismo reportados como señales químicas dentro de la comunicación extracelular las cuales se resumen en la Tabla No.1 (Dunny *et al* 1998):

Tabla No. 1: Resumen de los principales sistemas de comunicación química extracelular en bacteria gram positivas:

| Organismo | Procesos regulados | Naturaleza de la señal | Mecanismo objetivo |
|--|---|-------------------------|--|
| Bacterias lacticas | Producción de bacteriocinas | Péptido | Dos componentes 1) promotores 2) regulación del sistema biosintético de producción |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>S. sanguis</i> y <i>Lactococcus lactis</i> | Producción de la bacteriocina lantibiotico (nisina) | Péptido | Dos componentes: 1) señales de traducción 2) promotores com |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Competencia (esporulación) | Péptido | Dos componentes y señales de importación: 1) promotores com 2) fosfatasas rap |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Virulencia (locus arg) | Péptido | Dos componentes: sistema regulatorio y promotor del RNA |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Conjugación | Péptido | Internalización procesos de transcripción o traducción |
| <i>Streptomyces gausei</i> | Metabolismo secundario | γ -butirolactona | Internalización: promotores para los genes del ruta biosintética para antibióticos. |

Uno de los primeros reportes sobre la estimulación de la esporulación lo realizó Grossmann *et al* (1988) quienes reportaron que en *B. subtilis*, existía un control para la formación de esporas mediado por un factor extracelular que era requerido para el control del proceso. También se demostró que este factor era a) acumulable en los sobrenadantes de cultivos, b) termorresistente, c) sensible a proteasas, d) es dializable y por último e) que dependía en parte de una alta densidad celular. Además, tuvo efecto en inducir la esporulación tanto en células normales como en mutantes.

El gene *spo0* juega un papel importante en el inicio del proceso de esporulación, ya que los productos de este gene sufren una fosforilación múltiple. Este proceso inicia por medio de una señal intra o extracelular, la cual induce a una proteína denominada *KinA* la cual es fosforilada por la proteína *Spo0F*, la cual actúa como sustrato primario y una vez ocurrido esto, se llega a fosforilar la proteína reguladora *SpoA* permitiendo disparar el inicio del proceso de la esporulación (Burbulis *et al* 1991).

Por su parte, Rudner *et al* (1991) establecieron que un sistema codificado por el gene *spo0K* puede tener un papel de sensor de los factores extracelulares. Además, demostraron que los productos de este gen eran requeridos para una esporulación eficiente.

Waldburger *et al* (1993) caracterizaron un nuevo factor de esporulación en *B. subtilis*, el cual también estimulaba el proceso cuando las células se encontraban en bajas densidades celulares. Sin embargo, a diferencia del informe previo, además del factor de esporulación, se le adicionaron los aminoácidos prolina y arginina, lo cual permitió una resistencia al ataque proteolítico. Además, se encontró que el factor de esporulación no estaba involucrado con la inducción de la síntesis de α -amilasa al inicio de la esporulación, y que las células mutantes asporógenas también produjeron este factor inductor de la esporulación.

En 1996, Solomon *et al* reportaron la purificación y caracterización de este factor extracelular inductor de la esporulación en *B. subtilis*. Se estableció que era un péptido de 5 residuos el cual era transportado hacia dentro de la célula por medio de una permeasa oligopeptídica *SpoOK* y afectaba dos vías de desarrollo distintas por un lado, promoviendo la estimulación de la competencia de expresión génica por inhibición del gen *FapC*, el cual es un regulador negativo del gen *srfA*, el cual dispara la esporulación cuando las células se encuentran en baja densidad celular (Perego *et al* 1996).

Como anteriormente se mencionó, la comunicación extracelular no solo ocurre en procesos tales como la esporulación, también se ha visto que estas señales regulan la expresión de la virulencia de ciertas bacterias patógenas (Solomon *et al* 1996)

En 1994, Guangyong *et al* reportaron que existe la regulación de la virulencia de *Staphylococcus aureus* estaba asociada a la densidad celular, mediante la liberación de un octapéptido producido por la misma cepa. Con esto, la respuesta involucraba una regulación recíproca de genes que codificaban a proteínas de superficie que son reprimidas por el gene de virulencia de *S. aureus*. El efector intracelular *arg* es un RNA regulatorio, el RNAIII. La transcripción era activada por un sistema de transducción codificado por el gen de virulencia, donde el octapéptido actuaba como un ligando (Guangyong *et al* 1994). En últimas fechas, se ha determinado que el péptido *PhrA* que actúa como señal, interviene activando el producto del gene *phrA* el cual es un pentapéptido que actúa directamente inhibiendo a una fosfatasa RapA (Dunny *et al* 1997)

Con lo que respecta a *C. perfringens*, se ha reportado que los sobrenadantes del medio definido (D) de 12 cepas de los tipos A,B,C y D, estimularon la esporulación en cepas de referencias. Se demostró que este factor no solo es secretado en el medio de esporulación, sino que también se producía durante el crecimiento de células vegetativas tanto de cepas enterotoxina positiva como enterotoxina negativa (Shih *et al* 1996).

De esta manera, al profundizar más en esta área, pudiera ayudar a conocer el comportamiento de estas bacterias durante los procesos de elaboración de alimentos en donde interviene la esporulación y su interacción con otros microorganismos. Con todo lo anterior y a que en *C. perfringens* se ha demostrado que la esporulación puede ser por medio de metabolitos producidos por la misma bacteria y liberados al medio extracelular y al no existir reporte alguno acerca de la estimulación por medio de factores extracelulares que estimulen cepas nativas provenientes de muestras alimentarias, consideramos de gran importancia establecer la existencia de esta respuesta. Esto nos permitirá entender mejor la prevalencia y patogénesis de las enfermedades producidas por la bacteria. Estamos convencidos que los conocimientos existentes aunados con los que pudieran aquí generarse podrían servir para establecer medidas eficaces de control contra este microorganismo.

HIPOTESIS

Los factores extracelulares liberados por *Clostridium perfringens* y *Salmonella enteritidis* var Typhimurium, pueden inducir la esporulación de cepas nativas de *Clostridium perfringens* aisladas de muestras alimentarias

OBJETIVO:

Determinar la actividad de sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* y *S. enteritidis* var Thyphimurium en medio de Duncan y Strong sobre la esporulación de cepas nativas de esta bacteria

METODOLOGIA

CEPAS UTILIZADAS:

Se utilizaron 5 cepas de referencia de *C. perfringens*, FD-1041, FD-1, H6, H9 y ATCC 3624 proporcionadas por el Dr. Ronald G. Labbe del Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachussets en Amherst, MA, Estados Unidos. Estas cepas se mantuvieron como cultivos esporulados en medio de carne cocida según Robertson (Difco) a -18°C. Se realizaron resiembras de las cepas cada 3 meses. También, se utilizó una cepa de *Salmonella* Typhimurium la cual se mantuvo en Agar Infusión Cerebro Corazón (Difco) a -4°C.

ACTIVACION DE LAS CEPAS:

Se tomó una alícuota del medio de reserva de *C. perfringens* de referencia y se colocó en tubos con 10 ml de caldo con tioglicolato (Difco). Inmediatamente después, los cultivos se sometieron a un choque térmico de 75°C/15 min, a fin de ayudar a la germinación de las esporas. Posteriormente se incubaron a 37°C por 14 a 16 h. Por otra parte, para la activación de la cepa de *S. Typhimurium*, se realizó en tubos con 5 ml de los cuales, se transfirió una asada de inóculo a tubos con caldo Infusion Cerebro Corazón (ICC) y fueron puestos a 37°C por espacio de 16 a 18 h.

PREPARACION Y EXTRACCION DEL FACTOR EXTRACELULAR ESTIMULANTE DE LA ESPORULACION:

A partir de las cepas activadas se realizó la inoculación (1%) de tubos con 5 ml de medio de Duncan y Strong con rafinosa y se incubaron a 37°C, en un baño de agua de 18 a 24 h a fin de permitir que los cultivos esporularan completamente. Una vez transcurrido el tiempo, los cultivos se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm durante 20 min a 4°C, y se obtuvo el sobrenadante, el cual se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0.45 µm. Dichos sobrenadantes fueron congelados y liofilizados a fin de concentrar la cantidad de muestra obtenida.

INDUCCION DE LA ESPORULACION EN CEPAS NATIVAS DE *C. perfringens* POR MEDIO DEL FACTOR EXTRACELULAR OBTENIDO:

Los sobrenadantes liofilizados, se resuspendieron en 125 µl de agua bidestilada para poder centralos 40 veces y fueron agregados (50 µl) a tubos con 5 ml de medio de Duncan y Strong, los cuales fueron inoculados al (1 %) con cepas nativas obtenidas de especias (Romo *et al* 1998).

Después se realizó con cuidado y por duplicado la mezcla de los sobrenadantes con los cultivos ensayados cuyo orden fue el siguiente:

- 1.- Cepa nativa + sobrenadante de cepa FD-1 crecida en Duncan y Strong
- 2.- Cepa nativa + sobrenadante de cepa FD-1041 crecida en Duncan y Strong
- 3.- Cepa nativa + sobrenadante de cepa H9 crecida en Duncan y Strong
- 4.- Cepa nativa + sobrenadante de cepa H6 crecida en Duncan y Strong
- 5.- Cepa nativa + sobrenadante de cepa ATCC 3624 crecida en Duncan y Strong
- 6.- Cepa nativa + sobrenadante de *Salmonella Typhimurium* crecida en Duncan y Strong
- 7.- Cepa nativa + sobrenadante de medio de Duncan y Strong no inoculado. (cntl negativo)
- 8.- Cepa nativa + Agua bidestilada esteril (control negativo)

DETERMINACION DE LOS PORCENTAJES DE ESPORULACION:

Después de haber realizado las mezclas para la inducción de la esporulación se incubaron a 37°C y 6 horas después de su inoculación, se realizaron frotis de las muestras y se observaron en un microscopio de contraste de fase para obtener el porcentaje de esporulación y para determinar la fase en que se encontraron las células en esporulación así como de cambios morfológicos que se pudieran presentar. Los cultivos se incubaron por 24 horas a 37°C para permitir que se completara la esporulación, en el caso en que se presentara y posteriormente se realizó una cuenta en placa de esporas termoresistentes.

Para el conteo en placa, a los cultivos se les aplicó un choque térmico (75°C por 15 min) para eliminar las células vegetativas, dejando únicamente esporas termoreistentes, después se tomó una alícuota de los cultivos, y se realizaron diluciones decimales para posteriormente sembrarse en medio nutritivo con agar. Las placas se incubaron a 37°C utilizando una atmósfera de N₂ y CO₂ (95:5) 48 h.

Se contaron las colonias y de los resultados se obtuvieron los porcentajes de esporulación y fueron analizados por medio de un análisis de ANOVA (prueba de Bonferonni) para determinar si existió una diferencia significativa entre los tratamientos y los controles. Todos los experimentos se realizaron por triplicado al menos con 2 repeticiones.

RESULTADOS

- **Influencia de los sobrenadantes de cultivo en el porcentaje de esporulación.**

En este trabajo, se utilizaron las cepas de referencia H6, H9 y ATCC 3624 de *C. perfringens*. Estas cepas presentan baja esporulación y son apropiadas para determinar un posible efecto de estimulación en la producción de esporas y posteriormente poder utilizarla como control para los tratamientos realizados. De esta manera, a las cuatro horas de crecimiento, las bacterias presentaron las etapas iniciales de esporulación. Además, se observaron notables cambios morfológicos tales como la presencia de bacilos largos y delgados. Sin embargo, para este trabajo se tomó como referencia a las 6 horas de crecimiento en todos los tratamientos ya que a este tiempo muchas de las cepas de *C. perfringens* que crecen en medio de Duncan-Strong presentan un porcentaje de esporulación alto (generalmente mayor al 50%).

| Tipo de Cepa | PORCENTAJE DE ESPORULACION | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| | Sobrenadante de FD-1041 | Sobrenadante De <i>S. Typhmurium</i> | Medio Duncan-Strong Liofilizado | Control Positivo |
| Nativas (promedio de 60 cepas) | 91 | 42 | 51 | 32 |
| ATCC 3624 | 59 | 5 | 4 | 0 |
| H9 | 85 | 50 | 58 | 34 |
| H6 | 34 | 37 | 23 | 7 |

Tabla 1 Efecto de sobrenadantes de cultivo en medio de Duncan-Strong sobre el porcentaje de esporulación de cepas de *C. perfringens*. La determinación se hizo a las 6 h bajo el microscopio de contraste de fases.

Durante los ensayos realizados con las cepas nativas a las cuales se les adicionó los distintos sobrenadantes obtenidos, se observó un porcentaje de esporulación hasta de un 91% cuando se le agregó el sobrenadante de la cepa de *C. perfringens* FD-1041. Las cepas de referencia ATCC 3624, H9, H6 mostraron también un alto porcentaje de esporulación en contraste con los otros tratamientos y al control utilizado (Tabla #1).

También se encontró que en el caso de las cepas nativas, el porcentaje de esporulación obtenido después de haber agregado medio de D-S liofilizado fue mayor al tratamiento al cual se le agregó el sobrenadante liofilizado de *S. Typhimurium* incluso ambos porcentajes fueron superados por la cepa H9 (Tabla No.1). Sin embargo, este efecto no se observó con las cepas H6 y la ATCC 3624.

• **Influencia de los sobrenadantes de *C. perfringens* FD-1041 en la esporulación de cepas nativas.**

La cantidad de esporas termoresistentes producidas por la cepas nativas de *C. perfringens* por la influencia del sobrenadantes de cultivo de la cepa FD-1041 fue (en promedio de 60 cepas) de 1.83×10^7 esporas/ml (Tabla No.2) y en forma general aumentó al menos un 9.58 veces la cantidad de esporas obtenidas en comparación con el control el cual en promedio produjo 2.60×10^6 esporas/ml (Tabla No.2).

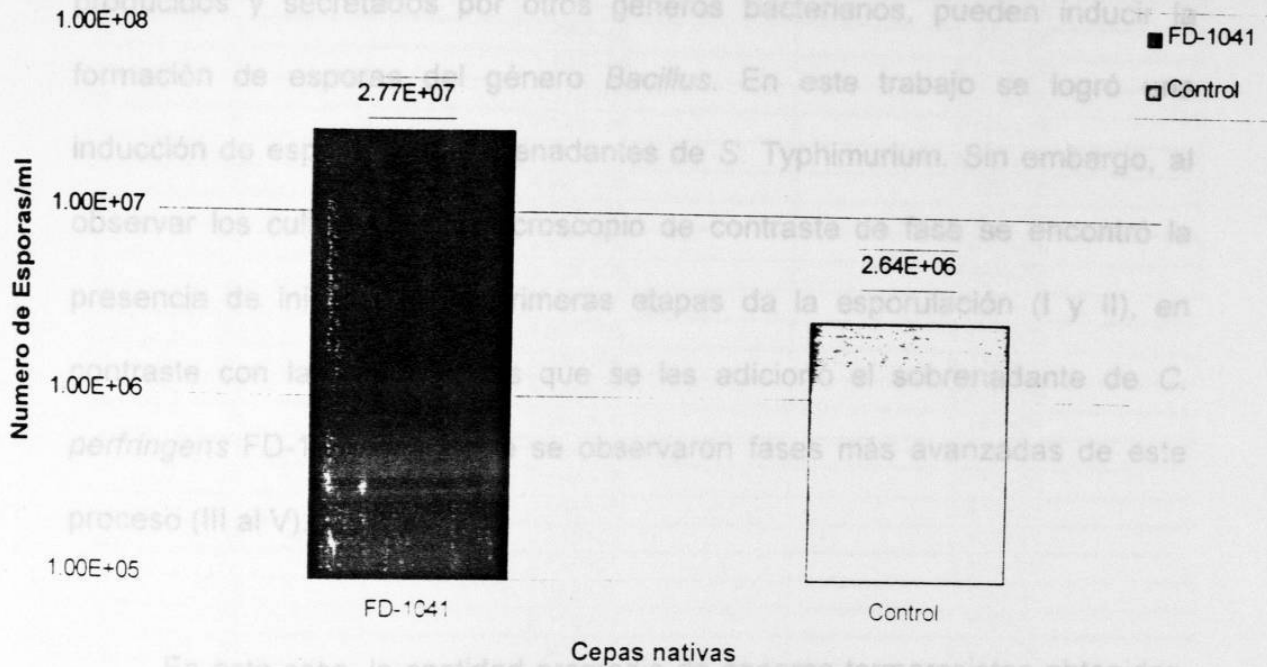
Tabla No. 2 Cantidad de esporas termoresistentes de cepas nativas después agregar sobrenadantes de *C. perfringens* FD-1041

| Numero de Cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|-------------------------|---------------------------|
| | Sobrenadante de FD-1041 | Sin sobrnadante (Control) |
| 1 | 2.81E+07 | 2.70E+05 |
| 2 | 5.00E+06 | 4.60E+05 |
| 3 | 7.28E+07 | 1.30E+05 |
| 4 | 5.64E+07 | 2.64E+05 |
| 5 | 6.01E+07 | 1.30E+05 |
| 6 | 2.45E+07 | 2.12E+05 |
| 7 | 2.97E+07 | 6.11E+05 |
| 8 | 6.58E+06 | 1.07E+05 |
| 9 | 3.83E+07 | 5.37E+05 |
| 10 | 4.05E+06 | 4.12E+05 |
| 11 | 4.92E+05 | 1.30E+04 |
| 12 | 3.82E+06 | 2.51E+06 |
| 13 | 4.37E+06 | 3.45E+05 |
| 14 | 2.30E+06 | 1.12E+05 |
| 15 | 9.51E+06 | 1.63E+06 |
| 16 | 1.20E+07 | 4.75E+06 |
| 17 | 2.00E+08 | 2.30E+06 |
| 18 | 2.95E+07 | 1.15E+04 |
| 19 | 2.24E+07 | 5.95E+04 |
| 20 | 1.40E+07 | 4.17E+05 |

Continuación de la Tabla No.2

| Numero de Cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Sobrenadante de FD-1041 | Sin sobrenadante (Control) |
| 21 | 1.29E+06 | 3.47E+05 |
| 22 | 1.12E+07 | 6.90E+06 |
| 23 | 4.95E+06 | 2.39E+06 |
| 24 | 5.39E+06 | 1.10E+07 |
| 25 | 2.47E+05 | 1.16E+05 |
| 26 | 2.52E+07 | 6.21E+06 |
| 27 | 4.15E+06 | 1.00E+05 |
| 28 | 5.40E+07 | 1.83E+07 |
| 29 | 7.50E+06 | 7.05E+05 |
| 30 | 1.64E+07 | 1.48E+07 |
| 31 | 7.43E+06 | 2.67E+07 |
| 32 | 8.30E+06 | 1.73E+06 |
| 33 | 7.20E+05 | 1.90E+06 |
| 34 | 2.40E+06 | 3.50E+05 |
| 35 | 4.24E+06 | 1.16E+06 |
| 36 | 9.20E+05 | 1.61E+07 |
| 37 | 8.42E+06 | 6.50E+05 |
| 38 | 2.60E+05 | 4.55E+05 |
| 39 | 4.50E+06 | 1.55E+05 |
| 40 | 9.90E+06 | 4.65E+05 |
| 41 | 4.35E+07 | 1.36E+06 |
| 42 | 9.55E+07 | 5.66E+05 |
| 43 | 8.23E+07 | 4.32E+04 |
| 44 | 3.13E+06 | 4.36E+03 |
| 45 | 6.23E+07 | 1.75E+05 |
| 46 | 6.41E+07 | 2.87E+06 |
| 47 | 9.76E+06 | 4.59E+04 |
| 48 | 3.63E+07 | 5.98E+05 |
| 49 | 5.43E+07 | 2.13E+06 |
| 50 | 7.53E+06 | 3.90E+04 |
| 51 | 9.53E+05 | 2.93E+03 |
| 52 | 7.12E+07 | 7.23E+04 |
| 53 | 4.43E+07 | 1.43E+06 |
| 54 | 3.33E+07 | 2.61E+05 |
| 55 | 9.83E+06 | 3.45E+05 |
| 56 | 4.13E+07 | 5.61E+05 |
| 57 | 9.23E+06 | 7.77E+05 |
| 58 | 6.74E+07 | 2.91E+06 |
| 59 | 7.02E+07 | 1.39E+04 |
| 60 | 5.68E+07 | 1.33E+04 |
| Promedio | 2.77E+07 | 2.64E+06 |

Cantidad de esporas termoresistentes obtenidas de cepas nativas de *C. perfringens* despues de agregar sobrenadantes de cultivo de FD-1041



En este caso, la cantidad promedio de esporas termoresistentes obtenidas fue de 4.94×10^6 esporas/ml. Mientras que la cantidad de esporas control permaneció en 2.60×10^6 esporas/ml (Tabla No. 3). De esta manera, la cantidad de esporas aumentó cerca de 1.9 veces con respecto al control (Gráfica No 2).

Gráfica No. 1 Efecto de los sobrenadantes de *C. perfringens* FD-1041 sobre la esporulación de cepas nativas

- **Influencia de los sobrenadantes de *S. Typhimurium* en la esporulación de cepas nativas de *C.perfringens*:**

Diversos reportes indican que la participación de ciertos metabolitos producidos y secretados por otros géneros bacterianos, pueden inducir la formación de esporas del género *Bacillus*. En este trabajo se logró una inducción de esporas por sobrenadantes de *S. Typhimurium*. Sin embargo, al observar los cultivos en el microscopio de contraste de fase se encontró la presencia de inicios de las primeras etapas de la esporulación (I y II), en contraste con las cepas a las que se les adicionó el sobrenadante de *C. perfringens* FD-1041 en donde se observaron fases más avanzadas de este proceso (III al V).

En este caso, la cantidad promedio de esporas termoresistentes obtenidas fue de 4.94×10^5 esporas/ml. Mientras que la cantidad de esporas control permaneció en 2.60×10^6 esporas/ml (Tabla No. 3). De esta manera, la cantidad de esporas aumentó cerca de 1.9 veces con respecto al control (Gráfica No 2).

TablaNo. 3 Cantidad de esporas termoresistentes de cepas nativas despues de agregar sobrenadantes de *Salmonella Typhimurium*

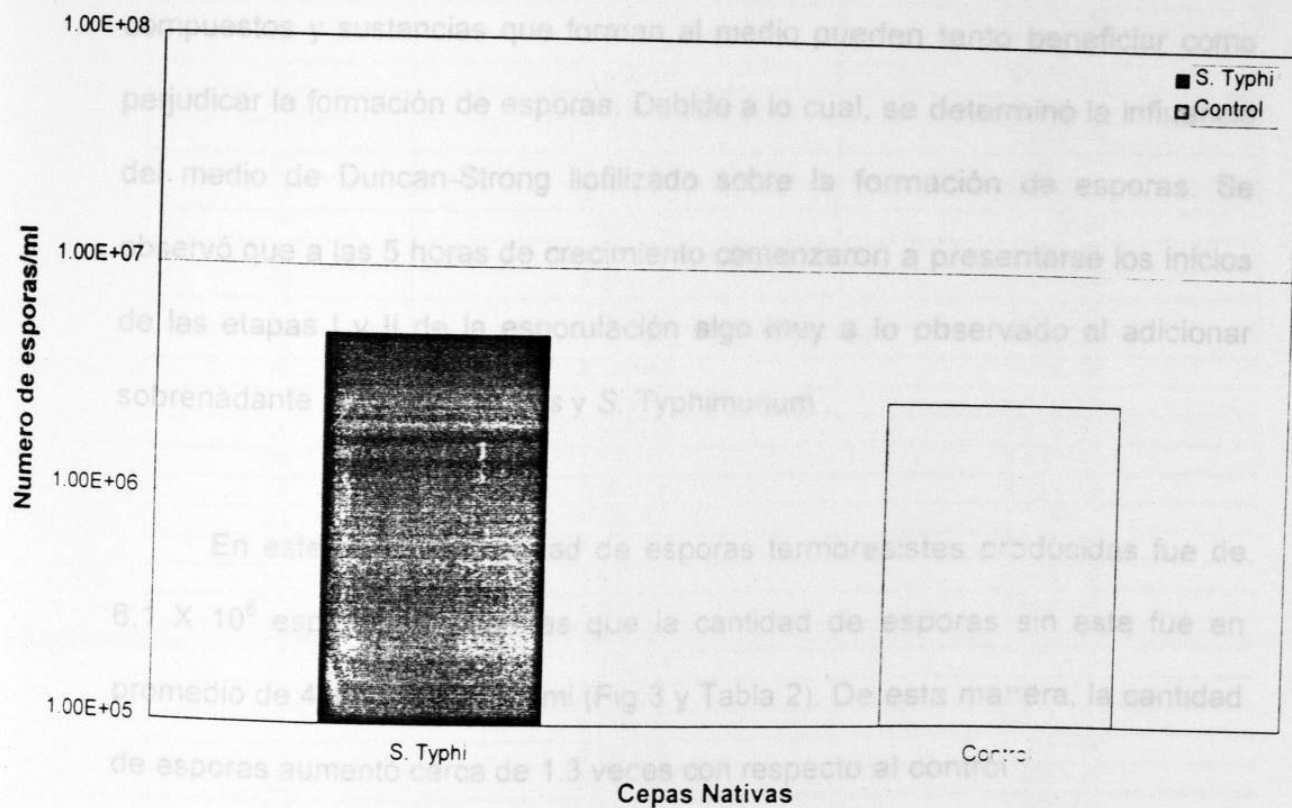
| Numero de cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | Sobrenadante de <i>S. Typhimurium</i> | Sin sobrenadante (Control) |
| 1 | 4.70E+05 | 2.70E+05 |
| 2 | 5.50E+05 | 4.50E+05 |
| 3 | 9.60E+05 | 1.30E+06 |
| 4 | 3.84E+06 | 2.64E+06 |
| 5 | 1.58E+06 | 1.80E+06 |
| 6 | 1.57E+06 | 2.12E+06 |
| 7 | 1.37E+06 | 6.11E+06 |
| 8 | 7.14E+06 | 1.27E+05 |
| 9 | 1.41E+06 | 5.87E+06 |
| 10 | 4.00E+06 | 4.12E+05 |
| 11 | 2.72E+05 | 1.90E+04 |
| 12 | 2.64E+06 | 2.61E+06 |
| 13 | 4.70E+05 | 3.45E+05 |
| 14 | 3.30E+05 | 1.12E+05 |
| 15 | 1.60E+05 | 1.63E+06 |
| 16 | 2.79E+06 | 4.75E+06 |
| 17 | 3.38E+07 | 2.90E+06 |
| 18 | 1.99E+06 | 1.16E+04 |
| 19 | 6.25E+05 | 6.95E+04 |
| 20 | 5.56E+05 | 4.17E+05 |
| 21 | 2.68E+06 | 3.4E+05 |
| 22 | 9.04E+06 | 6.90E+06 |
| 23 | 2.15E+07 | 2.39E+06 |
| 24 | 1.38E+07 | 1.10E+07 |
| 25 | 2.11E+05 | 1.16E+05 |
| 26 | 1.00E+07 | 6.21E+06 |
| 27 | 6.90E+05 | 1.00E+05 |
| 28 | 3.95E+07 | 1.83E+07 |
| 29 | 1.28E+07 | 1.05E+05 |
| 30 | 1.53E+07 | 1.48E+07 |
| 31 | 3.65E+07 | 2.67E+07 |
| 32 | 1.64E+06 | 1.90E+06 |
| 33 | 6.30E+06 | 3.50E+05 |
| 34 | 9.70E+06 | 1.16E+06 |
| 35 | 6.20E+05 | 1.61E+07 |
| 36 | 1.97E+06 | 6.50E+05 |
| 37 | 1.40E+05 | 4.55E+05 |
| 38 | 8.00E+04 | 1.55E+05 |
| 39 | 2.45E+04 | 4.65E+05 |
| 40 | 5.82E+06 | 1.36E+06 |
| 41 | 6.25E+05 | 5.66E+05 |
| 42 | 4.56E+06 | 4.32E+04 |
| 43 | 6.80E+06 | 4.36E+03 |
| 44 | 4.40E+05 | 1.78E+05 |
| 45 | 1.05E+07 | 2.87E+05 |
| 46 | 3.81E+06 | 4.89E+04 |
| 47 | 1.10E+06 | 5.98E+05 |
| 48 | 1.30E+05 | 2.10E+06 |
| 49 | 4.00E+05 | 3.90E+04 |
| 50 | 1.34E+04 | 2.99E+03 |

Tabla 3 continuación

| Numero de cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|--|------------------------------|
| | Sobrenadante de <i>S. Typhimurium</i> | Sin sobrnadante (Control) |
| 51 | 2.55E+04 | 1.44E+05 |
| 52 | 1.07E+04 | 7.28E+04 |
| 53 | 5.44E+05 | 1.43E+06 |
| 54 | 6.39E+06 | 2.61E+05 |
| 55 | 6.29E+06 | 3.45E+05 |
| 56 | 5.63E+06 | 5.61E+05 |
| 57 | 2.45E+05 | 7.77E+05 |
| 58 | 6.32E+05 | 2.81E+06 |
| 59 | 8.40E+05 | 1.39E+04 |
| 60 | 9.40E+05 | 1.39E+04 |
| Promedio | 5.10E+06 | 2.66E+06 |

b) Producción e influencia de medio de Duncan-Strong liofilizado sobre la esporulación de cepas nativas de *C. perfringens*.

Cantidad de esporas termoresistentes obtenidas de cepas nativas de *C. perfringens* después de agregar sobrenadantes de cultivo de *S. Typhimurium*



Gráfica No. 2 Efecto de sobrenadantes de cultivo de *S. Typhimurium* sobre la esporulación de cepas nativas de *C. perfringens*.

b) Producción e influencia de medio de Duncan-Strong liofilizado sobre la esporulación de cepas nativas de *C.perfringens*:

La composición del medio de esporulación es un factor determinante para la obtención de una buena esporulación, ya que los diferentes compuestos y sustancias que forman al medio pueden tanto beneficiar como perjudicar la formación de esporas. Debido a lo cual, se determinó la influencia del medio de Duncan-Strong liofilizado sobre la formación de esporas. Se observó que a las 5 horas de crecimiento comenzaron a presentarse los inicios de las etapas I y II de la esporulación algo muy a lo observado al adicionar sobrenadante de *C. perfringens* y *S. Typhimurium*.

En este caso, la cantidad de esporas termoresistentes producidas fue de 6.1×10^5 esporas/ml. Mientras que la cantidad de esporas sin este fue en promedio de 4.4×10^5 esporas/ml (Fig 3 y Tabla 2) De esta manera, la cantidad de esporas aumentó cerca de 1.3 veces con respecto al control

Tabla # 4 Esporas termoresistentes de cepas nativas después de agregar medio de Duncan-Strong .

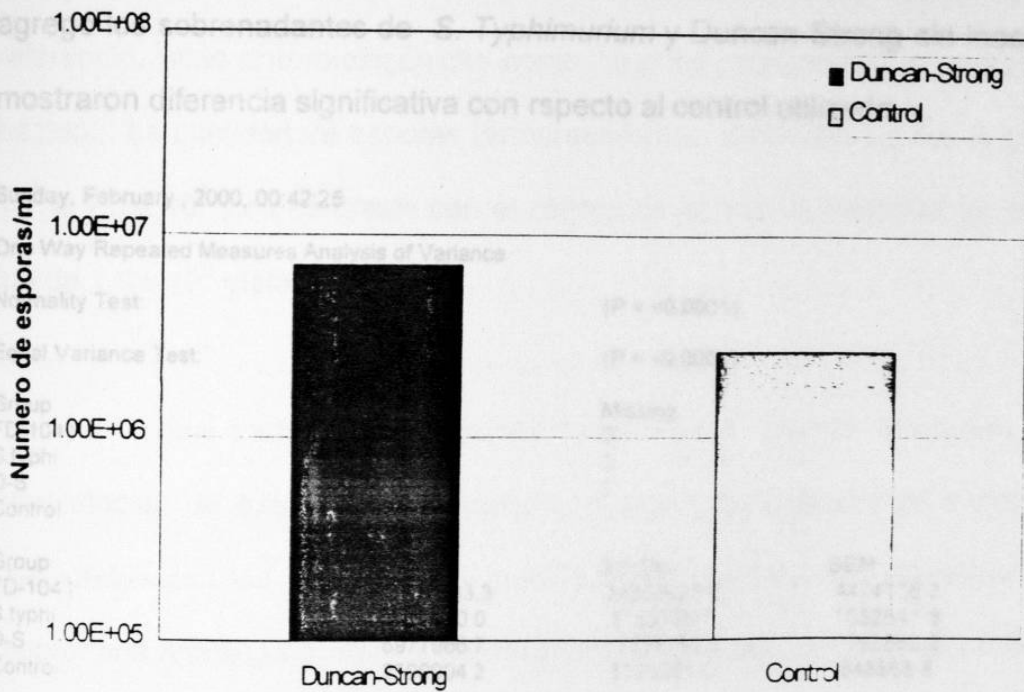
| Numero de cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|--|----------------------------|
| | Sobrenadante de medio Duncan y Strong sin inocular | Sin sobrenadante (Control) |
| 1 | 3.15E+05 | 2.70E+05 |
| 2 | 7.60E+05 | 4.50E+05 |
| 3 | 1.41E+06 | 1.30E+06 |
| 4 | 1.26E+06 | 2.64E+06 |
| 5 | 1.37E+06 | 1.80E+06 |
| 6 | 1.37E+06 | 2.12E+06 |
| 7 | 2.74E+06 | 6.11E+06 |
| 8 | 1.61E+05 | 1.27E+05 |
| 9 | 5.56E+06 | 5.87E+06 |
| 10 | 3.95E+06 | 4.12E+05 |
| 11 | 7.70E+04 | 1.90E+04 |
| 12 | 5.97E+06 | 2.61E+06 |
| 13 | 5.30E+05 | 3.45E+05 |
| 14 | 1.23E+05 | 1.12E+05 |
| 15 | 1.12E+05 | 1.63E+06 |
| 16 | 6.82E+06 | 4.75E+06 |
| 17 | 2.98E+07 | 2.90E+06 |
| 18 | 1.15E+04 | 1.16E+04 |
| 19 | 8.15E+06 | 6.95E+04 |
| 20 | 1.16E+06 | 4.17E+05 |
| 21 | 3.92E+05 | 3.47E+05 |
| 22 | 1.13E+07 | 6.90E+06 |
| 23 | 3.32E+06 | 2.39E+06 |
| 24 | 1.50E+07 | 1.10E+07 |
| 25 | 1.51E+05 | 1.16E+05 |
| 26 | 3.90E+06 | 5.21E+06 |
| 27 | 8.30E+05 | 1.00E+05 |
| 28 | 7.20E+07 | 7.83E-07 |
| 29 | 1.27E+06 | 7.05E-05 |
| 30 | 2.58E+07 | 1.48E+07 |
| 31 | 3.73E+07 | 2.67E+07 |
| 32 | 5.58E+06 | 1.73E+06 |
| 33 | 6.07E+07 | 1.90E+06 |
| 34 | 5.22E+06 | 3.50E+05 |
| 35 | 1.47E+07 | 1.16E+06 |
| 36 | 7.50E+04 | 1.61E+07 |
| 37 | 4.70E+05 | 6.50E+05 |
| 38 | 4.40E+05 | 4.55E+05 |
| 39 | 2.27E+04 | 1.55E+05 |
| 40 | 4.97E+05 | 4.65E+05 |
| 41 | 8.90E+06 | 1.36E+06 |
| 42 | 4.27E+06 | 5.66E+05 |
| 43 | 3.21E+05 | 4.32E+04 |
| 44 | 6.85E+06 | 4.36E+03 |
| 45 | 4.00E+05 | 1.78E+05 |
| 46 | 7.70E+05 | 2.87E+05 |
| 47 | 6.07E+06 | 4.89E+04 |
| 48 | 9.00E+05 | 5.98E+05 |
| 49 | 7.53E+05 | 2.10E+06 |
| 50 | 9.80E+05 | 3.90E+04 |

Continuación de la Tabla No. 4

| Numero de cepa | Cantidad de esporas/ml | |
|----------------|--|------------------------------|
| | Sobrenadante de <i>S. Typhimurium</i> | Sin sobrnadante (Control) |
| 51 | 3 78E+04 | 2 99E+03 |
| 52 | 2 93E+06 | 7 28E+04 |
| 53 | 8 51E+05 | 1 43E+06 |
| 54 | 8 73E+06 | 2 61E+05 |
| 55 | 6 11E+06 | 3 45E+05 |
| 56 | 1 80E+06 | 5 61E+05 |
| 57 | 2 15E+05 | 7 77E+05 |
| 58 | 3 56E+07 | 2 81E+06 |
| 59 | 1 87 E+05 | 1 92E+04 |
| 60 | 4 36E+05 | 1 39E+04 |
| Promedio | 7.09E+06 | 2.64E+06 |

ANALISIS ESTADISTICO:

Cantidad de esporas termoresistentes obtenidas de cepas nativas de *C. perfringens* despues de agregar medio de Duncan- Strong sin inocular



Gráfica No. 3 Efecto del medio de Duncan y Strong sin inocular sobre la esporulación de cepas nativas de *C. perfringens*

Power of performed test with alpha = 0.0500 1.000

| Source of Variance | DF | SS | MS | F | P |
|--------------------|-----|----------|----------|----------|--------|
| Between Subjects | 59 | 2.19E+05 | 3.71E+03 | 1.72E+01 | 0.0001 |
| Between Treatments | 3 | 2.13E+05 | 7.1E+04 | 3.25E+02 | 0.0000 |
| Residual | 177 | 4.77E+04 | 2.69E+02 | | |
| Total | 239 | 1.17E+06 | | | |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than what can be expected by chance. There is a statistically significant difference (P = 4.28E-013). To isolate the groups or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Comparison of all Groups vs Control Group (Bonferroni's method)

| Comparison | Diff of Means | t | P < 0.05 |
|--------------------|---------------|-------|----------|
| FD-1041 vs Control | 24591479.2 | 1.525 | Yes |
| S typhi vs Control | 2335155.8 | 0.712 | No |
| D-S vs Control | 4378062.5 | 1.325 | No |

ANALISIS ESTADISTICO:

El análisis estadístico de Bonferonni demuestra que existe diferencia significativa entre el tratamiento al cual se le agregó el sobrenadante de la cepa FD-1041 con respecto al control. Mientras que a las cepas a las cuales se les agregó los sobrenadantes de *S. Typhimurium* y Duncan-Strong sin inocular no mostraron diferencia significativa con respecto al control utilizado.

Sunday, February 1, 2000, 00:42:25

One Way Repeated Measures Analysis of Variance

Normality Test: Failed (P = <0.0001)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.0001)

| Group | N | Missing |
|---------|----|---------|
| FD-1041 | 60 | 0 |
| S typhi | 60 | 0 |
| D-S | 60 | 0 |
| Control | 60 | 0 |

| Group | Mean | Std Dev | SEM |
|---------|------------|------------|-----------|
| FD-1041 | 27291383.3 | 34660925.9 | 4474706.3 |
| S typhi | 4935060.0 | 8153728.7 | 1052641.8 |
| D-S | 6977966.7 | 13335181.6 | 1793860.2 |
| Control | 2599904.2 | 5023091.0 | 648625.6 |

Power of performed test with alpha = 0.0500 1.0000

| Source of Variance | DF | SS | MS |
|--------------------|-----|-----------|-----------|
| Between Subjects | 59 | 3.06E+016 | 5.18E+014 |
| Between Treatments | 3 | 2.33E+016 | 7.75E+015 |
| Residual | 177 | 5.71E+016 | 3.23E+014 |
| Total | 239 | 1.11E+017 | |

| Source of Variance | F | P |
|--------------------|------|-----------|
| Between Subjects | | |
| Between Treatments | 24.0 | 4.28E-013 |
| Residual | | |
| Total | | |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance. There is a statistically significant difference (P = 4.28E-013). To associate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Comparison of all Groups vs Control Group (Bonferroni's method)

| Comparison | Diff of Means | t | P<0.05 |
|--------------------|---------------|-------|--------|
| FD-1041 vs Control | 24691479.2 | 7.529 | Yes |
| S typhi vs Control | 2335155.8 | 0.712 | No |
| D-S vs Control | 4378062.5 | 1.335 | No |

DISCUSION

Con respecto a los resultados obtenidos, Shih *et al* (1996) demostraron que al agregar sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* NCTC 8236 crecida en medio químicamente definido aumentó la cantidad de esporas en cepas de referencia, tanto enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas de esta misma bacteria. La cantidad de esporas termoresistentes obtenidas aumentó de 1.0×10^6 a 1.0×10^7 , en contraste con el control en donde, la cantidad de esporas fue de 1.0×10^3 ufc/ml.

Por otra parte, otros reportes relacionados con la inducción en la esporulación de este microorganismo han señalado que ciertas sustancias relacionadas con las metilxantinas, tales como la cafeína, la isobutil-xantina y teobromina añadidas a medios químicamente definidos, así como el medio de Duncan-Strong suplementados con rafinosa o dextrina como fuentes de carbono, han estimulado la producción de esporas termoresistentes en cantidades cuyos rangos fueron de 1.0×10^6 hasta 1.0×10^8 esporas por ml en relación a los controles utilizados, los cuales se mantuvieron entre 1.0×10^4 a 1.0×10^6 . Además observaron que esta estimulación fue dependiente de la concentración del inductor agregado. Estos compuestos se creen que están relacionados con el metabolismo de purinas y con la reducción de los niveles de GMP sintetasa, la cual dispara la esporulación.

Un reporte más indica la participación de un análogo de purina como la papaverina en la estimulación de la esporulación de *C. perfringens*, donde se demostró que la cantidad de esporas se incrementó más del 50% con respecto al control (Sacks *et al* 1975, 1977; Labbe *et al* 1981).

A cerca de la posible participación de *S. Typhimurium* en la estimulación de la esporulación, existe muy poca información, un reporte indica la producción de un factor de comunicación intracelular entre *S. Typhimurium* y *E. coli* en un mismo medio de cultivo, el cual reguló tanto la densidad celular de bacterias como el potencial metabólico del medio ambiente (Surette *et al* 1998).

La composición química de los medios de cultivo también desempeñan un factor clave en el proceso de esporulación. Kennedy *et al* (1971) demostraron que el ácido glutámico suplementado a medios de cultivo para esporulación influyó en la formación del septo y en la formación de la corteza de la spora, así como en la cantidad de esporas termorresistentes la cual fue de un 30%. En el caso de la estimulación con medio de Duncan Strong, en nuestro trabajo obtuvimos menos del 30 % de esporas termorresistentes. Cabe aclarar que el medio de Duncan y Strong no es un medio rico en nutrientes y cofactores como el medio Definido para la esporulación de *C. perfringens* el cual posee estos ingredientes (Shih *et al* 1996).

A lo anterior, se pudiera establecer la posibilidad de: 1) un efecto sinérgico entre los sobranadantes tanto de *C. perfringens* como de *S. Typhimurium* y 2) la posibilidad de establecer los posibles componentes activos que estos pudieran generarse durante el catabolismo de *S. Typhimurium* en el medio de Duncan y Strong.

CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró que los sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* estimularon la esporulación de cepas nativas con respecto a los demás tratamientos.
- 2.-La cantidad de esporas aumentó significativamente 9.58 veces al adicionar los sobrenadantes de *C. perfringens* con respecto al control utilizado.
- 3.-El sobrenadante obtenido de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium estimuló la esporulación de cepas nativas al menos 1.9 veces con respecto al control.
- 4.- El medio de Duncan y Strong liofilizado agregado a las cepas nativas incrementaron la esporulación al menos 1.3 veces

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams, D. M. 1973. Inactivation of *Clostridium perfringens* type "A" spores at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.* **26**: 282 - 287.
- 2.- Adams, D. M. 1974. Requirement for a sensitive to lysozyme by *Clostridium perfringens* spores heated ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.* **27**: 797 - 801.
- 3.- Ahmed M. and H.W. Walker. 1971. Germination of spores of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* **34**:378-384.
- 4.- Ando Y. and T. Tsusuki. 1986. Changes in decoated spores of *Clostridium perfringens* caused by treatment with some enzymatic and non-enzymatic systems. *Lett. Appl. Microbiol.* **3**:61-64.
- 5.- Barach, J. T., D.M. Adams, and M. L. Speck. 1974. Recovery of heated *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. *Appl. Microbiol.* **28**: 793 - 797.
- 6.- Beaman, T. C. and P. Gerherdt. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1242 - 1246.

- 7.- Billon C.M.P., C.J. Mc.Kirgan, P.J. McClure and A. Adair. 1997. The effect of temperature on the germination of single spores of *Clostridium botulinum* 62A. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 48-56.
- 8.- Bouquet P., P. Munro, C.Fiorentini and I. Just. 1998. Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanism of action. *Curr. Op. Microbiol.* **1**:66-74
- 9.- Burbulis D., K.A.Trach and J.Hoch. 1991. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* **64**:545-552.
- 10.- Cassier, M. and M. Sebald. 1969. Germination Lysozime-dependante des spores de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 Après traitement thermique. *Ann. Inst. Pasteur Paris* **117**: 312 - 324.
- 11.- Craven S.E. and L.C. Blankenship. 1982. Effect of purine derivatives, papaverine hydrochloride and imidazole on enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **28**:851-859.
- 12.- Craven S.E. 1988. Increased sporulation of *Clostridium perfringens* in a medium prepared with the pre-reduced anaerobically sterilized technique or with carbon dioxide or carbonate. *J. Food Prot.* **59**: 700-706

13.- Czeczulin J. R., P.C. Hanna and B.A. Mc. Clane. 1993. Cloning, nucleotide sequencing and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **61**: 3429-3439

14.- Czeczulin J.R., R.E. Collie R.E. and Mc. Clane. 1996. Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin *cpe*-Negative type A, B and C isolates of *C. perfringens*. *Infect Immun.* **64**: 3301-3309

15.- Duncan C. L. and D.H. Strong. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **47**: 1172-1174.

16.- Duncan, C. L., R. G. Labbé and R. R. Reich. 1972. Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.* **109**. 353 - 359

17.- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis* *Microbiol. Rev.* **55**: 395-424

18.- Dunny G.M. and B.A.B. Leonard. 1997. Cell-Cell Communication in gram positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 527-564.

19.- Garcia Alvarado J.S., M.A. Rodriguez and R.G.Labee 1992. Influence of elevated temperature on starch hydrolysis by enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 326-330.

20.- Grossman A.D. and R. Losick. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 4369-4373.

21.- Goldner S.B., M. Solberg, S. Jones and L.S. Post. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. **52**. 407-412.

22.- Guangyong J., R.C. Beavis and P.P.Novick. 1994. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci USA. **92**: 12055-12059.

23.- Hawiro R.Z., C.A. Naccarato, R.P. Lee and P.Y. Maeba. 1979. Outgrowth and sporulation studies on *Clostridium botulinum* type E: influence of isoleucine. Can. J. Microbiol **25**: 522-527.

- 30.- Kihm D.J., M.T. Hutton, J.H. Hanlin and E.A. Johnson. 1990. Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 681-685.
- 31.- Labbé R.G. 1989. *Clostridium perfringens*. In Doyle M.P. (Ed) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker Inc. New York. p.p. 198-205
- 32.- Labbe R.G. 1991. *Clostridium perfringens*. *J. Assoc.Off. Anal.Chem.* **74**: 711-714.
- 33.- Labbe R.G and C.L. Duncan. 1977. Spore coat protein and enterotoxin synthesis in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **131**. 713-715.
- 34.- Labbe R.G. and L.L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. *Infect Immun.* **34**: 50-54.
- 35.- Labbe R.G. and D.K. Rey. 1979. Raffinose increase sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ Microbiol.***37**: 1196-1200.
- 36.- Labbe R.G. and R. Rufner. 1980. Ultrastructure of sporulating cells of *Clostridium perfringens* type A in presence of raffinose. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1153-1157.

37.- Löffler A. and R.G. Labbe. 1983. Intracellular proteases during sporulation and enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A. *Curr. Microbiol.* **8**: 187-190

38.- Mangunson R., J. Solomon and A.D. Grossman. 1994. Biochemical and Genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* **77**: 207-216.

39.- Mc. Clane B.A. 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* **34**: 1335-1343.

40.- Mitani T., J.E. Heinze and E. Freese. 1977. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**: 1118-1125

41.- Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en los años 1995-96. 1997. X Reunion interamericana de salud animal. O.M.S.- O.P.S. Washington D.C. U.S.A.

42.- Boletín de vigilancia y prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos. 1997. O.M.S.-O.P.S., Washington D.C. U.S.A.

43.- Perego M. and J. Hoch. 1996. Cell-Cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad. Sci. USA. **93**: 1549-1553

44.- Piggot, P.J. and J.G. Coote. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. Bacteriol. Rev. **40**: 908-962.

45.- Rodríguez- Romo L.A., N.L. Heredia, R.G. Labbe and J.S.Garcia-Alvarado. 1998. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in México by dot blot using a DNA probe. J. Food Prot. **61**: 201-204.

46 - Rood, J.I. and S.T. Cole. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev. **55**: 622-623.

47 - Roper G . J.A. Short and P.D. Walker. 1976 The ultrastructure of *Clostridium perfringens* spores. In Baker A.M, Wold J. Ellar D.J., Dring G.H. and Gould G.W. (Ed). Spore research. Academic Press Inc. (London) Ltd. London U.K.

48.- Rudner D.Z., J.R. LeDeaux, K. Ireton and A.D. Grossman. 1991. The *spo0K* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. J. of Bacteriol. **173**: 1388-1398.

56.- Setlow P. and L.E.Sacks. 1983. Cyclic AMP is not detectable in *Clostridium perfringens*. Can J. Microbiol **29**: 1228-1230.

57.- Shih N.J. 1995. Isolation, characterization and regulation of amylases from *Clostridium perfringens* type A. PhD Dissertation, University of Massachusetts, Amherst.

58.- Shih N.J. and R.G. Labbe. 1994. Effect of glucose on sporulation and extracellular amylase production by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. Curr. Microbiol. **29**: 163-149.

59 - Shih N.J. and R.G. Labbe. 1994. Sporulation-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. Appl. Environ Microbiol **62**: 1441-1443.

60.- Solomon J.M., B.A. Lazazzera and A.D. Grossmann. 1995 Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathway in *Bacillus subtilis*. Genes & Development. **10**: 2014-2024.

61.- Solomon J.M., R. Mangunson, A. Srivastasa and A.D. Grossmann. 1995. Convergent sensing pathways mediate to two extracellular factors in *Bacillus subtilis*. Genes Develop. **9**: 547-558.

62.- Tang S.S and R.G. Labbe. 1987. Mode of action of *Clostridium perfringens* initiation protein (spore-lytic enzyme). *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* **138**: 597-608.

63.- Vashanta N. and E. Freese. 1979. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 329-336.

64.- Vashanta N. and E. Freese. 1980. Enzyme changes during *Bacillus subtilis* sporulation by deprivation of guanine nucleotides. *J. Bacteriol.* **144**: 119-1125.

65.- Vesconi E.G., F.C. Soncini and E.A. Groisman. 1996. Mg⁺² as an extracellular signal: Environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* **84**: 165-174.

66.- Waldburguer C., D. González and G.H. Chambliss. 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 6321-6327.

67.- Willardsen R.R., F.F. Busta, C.E. Allen and L.B. Smith. 1978. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. *J. Food Prot.* **43**: 470-475.

68.-Wilson K.H. 1983. Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J. Clin Microbiol.* **18**: 1017-1019.



