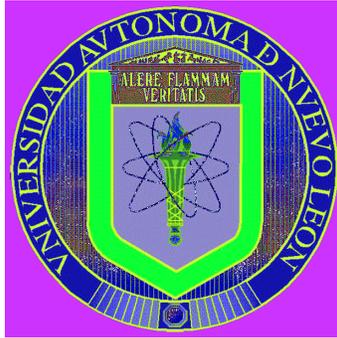


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TÍTULO**

**TERMOTOLERANCIA MEDIADA POR EXOMETABOLITOS ENTRE**

*Bacillus cereus Y Geobacillus stearothermophilus.*

**Presenta:**

**Q.B.P. JOEL HORACIO ELIZONDO LUÉVANO**

**Como requisito para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**COMITÉ DE TESIS**

---

**Dr. José Santos García Alvarado**

**DIRECTOR**

---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
**SECRETARIO**

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
**VOCAL**

---

**Dr. Carlos Eduardo Hernandez Luna**

**VOCAL**

---

**Dr. Eduardo Sánchez García**

**VOCAL**

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Principalmente a mi familia que es el principal apoyo, les estoy muy agradecido.

AL Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma Laura Heredia Rojas por la confianza brindada para la realización de esta investigación.

En especial a la doctora Luisa Yolanda Solís Soto y la M.C. Mayra Gómez Govea por su apoyo, asesoramiento y en la realización de esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Sandra, Jorge, Diego, Laura, Rafael, Cindy, David, Andrea, Cristina, Alám, Janet y Fabiola quienes me brindaron su apoyo durante la realización de la tesis.

A Brenda, Gustavo, Alma, Alejandro, Daniel, Crystel, Diana, a todos aquellos profesores y amigos que contribuyeron directa o indirectamente a que este trabajo se realizara y quienes sin intención omito.

## **ESTA INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN**

---

El Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos, de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L., México, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado, la codirección de la Dra. Norma Laura Heredia y la asesoría de la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 156073.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	<b>CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus cereus</i> 4810 A 37°C</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 A 55°C</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>CURVA DE MUERTE CELULAR DE LAS COMBINACIONES DE SOBRENADANTES (50°C/60min)</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>CURVA DE MUERTE CELULAR DE <i>B. cereus</i> 4810 AL SER SOMETIDO CON SOBRENADANTES CALENTADO (65°C/15 min) DE CÉLULAS ESTRESADAS POR CALOR</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>CURVA DE MUERTE CELULAR DE <i>B. cereus</i> DESPUÉS DE AGREGAR SOBRENADANTES DE <i>B.cereus</i> Y <i>G. stearothermophilus</i> TRATADOS CON TRIPSINA (0.5 mg/mL) A 37°C/4h</b>	<b>32</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLAS		PÁGINA
1	COMBINACIONES DE SOBRENADANTES REALIZADAS ENTRE <i>Bacillus cereus</i> 4810 Y <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	20
2	CONDICIONES DE ENSAYOS ANALIZADOS EN CÉLULAS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Y DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TERMOPROTECCIÓN A DIFERENTES CONDICIONES.	25
3	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TODOS LOS TRATAMIENTOS MEDIANTE LA PUEBA DE FISHER DSM	27
4	VIABILIDAD DE <i>B. cereus</i> 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS	29
5	VIABILIDAD DE <i>B. cereus</i> 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO DE 65°C/15min	31
6	VIABILIDAD DE <i>B. cereus</i> 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES DE <i>B. cereus</i> Y <i>G. stearothermophilus</i> SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO CON TRIPSINA	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Aw</b>	<b>Actividad acuosa</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>ESC</b>	<b>Extracellular sensing component</b>
<b>EIC</b>	<b>Extracellular induction component</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</b>
<b>ETA</b>	<b>Enfermedad transmitida por alimentos</b>
<b>HSP</b>	<b>Heat Shock Proteins</b>
<b>ICC</b>	<b>Infusión cerebro corazón</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacárido</b>
<b>ppGpp</b>	<b>Tetrafosfato de guanosina</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>v/v</b>	<b>Volumen-volumen</b>
<b>VIS</b>	<b>Visible</b>

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	6
4. JUSTIFICACIÓN.	7
5. OBJETIVOS	8
A. GENERAL	
B. PARTICULARES	
6. ANTECEDENTES	9
6.1 <i>Bacillus cereus</i>	9
A. SÍNDROME DIARREICO	9
B. SÍNDROME EMÉTICO	10
6.2 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	10
6.3 ESTRÉS BACTERIANO	11
6.4 RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO	12
6.5 PROTEÍNAS DEL CHOQUE TÉRMICO	14

6.6	METABOLITOS EXTRACELULARES	16
6.7	RESPUESTA AL ESTRÉS CRUZADA	17
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	18
7.1	MATERIAL BIOLÓGICO	18
7.2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	18
7.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA INDUCIR ADQUISICIÓN DE TERMOPROTECCIÓN EN CÉLULAS DE <i>G. stearothermophilus</i>	19
7.4	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TERMOPROTECTORA DE SOBRENADANTES DE <i>B. cereus</i> y <i>G. stearothermophilus</i>	19
7.5	ANÁLISIS PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LOS EXOMETABOLITOS SECRETADOS POR CÉLULAS DE <i>G. stearothermophilus</i>	21
7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
8.	RESULTADOS	22
8.1	CINETICAS DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus cereus</i> 4810 Y <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	22
8.2	DETERMINACIÓN DE ADQUISICIÓN DE TERMOTOLERANCIA EN CÉLULAS DE <i>G. stearothermophilus</i> 7953	25

<b>8.3</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD</b>	<b>26</b>
	<b>TERMOPROTECTORA DE SOBRENADANTES DE <i>B. cereus</i> y <i>G. stearothermophilus</i></b>	
<b>8.4</b>	<b>ANÁLISIS PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LOS</b>	<b>29</b>
	<b>EXOMETABOLITOS SECRETADOS POR CÉLULAS DE <i>B. cereus</i></b>	
	<b>Y <i>G. stearothermophilus</i></b>	
	<b>A. Tratamiento térmico</b>	<b>29</b>
	<b>B. Tratamiento con tripsina</b>	<b>31</b>
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>11.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>40</b>
<b>12.</b>	<b>TRABAJOS PRESENTADOS EN FOROS INTERNACIONALES</b>	<b>46</b>
<b>13.</b>	<b>RESUMEN BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>47</b>
<b>14.</b>	<b>NOTAS</b>	<b>48</b>

## 1. RESUMEN

Las bacterias han desarrollado mecanismos de adaptación para enfrentar un entorno desfavorable y sobrevivir bajo estas condiciones, conocidas como factores de estrés. Esta respuesta se ha estudiado intensamente e incluso se ha reportado que durante un proceso de estrés se producen y liberan metabolitos al medio circundante, capaces de brindar protección contra condiciones letales en células que no tuvieron exposición previa a dicho estrés. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de exometabolitos producidos por células de *Geobacillus stearothermophilus* sometidas y no sometidas a un estrés térmico (65°C por 15 min) así como determinar la capacidad termoprotectora de dichos metabolitos hacia células de *B. cereus* que no han sido sometidas a estrés y expuestas a una temperatura de 50°C, letal para ellas. Para este estudio se trabajó con las cepas de *B. cereus* 4810 y *G. stearothermophilus* ATCC 7953 las cuales fueron sometidas a una condición de estrés, para con ello inducir la producción de exometabolitos y se determinó su capacidad termoprotectora frente a células de la misma especie y entre especies. Para esto, sobrenadantes de cultivos bacterianos en mitad de fase logarítmica sometidos a un estrés térmico fueron combinados y posteriormente fueron expuestos a una temperatura letal de 50°C determinándose posteriormente su sobrevivencia a diferentes tiempos. En este trabajo encontramos que al agregar sobrenadantes de cultivos de *G. stearothermophilus* sometidas o no a un estrés térmico, a células de *B. cereus* no estresadas, éstas fueron más resistentes al calor ( $p \leq 0.05$ ).

## ABSTRACT

Bacteria have developed coping mechanisms to face an unfavorable environment and survive under these conditions, known as stressors. This response has been studied intensively and has even been reported that during a stress metabolites are produced and released into the surrounding medium, able to protect against lethal conditions in cells that had no prior exposure to this stress. The aim of this study was to determine the presence of exometabolites produced by *Geobacillus stearothermophilus* cells subjected and not subject to thermal stress (65°C for 15 min) and to determine the ability of these metabolites to protect cells of *B. cereus* against stress caused by exposing to a lethal temperature of 50°C. For this study we worked with the strains of *B. cereus* 4810 and *G. stearothermophilus* ATCC 7953 which were subjected to a stress condition, to thereby induce the production and thermofilter exometabolites capacity was determined against cells of the same species and between species. For this, supernatants from bacterial cultures in mid -log phase under thermal stress were combined and were subsequently exposed to a lethal temperature of 50°C subsequently survival determined at various times. In this work we found that adding culture supernatants of *G. stearothermophilus* subjected or not to heat stress, cells of *B. cereus* unstressed, they were more resistant to heat ( $p \leq 0.05$ ).

## 2. INTRODUCCIÓN

*Bacillus cereus* es una bacteria importante causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Es un microorganismo Gram positivo, anaerobio facultativo formador de esporas y causante de dos tipos de intoxicaciones alimentarias: la emética y la diarreica (Periago, van Schaik *et al.* 2002).

Las células en general han demostrado tener habilidad de adaptarse a distintas condiciones de crecimiento que generarán respuestas, a fin de asegurar su supervivencia (Browne and Dowds 2001). Una de ellas es la llamada respuesta al estrés. Se le llama estrés a aquella condición amenazante que enfrentan las células y que generan cambios adaptativos transitorios los cuales les permiten hacer frente a condiciones desfavorables de crecimiento, tales como escasez en nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo, cambios bruscos de temperatura, etc (Roquette *et al.*, 1998). Hoy en día el estudio de los mecanismos que desarrollan los microorganismos bajo estas condiciones desfavorables es de suma importancia ya que se induce la producción de ciertas moléculas que protegerán a la célula frente dichas condiciones, tales como un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés, dentro de las cuales se encuentran las proteínas del choque térmico (HSPs del inglés *Heat Shock Proteins*), las cuales tienen una función importante en la adaptación y supervivencia de los microorganismos (De Maio A, 1999). Las HSP siempre están presentes bajo condiciones normales no estresantes en las células a niveles basales, sin embargo, bajo situaciones de estrés aumenta su síntesis y como consecuencia, su concentración. Un grupo ampliamente estudiado de HSP son las *chaperonas*, las cuales son proteínas que ayudan al plegamiento correcto de otras proteínas recién sintetizadas.

Existe un mecanismo de resistencia relacionado al estrés por calor: la adquisición de termoprotección, la que se define como un proceso de adaptación de las células a temperaturas letales, causada por la pre-exposición a un estrés de calor severo más no letal. También como parte de la respuesta al estrés, se ha reportado que se encuentra la respuesta extracelular, donde la bacteria es capaz de producir moléculas que son liberadas al medio, las cuales brindan protección a otras células cuando éstas son expuestas a una condición severa de estrés (Asha and Bhagyalakshmi, 2011; Schön and Schumann, 1994). Algunas de estas moléculas han sido caracterizadas en *E. coli* y son llamadas ESC (del inglés *Extracelular Sensor Components*), las cuales actúan como moléculas alarmonas que al ser liberadas, son capaces de sensar o detectar una condición de estrés externa, activándose de esta manera y convirtiéndose en componentes de inducción extracelular (*EIC* del inglés *Extracelular Induction Components*), y desencadenando una respuesta intracelular de protección, protegiendo por lo tanto a las células no estresadas contra una condición desfavorable.

Por otro lado, sabemos que las ETAs son de gran importancia para la salud pública, ya que año con año millones de personas se enferman por consumir alimentos de mala calidad. Aunque los sistemas actuales han desarrollado métodos para la prevención y el control de estos patógenos, no han sido del todo efectivos, por lo que el entendimiento de la fisiología en relación a la capacidad de adaptación en los microorganismos es un punto clave de abordar ya que nos acercaría a comprender ciertos mecanismos de supervivencia de bacterias patógenas y causantes de deterioro tales como *B. cereus* y *G. stearothermophilus*.

Tomando en cuenta que tanto *B. cereus* como *G. stearothermophilus* son microorganismos relacionados a la industria alimentaria, el primero como patógeno y el segundo como deteriorante, es de suma importancia conocer la capacidad que poseen estos microorganismos para adquirir termoprotección mediada por exometabolitos producidos como respuesta a una exposición previa a un estrés térmico ya sea entre bacterias de la misma especie o interespecies. De ahí la importancia de este estudio.

### 3. HIPÓTESIS

Las células de *Geobacillus stearothermophilus* sometidas, a un estrés térmico, secretan metabolitos capaces de conferir termoprotección a células de *Bacillus cereus* no estresadas.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento es poco lo que se conoce sobre los mecanismos de adaptación y de sobrevivencia que tienen las bacterias formadoras de esporas ante condiciones desfavorables (estrés). Sin embargo la mayoría de los estudios realizados en relación a esta capacidad adaptativa se basa en el estudio de células de la misma especie; en este estudio se propone analizar dicha respuesta entre células vegetativas de diferentes especies.

En nuestro laboratorio se ha demostrado la adquisición de termoprotección que experimentan algunos microorganismos esporulados, tales como *C. perfringens* mediada por la secreción de exometabolitos. Sin embargo, el conocimiento actual de los componentes o mecanismos de transferencia de dicha termoprotección es muy limitado particularmente en otros microorganismos esporulados. Además de considerar que la mayoría de los estudios se enfocan a observar los mecanismos de adquisición de termoprotección en una misma especie, por lo que en el presente trabajo se propuso un estudio entre dos especies de microorganismos esporulados, uno de ellos patógeno y otro deteriorante de alimentos, con el fin de establecer si se produce una protección cruzada al calor entre estas dos especies filogenéticamente relacionadas.

## 5. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Determinar si células de *Geobacillus stearothermophilus* sometidos a un estrés térmico son capaces de secretar metabolitos que brinden termoprotección a células de *Bacillus cereus* no sometidas a estrés.

### B. PARTICULARES

- Determinar condiciones de estrés aplicadas a en células de *G. stearothermophilus* para inducir una respuesta de termoprotección.
- Determinar la capacidad termoprotectora de exometabolitos de células de *B. cereus* sometidas a un estrés térmico sobre células de la misma especie sin exposición a una condición de estrés.
- Determinar si exometabolitos producidos por células de *G. stearothermophilus* sometidas a un estrés térmico son capaces de conferir termoprotección a células de *B. cereus* expuestas a una temperatura letal.
- Analizar parcialmente la naturaleza de los exometabolitos secretados por células de *G. stearothermophilus* y caracterizar parcialmente el o los exometabolitos responsables de la inducción de termoprotección.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1 *Bacillus cereus*

*B. cereus* es un bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil por la presencia de flagelos. La spora es de forma ovoide, central y no deforma al bacilo. Esta bacteria tiene la capacidad de hidrolizar la lecitina y no fermenta el manitol. Su temperatura de crecimiento va desde 5 a 55°C, siendo la óptima de 30°C a 37°C. El pH en el que se desarrolla es de 4.5 a 9.3, y la actividad acuosa ( $A_w$ ) óptima para su crecimiento es 0.95, además de tolerar una concentración de sal de 7.5% (Madigan M. & Martinko J. 2005). Se ha demostrado que *B. cereus*, adquiere tolerancia al estrés oxidativo y al estrés de etanol. Incluso se ha establecido que se puede adquirir tolerancia cruzada entre esos 2 tipos de estrés (Browne and Dowds 2001). Este microorganismo produce dos síndromes patogénicos, el diarreico y el emético (Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

#### A) SÍNDROME DIARREICO

Este tipo de intoxicación, es causado por ingerir la célula vegetativa de *B. cereus* y después de un periodo de incubación de 8 a 16 horas, provocando principalmente diarrea y dolor abdominal, con una duración aproximada de 24 h. Esta manifestación es producida por la toxina diarreogénica o termolábil, que es liberada en la fase logarítmica de crecimiento. Los principales alimentos en donde se puede encontrar este microorganismo incluyen productos cárnicos y productos derivados del pollo, sopas deshidratadas, embutidos, especias, en los productos derivados de la vainilla, cereales, harinas, y clara de huevo deshidratada (Guinebretière, *et. al.*, 2002).

## **B) SÍNDROME EMÉTICO**

Este síndrome es producido por la toxina cereulida o termoestable, sintetizada en la fase estacionaria de crecimiento. Se caracteriza generalmente por vómitos, dolor abdominal con diarrea acuosa profusa y en ocasiones náuseas. Su periodo de incubación es de 1 a 6 horas, los síntomas generalmente desaparecen a las 24 horas y se produce principalmente por el consumo de arroz contaminado (Guinebretière, *et. al.*, 2002).

### **6.2 *Geobacillus stearothermophilus***

Fue descrito por primera vez en 1920 como *Bacillus stearothermophilus*, sin embargo a raíz de la reclasificación fue reconocido oficialmente como miembro del género *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001). *G. stearothermophilus* es un bacilo Gram positivo, perteneciente a la familia *Bacillaceae*, es anaerobio facultativo, fermentador de glucosa, acetato y etanol (Gordon, Haynes *et al.* 1973). Tiene la capacidad de crecer en forma aerobia o anaeróbica facultativa y es considerado termófilo ya que su temperatura de crecimiento va de 30 a 75°C, siendo la óptima de 55 a 65°C (Nazina *et al.*, 2001). Debido a su amplio rango de temperatura de crecimiento y a que produce esporas se encuentra ampliamente distribuido en suelo, manantiales calientes y sedimentos oceánicos. Es usado comúnmente como organismo de validación en los estudios de esterilización debido a que su destrucción cuando se encuentra como espora ocurre cuando se alcanza una temperatura de 121 °C. Produce colonias circulares, con bodes bien definidos, de color crema y superficie lisa, y presenta esporas ovoides con ubicación subterminal. Da positivo a la prueba de catalasa y negativo a Voges Proskauer. No se considera como un microorganismo que cause ETAs, sin embargo sí causa deterioro prematuro en el producto. Esta capacidad se

debe, en parte, a que puede contaminar muchos ambientes por su potencial para formar esporas (Burgess, Lindsay, *et al.*, 2010).

### **6.3 ESTRÉS BACTERIANO**

Las células en general han demostrado tener habilidad de adaptarse a distintas condiciones de crecimiento que generarán respuestas a fin de asegurar su supervivencia (Browne and Dowds 2001). Una de ellas es la llamada respuesta al estrés. Se le llama estrés a aquella condición amenazante que enfrentan las células y que generan cambios adaptativos transitorios los cuales les permiten hacer frente a condiciones desfavorables de crecimiento. Dentro de estas condiciones adversas podemos encontrar el agotamiento de los nutrientes, cambios en el pH, temperatura, etc. (Roquette *et al.*, 1998). Durante su crecimiento, la bacteria se enfrenta a diversos factores para poder desarrollarse, siendo las variaciones de temperatura las condiciones más comunes a las cuales la bacteria debe ser capaz de superar (O'Connor, Fletcher, *et al.*, 2009). El estrés es una respuesta universal que se encuentra conservada en todos los organismos, siendo producidas por todas las formas de vida autónoma conocidas (Schumann, 2003).

La respuesta al estrés se describió en 1962 en estudios realizados en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, donde se detectó un dramático cambio en la actividad genética de los cultivos que fue inducido por un incremento de varios grados por arriba de la temperatura óptima de crecimiento de las células pero por debajo del nivel de temperatura letal lo cual fue considerado una condición de estrés (Leuschner and Antranikian 1995).

El conocimiento de los factores que provocan daños irreparables a los microorganismos ha servido mucho para la industria alimentaria, al utilizarse condiciones letales o una combinación de condiciones desfavorables para garantizar la eliminación de los microorganismos indeseables y con ello asegurar la inocuidad del alimento (Periago, van Schaik *et al.* 2002). Sin embargo, se ha visto que en ocasiones los microorganismos que se encuentran en el alimento se exponen a condiciones en su ambiente capaces de disparar la respuesta al estrés, provocando como consecuencia algunos fenómenos asociados, tales como la adquisición de resistencia a condiciones fuertes de estrés, provocando de esta manera la sobrevivencia de patógenos bajo condiciones normalmente “letales” (den Besten, Mataragas, *et al.*, 2006). De ahí la importancia que tiene la respuesta de estos microorganismos frente a dichas condiciones dentro de la inocuidad de los alimentos.

#### **6.4 RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO**

El mecanismo de adaptación mejor estudiado hasta ahora en las bacterias es la provocada como respuesta a un estrés térmico (O'Connor, Fletcher, *et al.*, 2009). En este caso, las bacterias responden mediante la activación de una serie de genes que codifican principalmente para la síntesis de proteínas chaperonas y proteasas (Shenhar, Rasouly, *et al.*, 2009). Se ha observado que células de *B. subtilis* y *E. coli* pueden modificar la expresión de sus genes hasta en un 10 % por dichas condiciones desfavorables (Li, Bi *et al.*, 2011; Price, Fawcett *et al.*, 2001, Hecker, Schumann *et al.* 1996).

La capacidad bacteriana para sobrevivir a diversos tipos de condiciones desfavorables depende de diferentes factores tales como el grado de tolerancia a la condición desfavorable, las

condiciones del medio ambiente con las cuales se ha enfrentado previamente, la etapa de crecimiento y el tiempo de exposición, la capacidad de adherencia a superficies, y la presencia o ausencia de respuesta a tolerancia inducida (Rowbury, R. 2001).

La termoprotección es el proceso fisiológico en cual la célula al exponerse a condiciones estresantes de temperatura, es capaz de adaptarse a la exposición de una temperatura más severa. Heredia y colaboradores en el año 1997, mostraron que al someter a células de *C. perfringens* a un estrés térmico de 50°C, se incrementaba la resistencia térmica de la bacteria, soportando ahora la temperatura (antes letal) de 55°C; al igual que en el 2003, Solís y colaboradores observaron que el sobrenadante de células estresadas por 30 min a 42°C de *B. cereus*, eran capaces de conferir termoresistencia (50°C) a células no estresadas. De la misma manera, la adquisición de termoresistencia en otras bacterias esporuladas ha sido reportada, tal es el caso de *B. subtilis*, en donde se presentó un aumento en la resistencia al calor durante el proceso de esporulación, si a las células se le sometía a un estrés de 48°C, provocando así la producción de 11 proteínas del estrés (Movahedi and Waites. 2000). Esta respuesta también se reportó en bacterias termófilas, como *Streptococcus thermophilus*, en donde se sintetizaron 22 proteínas del estrés al someter las células a un tratamiento de 52°C y además, se provocaba termoresistencia a 58°C (Auffray, Lecesne *et al.* 1995); en *Rhodothermus obamensis* se observó también la inducción de termoresistencia después de un estrés de 88°C por 1 hora; igualmente en *G. stearothermophilus* adquirió termoresistencia a 65°C si previamente es sometida a un estrés de temperatura. En este último caso se observó que se expresaban los genes *groES* y *groESL* las cuales se han relacionado con procesos de termoprotección en otros microorganismos (Wu and Welker, 1991).

Con respecto a *B. cereus*, Periago, van Schaik *et al.* (2002), aplicaron un estrés térmico de 42°C por 30 min y como resultados las células fueron más termoresistentes a 50°C que el grupo control el cual no recibió el estrés; además fue posible detectar la presencia de 31 proteínas entre las cuales se encontraban: CspB, CspE, y SodA que se han involucrado en la respuesta al estrés, además de SpoVG y AldA que son proteínas de esporulación y proteínas del estrés pertenecientes a la clase I (Periago, van Schaik *et al.* 2002).

Más aún, se ha reportado que la respuesta producida en consecuencia a un estrés puede capacitar a la célula a resistir otros tipos de estrés, conociéndose a esta respuesta como protección cruzada (Dorman, 1994). Así, estreses a que se someten las células, puede provocar que ahora estos microorganismos puedan ser más resistentes, persistentes y peligrosos que cuando no están bajo condiciones hostiles (Duffy and Sheridan, 1998).

## **6.5 PROTEÍNAS DEL CHOQUE TÉRMICO**

Todos los organismos presentan una respuesta similar cuando son sometidos a un cambio desfavorable en su entorno; si las células son expuesta a un incremento de temperatura, éstas responden similarmente incrementando rápidamente los niveles de un grupo selecto de proteínas del estrés llamadas proteínas del choque térmico HSP (*Heat Shock Proteins* por sus siglas en inglés) (Asha and Bhagyalakshmi, 2011; Schön and Schumann, 1993). Estas proteínas, como todas las proteínas del estrés, son altamente conservadas en la historia evolutiva de los seres vivos ya que provienen de una familia de multigenes similares estructuralmente, pero con distinta forma y sistemas de regulación. Estas proteínas se expresan constitutivamente representando de 5 – 10% del total de las proteínas celulares; sin embargo, cuando las células se

someten a condiciones de estrés, llegan a constituir hasta el 90% del total de las proteínas celulares (Petersohn *et al.*, 2001).

Las HSPs se dividen en 4 familias basadas según su peso molecular: la familia de bajo peso molecular que incluye proteínas de 10 a 30 kDa, en donde se ubica la proteína llamada ubiquitina, que junto con otras actúan como asistentes en la degradación de proteínas citoplásmicas; la familia de las chaperoninas que comprende proteínas de alrededor de 60kDa; la familia HSP70 que abarca a proteínas cuyos pesos moleculares van de 66 a 78kDa, y que promueven el plegamiento correcto de proteínas y su ensamblaje y la familia conocida como HSP90, que incluye proteínas de alto peso molecular y que se pueden expresar de forma preferencial en células transformadas, en donde funcionan principalmente como antígenos tumorales específicos (Asha and Bhagyalakshmi, 2011).

Existen estudios sobre la respuesta al choque térmico por bacterias, varios de los cuales surgen a partir de la identificación de algunas proteínas de estrés térmico. La respuesta típica que tienen las bacterias incluye la síntesis de ciertas proteínas tales HSP100, HSP90, DnaK (HSP70), DnaJ (HSP40), GrpE (HSP23), y HSP20; y las chaperoninas GroEL/GroES que se encargan del plegamiento adecuado de proteínas que fueron dañadas (O'Connor, Fletcher, *et al.*, 2009; Mogk, Homuth, *et al.*, 1997).

## 6.6 METABOLITOS EXTRACELULARES

Se ha establecido que algunos tipos de estrés, tal como un cambio drástico de temperatura o pH, puede causar la liberación de componentes extracelulares, que actúan como moléculas propagadoras de alerta, conocidas como alarmonas (Jishage M. *et al.*, 2002), las cuales alertan a la célula para disparar la respuesta intracelular al estrés y así proteger a células no estresadas para resistir una condición estresante que pudiera ser letal. Estos metabolitos extracelulares son también conocidos como componentes sensores extracelulares (ESC) y que al sentir la presencia de un estrés son activados convirtiéndose en componentes de inducción extracelular EIC (Rowbury, R. 2001).

Debido a las implicaciones tan importantes que esta respuesta mediada por exometabolitos pudiera tener, y así ayudar a entender algunos mecanismos de protección de las células, para así coadyuvar para tener el control microbiano y como consecuencia, las enfermedades que estos causan. En 1996 Nikolaev, estableció que al exponer células de *E. coli* a diversos factores desfavorables, liberaban metabolitos al medio con la capacidad de proteger a otras células de *E. coli* al exponerse a diferentes tipos de estrés, como el térmico, frío, oxidativo o por tetraciclina. En 1999 Heredia *et al*, encontraron que los sobrenadantes de células estresadas de *C. perfringens*, fueron capaces de inducir termoresistencia en aquellas células no estresadas. Al analizar los metabolitos presentes en el sobrenadante, se encontró que una de las proteínas responsables de conferir dicha termoresistencia era una proteína de aproximadamente 60kDa.

## 6.7 RESPUESTA AL ESTRÉS CRUZADA

Las bacterias viven en un entorno rodeado de un complejo de comunidades y no hay reportes en donde se enfoquen en estudiar la respuesta de termoresistencia entre especies (Thompson 1999). Sin embargo la capacidad de muchas bacterias para adaptarse a condiciones de estrés puede protegerlos contra el mismo tipo de estrés (respuesta adaptativa específica) o de diferentes tipos de estrés (respuesta adaptativa múltiple, también denominado protección cruzada).

Isohanni, *et al.*, (2013) estudiaron la capacidad de que un estrés térmico induzca protección frente a condiciones de estrés ácido, en *Arcobacter butzleri* y *Campylobacter jejuni* las cuales son filogenéticamente cercanas y encontraron que *A. butzleri* si fue capaz de adaptarse a condiciones letales de acidez, pero *C. jejuni* no. También se ha estudiado la inducción de termoresistencia en células no estresadas de *C. perfringens*, pero tratadas con sobrenadantes de cultivos de *B. cereus*, sometidos a estrés térmico (55°C), sin embargo, se encontró que los sobrenadantes no fueron capaces de inducir termoresistencia a *C. perfringens* (Benítez-Chao, 2012). Sin embargo, aunque no se demostró la inducción de resistencia se menciona que quizá otras condiciones pudieran favorecer este proceso, por lo que más estudios son necesarios para definir la posible interacción entre microorganismos, de ahí el presente trabajo.

## 7. MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para este estudio se utilizó la cepa *Bacillus cereus* 4810 que fue proporcionada por el Dr. Reginal W. Bennet de la Food and Drug Administration (FDA) y *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 aislada de una ampolleta bioindicadora (Bioindicador Sterikon® plus, Merck). Dichas cepas se conservaron como cultivos de reserva a -80°C con glicerol (20% v/v). Para la activación de estas cepas se tomó una alícuota y se inoculó en 10ml de caldo infusión cerebro-corazón (ICC, Bioxon) y se incubaron a 37°C para *B. cereus* y 55°C para *G. stearothermophilus*, 24h en ambos casos.

### 7.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Se inocularon 50µl de las cepas activadas (1% v/v) en tubos con 5 mL de caldo ICC y se incubaron en baño de agua a 37°C para *B. cereus* y 55°C para *G. stearothermophilus* y cada una o dos horas se tomaron lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro Sequoia-Turner (Mod. 304) a 600 nm. Para la determinación de la viabilidad celular, se tomó una alícuota y se realizaron diluciones decimales seriadas utilizando como diluyente solución salina fisiológica estéril (0.85%) y se sembraron por difusión en agar ICC. Una vez solidificado el agar, las placas se incubaron a 37°C y 55°C para *B. cereus* y *G. stearothermophilus* respectivamente por 24h. Pasado el tiempo de incubación se realizó la cuenta de las colonias y se determinó el tiempo en cual se alcanzaba la mitad de la fase logarítmica.

### **7.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA INDUCIR LA ADQUISICIÓN DE TERMORESISTENCIA EN CÉLULAS DE *G. stearothermophilus***

Para realizar la determinación de la inducción de la termoresistencia en *G. stearothermophilus*, a partir de 2 tubos con 10 ml de medio ICC previamente inoculados al 1% (v/v) con la cepa activada, que se incubaron por 5h a 55°C (mitad de la fase logarítmica), se tomó uno de los tubos y se sometió a un tratamiento térmico a diferentes temperaturas que siempre fueron por arriba de su temperatura óptima de crecimiento, en tanto que el otro tubo se mantuvo a 55°C. Después de esto, se prosiguió a someter ambos tubos a 75°C (normalmente letal) y fueron tomadas alícuotas a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos, a las cuales se les realizaron diluciones decimales seriadas y fueron sembradas por difusión con agar ICC, e incubadas a 55°C por 24h.

### **7.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TERMOPROTECTORA DE SOBRENADANTES DE *B. cereus* y *G. stearothermophilus***

Esto fue realizado de acuerdo a lo reportado por Solís (2003). Se realizó la activación y el crecimiento de las cepas bacterianas de acuerdo al punto anterior, hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica y posteriormente algunos tubos fueron sometidos a un estrés térmico (42°C/30min para *B. cereus* y 65°C/30min para *G. stearothermophilus*). En tanto que 2 tubos de *B. cereus* y 1 tubo de *G. stearothermophilus* permanecieron en el baño de agua a 37°C y 55°C respectivamente durante el periodo del estrés térmico (30 min). Pasado este tiempo todos los tubos (tratados o no con el estrés térmico) fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes y células sirvieron para los ensayos posteriores de inducción de termoprotección por sobrenadantes y para la caracterización del o los compuestos

presentes en estos sobrenadantes capaces de inducir termoprotección. Tanto las células como los sobrenadantes de las dos bacterias fueron combinados entre sí como se menciona a continuación.

Una vez obtenidos los cultivos centrifugados, se separaron los sobrenadantes de los paquetes celulares y se realizaron combinaciones, quedando diferentes tratamientos, tal como se especifican en la Tabla 1.

**TABLA 1. COMBINACIONES DE SOBRENADANTES REALIZADAS ENTRE *Bacillus cereus* 4810 Y *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953**

TRATAMIENTO	COMBINACIONES
1	Células sin estrés térmico + sobrenadante con estrés térmico ( <i>B. cereus</i> )
2	Células sin estrés térmico + sobrenadante sin estrés térmico ( <b>CONTROL -</b> ) ( <i>B. cereus</i> )
3	Células con estrés térmico + sobrenadante sin estrés térmico ( <i>B. cereus</i> )
4	Células con estrés térmico + sobrenadante con estrés térmico ( <b>CONTROL +</b> ) ( <i>B. cereus</i> )
5	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> sin estrés térmico.
6	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> con estrés térmico.

Todos los tratamientos se colocaron en baño María a 50°C. Se tomaron alícuotas a los 0, 15, 30, 45 y 60 min para determinar la supervivencia bacteriana, realizándose diluciones decimales seriadas y cuenta en placa en agar ICC por el método de difusión e incubándose a 37°C/24 h. Los resultados obtenidos, fueron graficados, para obtener las curvas de muerte térmica.

## **7.5 ANÁLISIS PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LOS EXOMETABOLITOS SECRETADOS POR CÉLULAS DE *G. stearothermophilus***

### **A. Tratamiento térmico**

Para determinar si los metabolitos con capacidad termoprotectora eran termoestables o termolábiles, y así poder sospechar si algunas proteínas estuvieran involucradas en este proceso protector, se obtuvieron sobrenadantes de cultivos los cuales fueron o no sometidos a un estrés térmico. Estos sobrenadantes fueron calentados a 65°C/15min, y una vez que estos se enfriaron a temperatura ambiente, se realizaron los tratamientos especificados anteriormente y se procedió a los ensayos de mortalidad celular tal como está especificado en el punto anterior.

### **B. Tratamiento con tripsina**

Se siguió la misma metodología que en el ensayo anterior, solo que después de centrifugar a los sobrenadantes se les agregaron 100 µl de tripsina (concentración final: 0.5mg/mL) y se incubaron a 37°C por 4 horas. Al concluir el tiempo de incubación, se siguió con la combinación de células y sobrenadantes, obteniéndose los tratamientos previamente especificados y se realizaron las curvas de muerte celular.

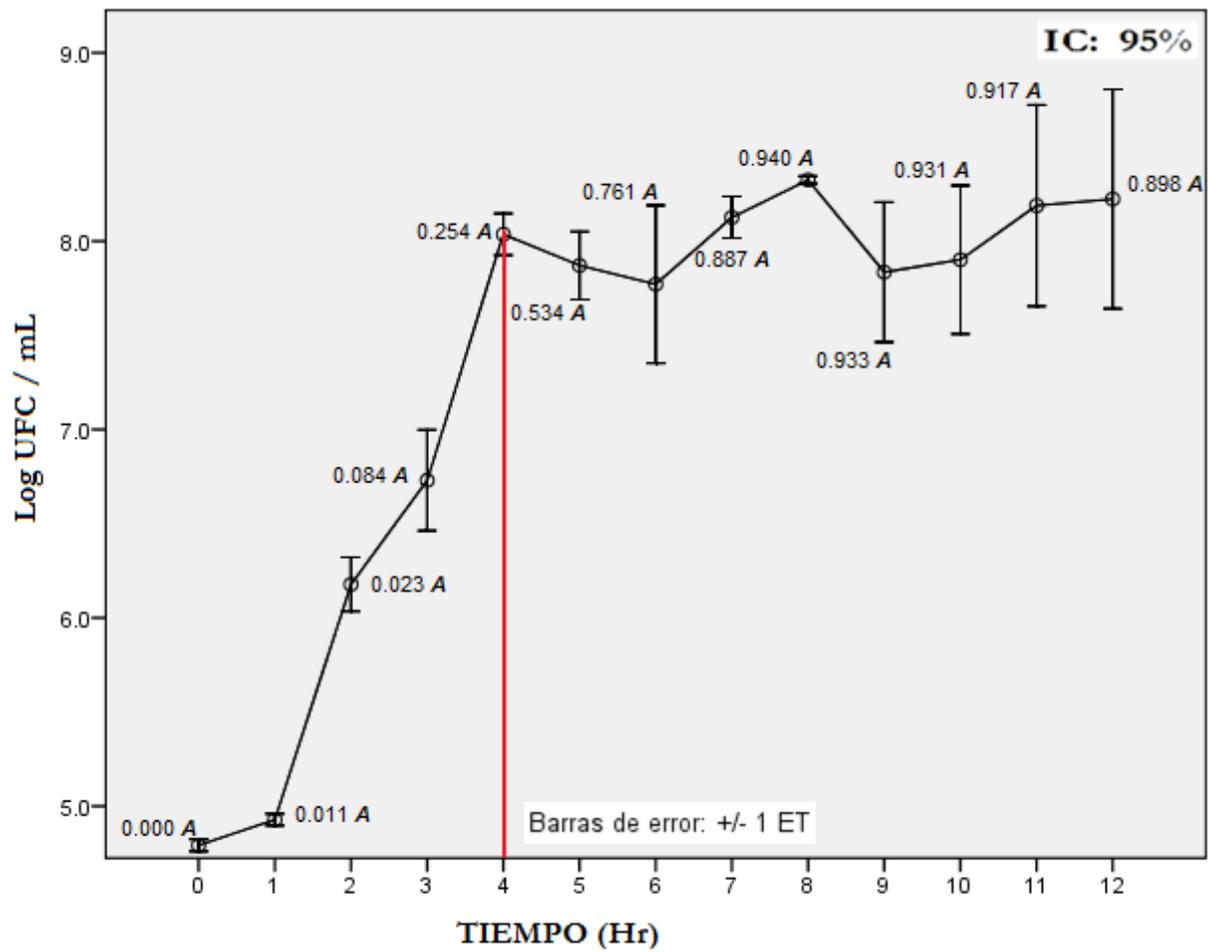
## **7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza múltiple utilizando el programa NCSS (Number Cruncher Statistical System) versión 6.0 y se determinó la diferencia de medias empleando para ello la comparación por la prueba de Fisher.

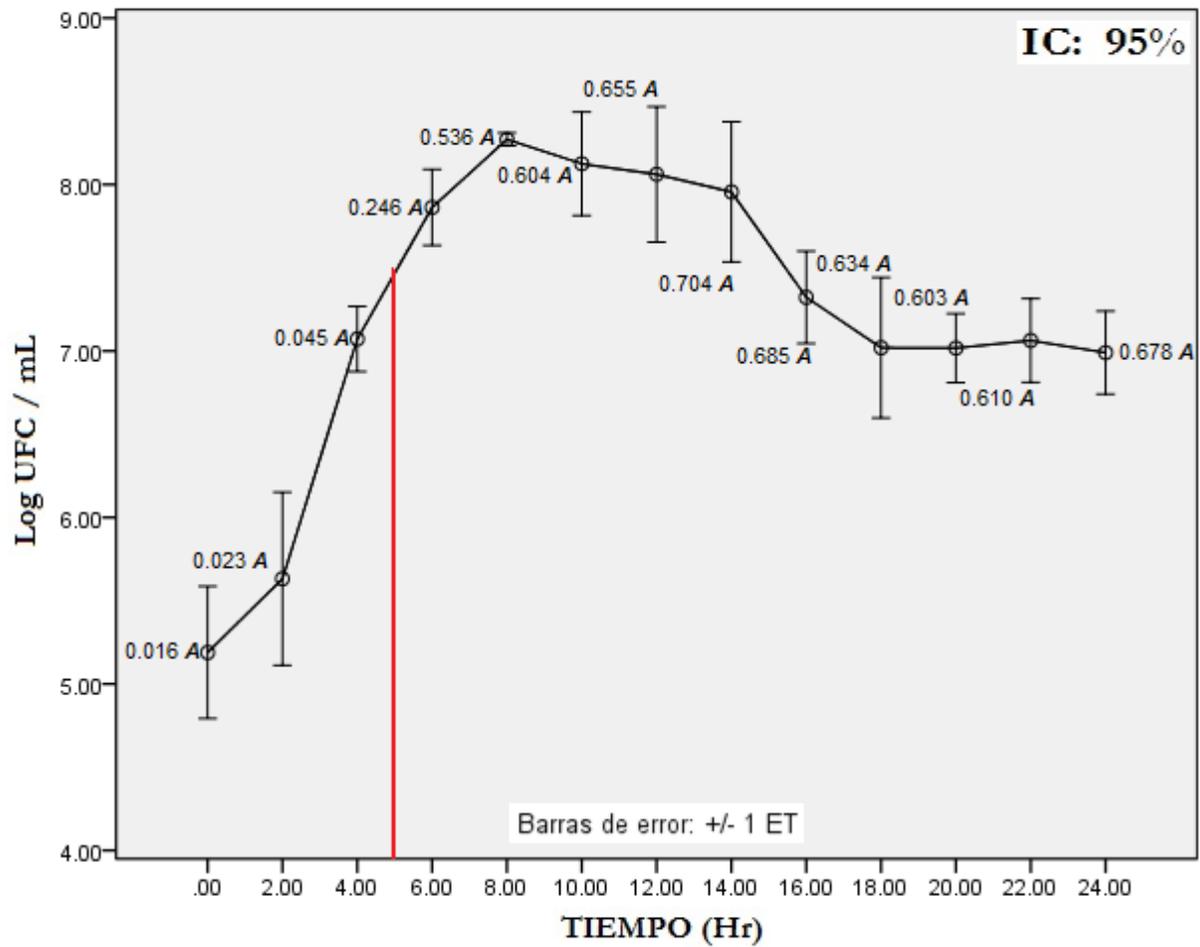
## 8. RESULTADOS

### 8.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *Bacillus cereus* Y *Geobacillus stearothermophilus*

Se realizaron cinéticas de crecimiento para *B. cereus* 4810 y *G. stearothermophilus* ATCC 7953, a fin de determinar el tiempo en el cual cada uno de estos microorganismos alcanzaba la mitad de fase logarítmica, ya que en esa etapa, la célula, se encuentra metabólicamente más activa y como consecuencia puede que se produzcan más metabolitos con actividad termoprotectora. La cinética de crecimiento fue realizada espectrofotométricamente, a una densidad óptica de 600nm ( $DO_{600}$ ) y mediante recuento celular. Se determinó que *B. cereus* incubada a 37°C, alcanzó la mitad de la fase logarítmica a las 4 horas (Fig. 1), en tanto que *G. stearothermophilus* incubada a 55°C alcanzó la mitad de la fase logarítmica a la hora 5 (Fig. 2).



**FIGURA 1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus cereus* 4810 A 37°C.** La línea roja indica el punto en que el cultivo alcanza la mitad de la fase logarítmica. A: absorbancia



**FIGURA 2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *G. stearothermophilus* ATCC 7953 A 55°C.** La línea roja indica el punto en que el cultivo alcanza la mitad de la fase logarítmica. A: absorbancia

## 8.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA INDUCIR ADQUISICIÓN DE TERMOPROTECCIÓN EN CÉLULAS DE *G. stearothermophilus*

Con el fin de encontrar las condiciones de un estrés térmico severo a las que se debieran someter las células de *G. stearothermophilus* para realizar los ensayos de adquisición de termoprotección se probaron distintos tratamientos térmicos señalados en la tabla 2. Se observó que al aplicar un estrés de 65°C por 30 min, las células de *G. stearothermophilus* eran capaces de desarrollar cierta a 75°C en comparación de aquellas que no recibieron el estrés térmico, sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos.

**TABLA 2. CONDICIONES DE ENSAYOS ANALIZADOS EN CÉLULAS DE *Geobacillus stearothermophilus* Y DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE A DIFERENTES CONDICIONES.**

<b>CHOQUE SUBLETAL</b>	<b>TEMPERATURA LETAL</b>	<b>ADQUISICIÓN DE TERMOPROTECCIÓN</b>
65°C/30min	<b>75°C</b>	<b>POSITIVA</b>
65°C/30min		<b>NEGATIVA</b>
65°C/15min		<b>POSITIVA</b>
65°C/15min		<b>NEGATIVA</b>
65°C/15min		<b>NEGATIVA</b>
68°C/10min		<b>NEGATIVA</b>
65°C/15min	<b>72°C</b>	<b>NEGATIVA</b>
70°C/30min		<b>NEGATIVA</b>
65°C/30min	<b>70°C</b>	<b>POSITIVA</b>
65°C/30min		<b>NEGATIVA</b>

### 8.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TERMOPROTECTORA DE SOBRENADANTES DE *B. cereus* y *G. stearothermophilus*

Habiendo determinado las condiciones necesarias del estrés térmico en *G. stearothermophilus* y tomando en cuenta que en nuestro laboratorio previamente se había determinado que aplicar a los cultivos de *B. cereus* un estrés de 42°C por 30 min se inducía termoprotección a 50°C, se consideró aplicar estas mismas condiciones en este trabajo.

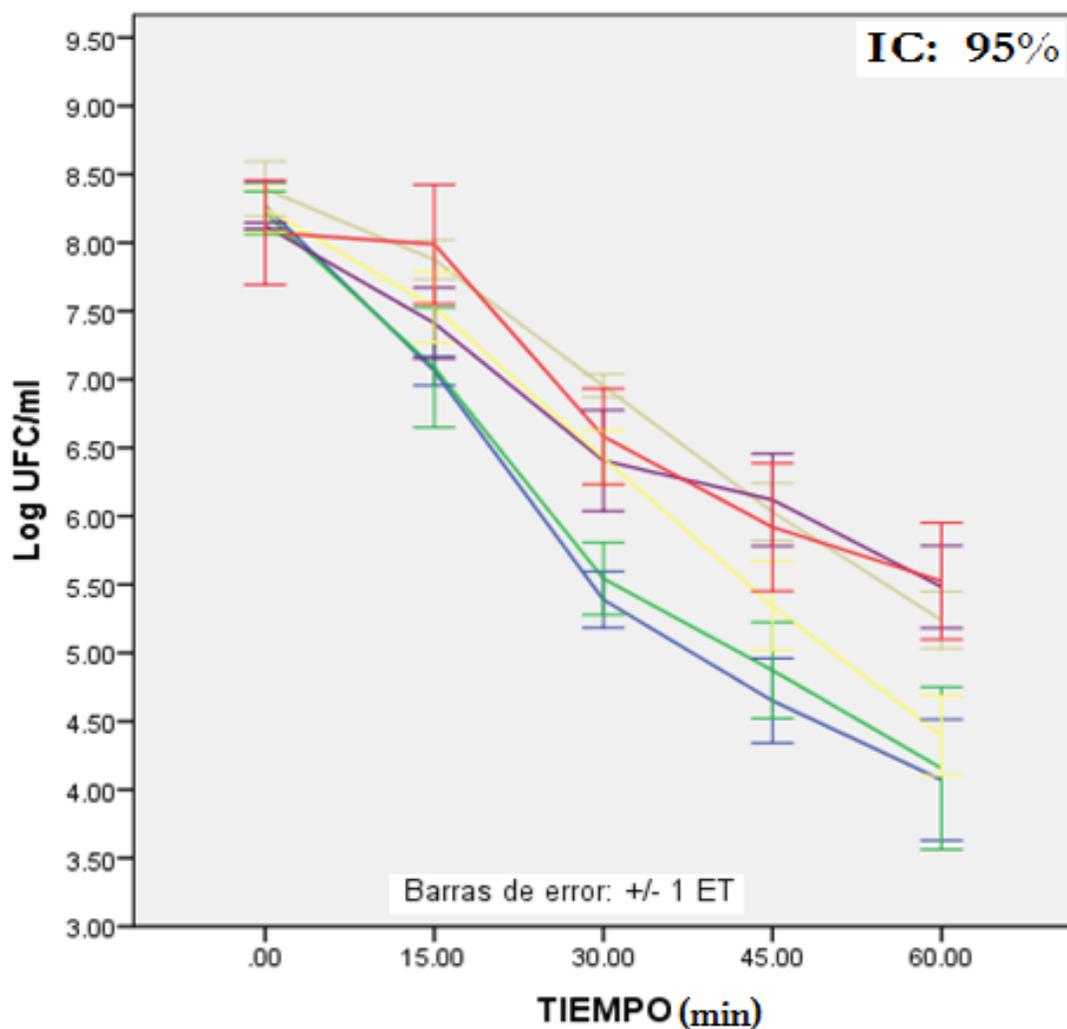
Cuando realizamos los ensayos mezclando los sobrenadantes y las células de los cultivos, y obteniendo tratamientos combinados observamos que los sobrenadantes de células de *B. cereus* que recibieron el estrés térmico, no fueron capaces de inducir termoprotección a 50°C a células de *B. cereus* que no fueron sometidas a dicho estrés térmico. Sin embargo, las células que recibieron el estrés térmico y a las que se les agregó sobrenadante que recibió también un estrés térmico mostraron termoprotección a 50°C, sin embargo esta fue menor que la mostrada por el tratamiento en donde se combinaron células de *B. cereus* que recibieron el estrés térmico con sobrenadantes que no lo recibieron, lo cual nos indicó la capacidad de las células para sobrevivir a temperaturas letales, sin necesidad de ningún metabolito presente en los sobrenadantes. El análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Fisher DSM, demostró diferencias significativas entre los tratamientos que recibieron un estrés térmico y los que no recibieron ( $P < 0.05$ ).

**TABLA 3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TODOS LOS TRATAMIENTOS MEDIANTE LA PUEBA DE FISHER DSM**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DIFERENTE A TRATAMIENTO</b>	<b>IGUAL A TRATAMIENTO</b>
1	3,4,5,6	2
2	3,4,6	1,5
3	1,2,5	4,6
4	1,2	3,5,6
5	1,3	2,4,6
6	1,2	3,4,5

**Nivel de significancia= 0.05**

Cuando analizamos el efecto de sobrenadantes sobre células de otra especie bacteriana, encontramos que las células de *B. cereus* sin estrés térmico previo a las que se les agregaron sobrenadantes de células de *G. stearothermophilus* sin un estrés térmico, fueron capaces de adquirir termoprotección a 50°C al menos por 45 min. Cuando a células de *B. cereus* se les agregaron sobrenadantes de cultivos de *G. stearothermophilus* sometidas a estrés térmico de 65°C por 30 min, se observó que los sobrenadantes confirieron termoprotección 50°C hasta por 1 hora (Fig. 3, Tabla 4). El análisis estadístico mostró que ambos tratamientos se comportaron de manera similar siendo únicamente diferentes en el tiempo de 60 min indicando con esto que la diferencia significativa se presentó cuando se compararon entre los diferentes tiempos.



**FIGURA 3. CURVA DE MUERTE CELULAR DE LAS COMBINACIONES DE SOBRENADANTES (50°C/60min)**

LÍNEA	COMBINACIONES DE LOS SOBRENADANTES
1	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico
2	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico (CONTROL -).
3	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico.
4	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico (CONTROL +).
5	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> sin estrés térmico.
6	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> con estrés térmico.

**TABLA 4. VIABILIDAD DE *B. cereus* 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES SOMETIDOS DE A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS**

TIEMPO (min)	TRATAMIENTOS					
	Cél. S/et + Sb. C/et (logUFC/ml)	Cél. S/et + Sb. S/et (Ctrl -) (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. S/et (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. C/et (Ctrl +) (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G. st.</i> S/et (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G. st.</i> C/et (logUFC/ml)
0	8.268 ± 0.373	8.218 ± 0.350	8.392 ± 0.450	8.124 ± 0.053	8.249 ± 0.378	8.076 ± 0.855
15	7.062 ± 0.237	7.087 ± 0.979	7.876 ± 0.323	7.411 ± 0.581	7.529 ± 0.583	7.989 ± 0.974
30	5.390 ± 0.461	5.543 ± 0.592	6.953 ± 0.186	6.407 ± 0.826	6.426 ± 0.443	6.583 ± 0.785
45	4.650 ± 0.695	4.873 ± 0.788	6.031 ± 0.470	6.120 ± 0.755	5.345 ± 0.729	5.920 ± 1.046
60	4.071 ± 0.990	4.157 ± 1.330	5.239 ± 0.465	5.483 ± 0.671	4.395 ± 0.652	5.526 ± 0.954

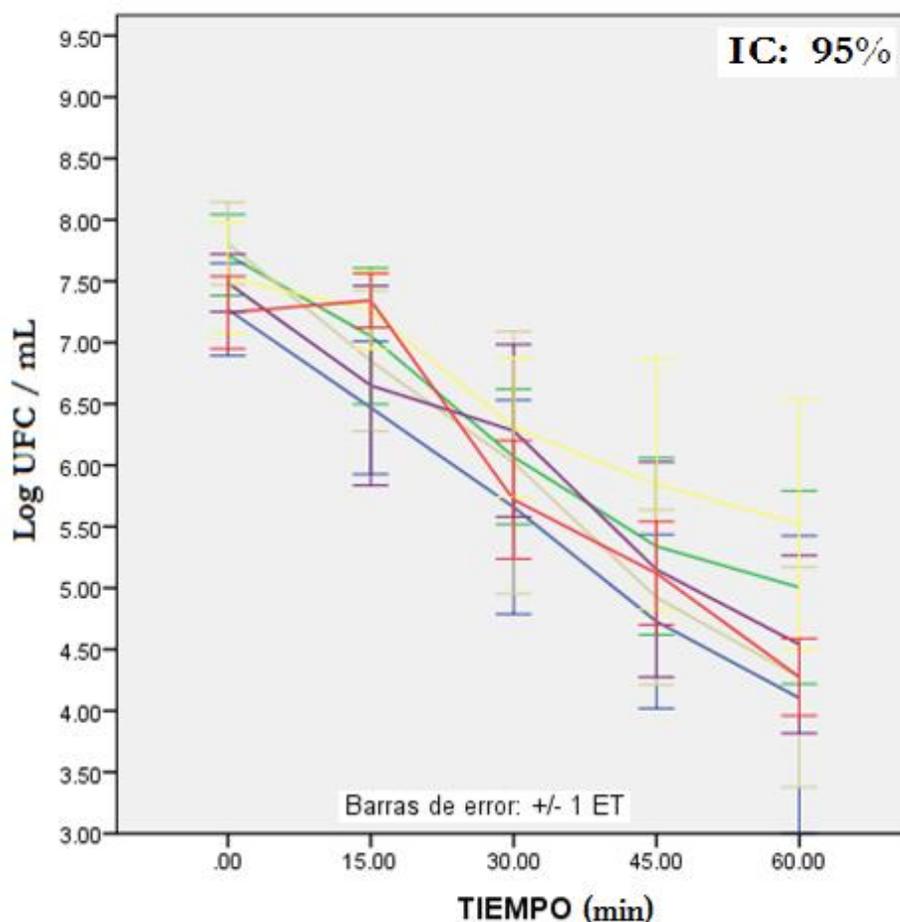
± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Log UFC/mL)

Cél. S/et: Células sin choque, Cél C/et: células con choque, Sb S/et: sobrenadantes sin choque, Sn C/et: sobrenadante con choque, Ctrl -: control negativo, Ctrl +: control positivo.

## 8.4 ANÁLISIS PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LOS EXOMETABOLITOS SECRETADOS POR CÉLULAS DE *G. stearothermophilus*

### A. Tratamiento térmico

Con la finalidad de determinar parcialmente la naturaleza química del o los compuestos presentes en los sobrenadantes de células sometidas a un estrés térmico, estos fueron calentados a 65°C por 15min y posteriormente se continuó con los ensayos para medir la muerte celular. Encontramos que la termoprotección observada, disminuyó cuando se agregaron los sobrenadantes calentados (Fig. 4, Tabla 5), mostrando diferencias significativas al compararlos con los tratamientos en donde se agregaron los sobrenadantes sin calentar.



**FIGURA 4. CURVA DE MUERTE CELULAR DE *B. cereus* 4810 AL SER SOMETIDO CON SOBRENADANTES CALENTADO (65°C/15 min) DE CÉLULAS ESTRESADAS POR CALOR**

LÍNEA	COMBINACIONES DE LOS TRATAMIENTOS SOMETIDOS A CALOR
1	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico
2	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico (CONTROL -).
3	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico.
4	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico (CONTROL +).
5	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> sin estrés térmico.
6	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> con estrés térmico.

**TABLA 5. VIABILIDAD DE *B. cereus* 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO DE 65°C/15min**

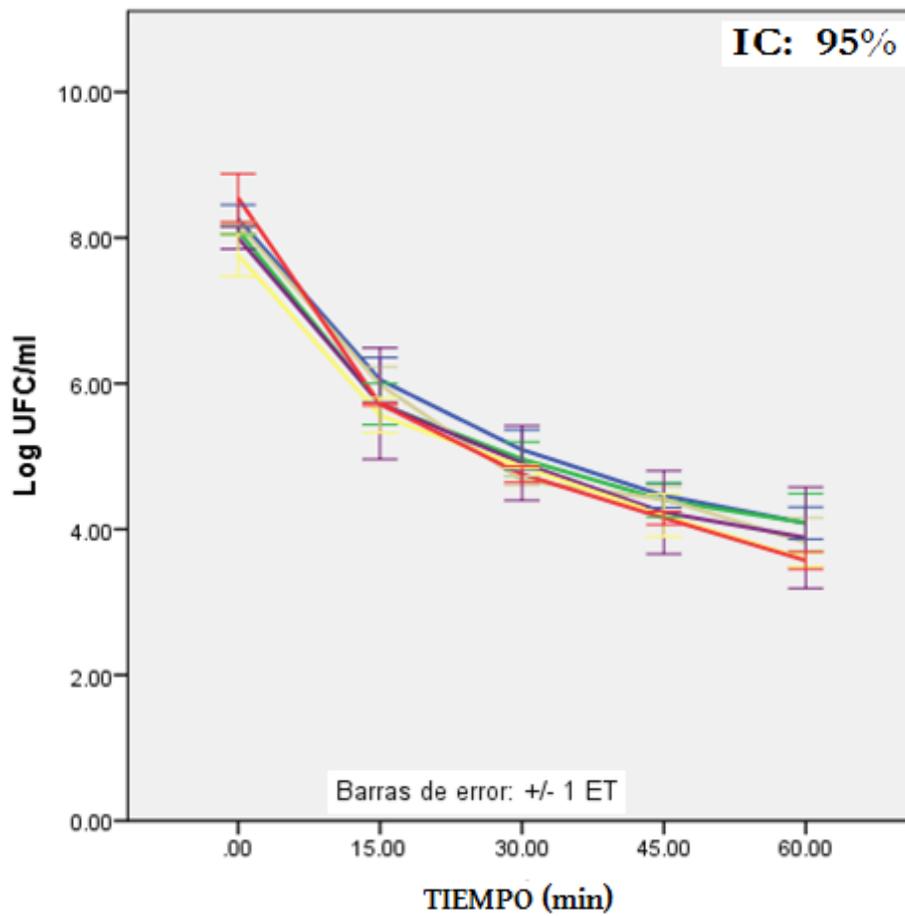
TIEMPO (min)	TRATAMIENTOS					
	Cél. S/et + Sb. C/et (logUFC/ml)	Cél. S/et + Sb. S/et (Ctrl -) (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. S/et (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. C/et (Ctrl +) (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G. st.</i> S/et (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G. st.</i> C/et (logUFC/ml)
0	7.269 ± 0.754	7.713 ± 0.661	7.807 ± 0.670	7.485 ± 0.469	7.527 ± 0.907	7.244 ± 0.590
15	6.469 ± 1.081	7.053 ± 1.108	6.850 ± 1.145	6.650 ± 1.625	7.265 ± 0.635	7.344 ± 0.441
30	5.659 ± 1.742	6.069 ± 1.101	6.022 ± 2.135	6.282 ± 1.405	6.309 ± 1.137	5.719 ± 0.964
45	4.727 ± 1.415	5.340 ± 1.442	4.924 ± 1.426	5.151 ± 1.753	5.847 ± 2.042	5.121 ± 0.842
60	4.104 ± 2.642	5.005 ± 1.573	4.274 ± 1.792	4.540 ± 1.448	5.521 ± 2.029	4.274 ± 0.626

± DESVIACIÓN ESTANDAR (Log UFC/mL)

Cél. S/et: Células sin choque, Cél C/et: células con choque, Sb S/et: sobrenadantes sin choque, Sn C/et: sobrenadante con choque, Ctrl -: control negativo, Ctrl +: control positivo.

## B. Tratamiento con tripsina

Cuando se agregaron sobrenadantes que recibieron o no un estrés térmico, pero que fueron tripsinados encontramos que se comportaron de la misma manera que en el caso de los sobrenadantes calentados, es decir que perdieron su capacidad termoprotectora mostrando diferencias significativas entre los tratamientos tripsinados y los que no recibieron este tratamiento (Fig. 5, Tabla 6). Con esto podemos presumir que en los sobrenadantes existen algunas sustancias de naturaleza proteínica que son capaces de inducir termoprotección a otras células.



**FIGURA 5. CURVA DE MUERTE CELULAR DE *B. cereus* DESPUÉS DE AGREGAR SOBRENADANTES DE *B.cereus* Y *G. stearotherophilus* TRATADOS CON TRIPSINA (0.5 mg/mL) A 37°C/4h**

LÍNEA	COMBINACIONES DE LOS TRATAMIENTOS CON TRIPSINA
1 	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico.
2 	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico (CONTROL-).
3 	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> sin choque.
4 	Células de <i>B. cereus</i> con estrés térmico + sobrenadante de <i>B. cereus</i> con estrés térmico (CONTROL+).
5 	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearotherophilus</i> sin estrés térmico.
6 	Células de <i>B. cereus</i> sin estrés térmico + sobrenadante de <i>G. stearotherophilus</i> con estrés térmico.

**TABLA 6. VIABILIDAD DE *B. cereus* 4810 A 50°C AL AGREGAR SOBRENADANTES DE *B. cereus* Y *G. stearothermophilus* SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO CON TRIPSINA**

TIEMPO (min)	TRATAMIENTOS					
	Cél. S/et + Sb. C/et (logUFC/ml)	Cél. S/et + Sb. S/et (Ctrl -) (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. S/et (logUFC/ml)	Cél. C/et + Sb. C/et (Ctrl +) (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G. st.</i> S/et (logUFC/ml)	Cél. <i>B. cereus</i> S/et + Sb. <i>G.</i> <i>st.</i> C/et (logUFC/ml)
<b>0</b>	8.257 ± 0.340	8.098 ± 0.102	8.192 ± 0.058	8.000 ± 0.266	7.761 ± 0.504	8.545 ± 0.578
<b>15</b>	6.051 ± 0.531	5.718 ± 0.490	5.984 ± 0.421	5.724 ± 1.324	5.563 ± 0.418	5.715 ± 0.033
<b>30</b>	5.090 ± 0.472	4.962 ± 0.409	4.668 ± 0.108	4.907 ± 0.889	4.859 ± 0.043	4.755 ± 0.193
<b>45</b>	4.462 ± 0.288	4.400 ± 0.404	4.413 ± 0.292	4.232 ± 0.990	4.190 ± 0.506	4.154 ± 0.157
<b>60</b>	4.085 ± 0.381	4.087 ± 0.699	3.819 ± 0.581	3.884 ± 1.205	3.584 ± 0.163	3.571 ± 0.207

± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Log UFC/mL)

Cél. S/et: Células sin choque, Cél C/et: células con choque, Sb S/et: sobrenadantes sin choque, Sn C/et: sobrenadante con choque, Ctrl -: control negativo, Ctrl +: control positivo.

## 9. DISCUSIÓN

Investigaciones recientes han mostrado evidencias fisiológicas y moleculares que aseveran que muchas bacterias patógenas contaminantes de alimentos, se adaptan a diversos tipos de estrés a los cuales se están enfrentando continuamente en el medio en el cual se encuentran y por ende se vuelven tolerantes a dichas condiciones (Rowan, MacGregor *et al.* 1999).

En este trabajo se demostró que al someter a células de *B. cereus* a un estrés térmico de 42°C por 30min se inducía termoprotección a 50°C, la cual es letal en este microorganismo. Nuestros resultados concuerdan con lo publicado en el 2002, por Periago, van Schaik *et al.*, donde comprobaron que al someter las células de *B. cereus* al estrés aquí mencionado, adquiriría termoprotección a 50°C. Sin embargo cuando quisimos determinar si dicha termoprotección era conferida por los sobrenadantes o las células, nuestros resultados mostraron que el efecto era provocado por las células, en tanto que los sobrenadantes no fueron capaces de inducir la protección al calor.

Es importante tener en cuenta que la respuesta al estrés dependerá de la intensidad y duración de la condición desfavorable, ya que debe haber tiempo para sintetizar los metabolitos involucrados a dicho proceso de protección, o bien algunos factores deben ser activados como en el caso de los ESCs, los cuales se consideran moléculas que se liberan a medio extracelular durante el crecimiento normal bacteriano y funcionan como moléculas sensoras extracelulares que al detectar un estrés para el microorganismo son activados a componentes de inducción extracelular (EIC) los cuales finalmente ayudarán a montar una

respuesta protectora ante dicho estrés (Rowbury, 2000). Aún no está claro el mecanismo por el que ocurre la liberación al medio extracelular de los metabolitos termoprotectores.

Cuando analizamos si se inducía termoprotección a 75°C en células de *G. stearothermophilus* que no habían sido sometidas a ningún estrés previo (Tabla 2), se observó que aun cuando se agregaron sobrenadantes de células que previamente se habían tratado a 65°C, sí fue posible observar un aumento de la resistencia de este microorganismo a 75°C, sin embargo, esta diferencia aparente no fue estadísticamente significativa, siendo semejantes a los tratamientos que recibieron sobrenadantes no estresados con calor.

Reportes previos de inducción de termoprotección en *B. cereus* han sido descritos, sin embargo éstos se han basado en estudiar la tolerancia al calor en células vegetativas. Cabe mencionar que un aspecto importante es estudiar la respuesta en células en esporulación, y en esporas, ya que sabemos que son estructuras de resistencia que pueden sobrevivir con condiciones tan extremas como 110°C/10min o los 115°C/3min (Finley and Fields., 1962). Debido a lo anterior, es importante tener información sobre este comportamiento en esporas ya que se ha reportado que los bacilos termofílicos pueden exhibir cambios como respuesta a variaciones de temperatura en la composición y estabilidad de su membrana, termoestabilidad de proteínas, requerimientos nutricionales especiales y diferencias en los mecanismos regulatorios (Wu and Welker, 1991). Se ha descrito que algunos genes que codifican para proteínas intracelulares como la DnaK, proteasas Clp, las chaperonas GroEL/GroES y factores sigma alternativos  $\sigma^B$  bajo condiciones de estrés ayudan a la célula a renaturalizar, hidrolizar proteínas o sintetizar proteínas específicas y han sido detectadas en algunos organismos Gram positivos como *B. subtilis* y *B. cereus* (Schumann, 2003; Periago, van Schaik *et al.* 2002).

En el presente trabajo se encontró que al agregar el sobrenadante de cultivos celulares estresados y no estresados de células de *G. stearothermophilus*, se induce termoprotección a 50°C en células de *B. cereus* que no se sometieron a un estrés térmico previo. Esto concuerda con trabajos anteriores en los cuales concluyeron que hay metabolitos presentes en el medio extracelular bacteriano y estos metabolitos son activados actuando como alarmonas en células que no han sido sometidas al estrés previo. Cabe señalar que los metabolitos que se obtuvieron fueron secretados durante un crecimiento normal de *G. stearothermophilus* pudiendo ser parte de productos de su metabolismo (Rowbury, R., 2000, 2001).

Schumann, en 2003 describió que la respuesta al estrés es temporal y generalmente se manifiesta por un incremento rápido y por acumulación de proteínas del estrés en los primeros minutos de aplicada la condición adversa, para terminar después de cierto tiempo ya que los genes relacionados a la tolerancia al estrés son reprimidos. En nuestro estudio observamos el mismo comportamiento en los cultivos cuando realizamos combinaciones entre células y sobrenadantes. En organismos como *B. cereus*, se ha observado que la viabilidad celular disminuye al exponerse a una temperatura extrema a pesar de ser previamente expuesto a un estrés térmico; además, se ha reportado que disminuye la síntesis de proteínas relacionadas al estrés después de los primeros 15 minutos de exposición a un estrés térmico moderado (Periago, van Schaik *et al.*, 2002).

Con la finalidad de determinar la naturaleza química de el o los metabolitos involucrados en la respuesta al estrés de los microorganismos esporulados con que trabajamos, los sobrenadantes de células sometidos al estrés térmico fueron calentados a 65°C por 15 minutos,

condición que desnatura a proteínas y pudimos observar que la capacidad termoprotectora se perdía, por lo que especulamos que el compuesto responsable de tal termoprotección pudiera ser de naturaleza proteínica. Investigaciones anteriores han sugerido que los metabolitos que participan en la adquisición de termoprotección, son proteínas termolábiles (Srinivasan, Östling *et al.* 1998) y pueden presentar cambios conformacionales en su estructura, debido a que la desnaturación de las proteínas mediante calor puede inducir el rompimiento de puentes disulfuro, lo cual ocasiona pérdida de su función y como consecuencia de la actividad termoprotectora (Murray, P., 1997). Esto concuerda con las investigaciones de Solís en 2003 en donde se demostró que los metabolitos encargados de inducir termoprotección en *B. cereus* eran termolábiles y de naturaleza proteica.

Así mismo, los sobrenadantes de las células sometidas a estrés térmico fueron tratados con tripsina (0.5 mg/ml por 4h a 37°C), una proteína con función de proteasa, con la finalidad de corroborar la naturaleza proteínica de los metabolitos termoprotectores. Es bien sabido que la tripsina se utiliza para romper la caseína de la leche (Voet 1995), también se utiliza comúnmente en la investigación biológica en experimentos de proteómica para digerir las proteínas en péptidos en el análisis de espectrometría de masas. La tripsina es particularmente adecuada para esto, ya que tiene una especificidad muy bien definida, porque hidroliza sólo los enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es aportado ya sea por un residuo de arginina o lisina (Rawlings N.D. and Barrett A.J., 1993).

Los resultados que obtuvimos muestran que después de haber adicionado la tripsina a los sobrenadantes, se perdía la capacidad termoprotectora de los mismos, con lo cual determinamos que el o los metabolitos capaces de conferir termoprotección a células es/son de naturaleza proteica. Investigaciones científicas afirman que cuando un microorganismo es sometido a un

estrés, este induce la síntesis de diversas proteínas del estrés, que coadyuvan a la supervivencia del microorganismo a una condición desfavorable (Devlin, T.M 2004).

Debido a la importancia de *B. cereus* como patógeno y causante de ETAs, y de *G. stearothermophilus* como microorganismo termotolerante deteriorante (Ehling-Schulz M *et al.*, 2004), es de gran interés el estudio de la existencia de termoprotección cruzada entre estas especies, ya que se pudiera facilitar la supervivencia del patógeno al proporcionar protección contra estreses térmicos (Coorevits, A. *et al.*, 2012), que pudieran aplicarse como sistemas de control en la industria alimentaria.

## 10. CONCLUSIONES

Las células de *B. cereus* que recibieron un estrés térmico de 42°C por 30 minutos, tienen mayor capacidad de sobrevivir a una temperatura letal de 50°C, que las células que no recibieron dicho tratamiento.

Los sobrenadantes de células de *G. stearothermophilus* sometidas a un estrés térmico o en crecimiento normal (75°C), fueron capaces de inducir termoprotección a 65°C a células de *B. cereus* que no fueron sometidas a ningún tipo de estrés.

Cuando se sometieron los sobrenadantes de células estresadas de *B. cereus* y *G. stearothermophilus* a calentamiento (65°C/15min) y tratamiento con tripsina, se observó la pérdida de la capacidad termoprotectora lo que indica que el o los metabolitos que confieren esta actividad protectora son termolábiles y de naturaleza proteica.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Arnau, J. and N. Balluerka. 2004. Análisis de datos longitudinales y de curvas de crecimiento. Enfoque clásico y propuestas actuales. *Psicothema* 16(1): 156-162.
2. Asha, S. and K. Bhagyalakshmi. 2011. Heat Shock Proteins. *Journal of Pharmacy Research* 4(10): 3829-3832.
3. Auffray, Y., E. Lecesne, A. Hartke and P. Boutibonnes. 1995. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Current Microbiology* 30(2): 87-91.
4. Benítez Chao D.F. 2012. Inducción de termotolerancia a células de *Clostridium perfringens* mediante sobrenadantes de cultivos de *Bacillus cereus* sometidos a un choque térmico subletal. Tesis. Facultad. De Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. pp. 21-25.
5. Browne, N. and B. Dowds. 2001. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 91(6): 1085-1094.
6. Burgess, S. A., D. Lindsay and S. H. Flint. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144(2): 215-225.
7. Casal, S., E. Mendes, J. Fernandes, M. Oliveira and M. Ferreira. 2004. Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography–mass spectrometry as their tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A* 1040(1): 105-114.
8. Centers for Disease, C. and Prevention. 1994. *Bacillus cereus* food poisoning associated with fried rice at two child day care centers-Virginia, 1993. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 43(10): 177.
9. Coorevits, A., A. E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P. De Vos, A. Van Landschoot and N. A. Logan. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of

- Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucoasidius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(7): 1470-1485.
10. De Maio, A. 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11(1): 1-12.
  11. den Besten, H. M., M. Mataragas, R. Moezelaar, T. Abee and M. H. Zwietering. 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 5884-5894.
  12. Devlin, T.M. 2004. *Bioquímica libro de texto con aplicación clínica*. 5<sup>a</sup> ed. Editorial Reverté. Barcelona España. pp. 132-134.
  13. Dorman C. J. 1994. *Genetics of bacterial virulence*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp 204-259.
  14. Duffy, G. and J. Sheridan. 1998. Viability staining in a direct count rapid method for the determination of total viable counts on processed meats. *Journal of Microbiological Methods* 31(3): 167-174.
  15. Ehling-Schulz, M., M. Fricker and S. Scherer. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* 48(7): 479-487.
  16. Finley, N. and M. Fields. 1962. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology* 10(3): 231-236.
  17. Garcia, S., J. C. Limón and N. L. Heredia. 2001. Cross protection by heat and cold shock to lethal temperatures in *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology* 32(2): 110-112.

18. Gordon, R., W. Haynes and C. Pang 1973. The genus bacillus. US Department of Agriculture Handbook (427): 109-126.
19. Guinebretière, M.-H. and V. Broussolle. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. Journal of Clinical Microbiology 40(8): 3053-3056.
20. Hecker, M., W. Schumann and U. Völker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 19(3): 417-428.
21. Heredia, N. L., G. A. García, R. Luevanos, R. G. Labbe and J. S. García-Alvarado. 1997. Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sublethal heat shock. Journal of Food Protection 60(8): 998-1000.
22. Heredia, N. L., R. G. Labbé and J. S. Garcia-Alvarado. 1998. "Alteration in sporulation, enterotoxin production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* type A following heat shock." Journal of Food Protection 61(9): 1143-1147.
23. Isohanni, P., S. Huehn, T. Aho, T. Alter and U. Lyhs. 2013. Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. Food Microbiology 34(2): 431-435.
24. Jishage, M., K. Kvint, V. Shingler and T. Nyström. 2002. "Regulation of  $\zeta$  factor competition by the alarmone ppGpp." Genes & Development 16(10): 1260-1270.
25. Leuschner, C. and G. Antranikian. 1995. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11(1): 95-114.
26. Li, J.-s., Y.-t. Bi, C. Dong, J.-f. Yang and W.-d. Liang. 2011. Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of *Streptococcus thermophilus*. PloS one 6(10): e25777.
27. Madigan M & Martinko J. 1998. Brock Biology of Microorganisms. 8th ed. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. USA. pp. 720-730.

28. Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid and W. Schumann. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. The EMBO Journal 16(15): 4579-4590.
29. Morano, K. A. 2007. New Tricks for an Old Dog. Annals of the New York Academy of Sciences 1113(1): 1-14.
30. Movahedi, S. and W. Waites. 2000. A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. Journal of Bacteriology 182(17): 4758-4763.
31. Murray, P., G.H. Kobayashi, M.A. Pfauer y K.S. Rosenthal. 1997. Microbiología medica. 2°ed. Harcourt Brace. Madrid, España. pp. 294-297.
32. Nazina, T., T. Tourova, A. Poltarau, E. Novikova, A. Grigoryan, A. Ivanova, A. Lysenko, V. Petrunyaka, G. Osipov and S. Belyaev. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51(2): 433-446.
33. Nikolaev, I. 1996. Comparative study of properties of two extracellular protectors, isolated from *Escherichia coli* at elevated temperature. Mikrobiologiya 66(6): 790-795.
34. O'Connor, K., S. A. Fletcher and L. N. Csonka. 2009. Increased expression of Mg<sup>2+</sup> transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(41): 17522-17527.
35. Periago, P. M., W. van Schaik, T. Abee and J. A. Wouters. 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. Applied and Environmental Microbiology 68(7): 3486-3495.
36. Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy and P. Youngman. 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 41(4): 757-774.

37. Rawlings, N. D. and A. J. Barrett. 1993. Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology* 244: 19-61.
38. Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18(12): 571-573.
39. Ritossa, F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones* 1(2): 97-98.
40. Rouquette, C., C. De Chastellier, S. Nair and P. Berche. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Molecular Microbiology* 27(6): 1235-1245.
41. Rowan, N., S. MacGregor, J. Anderson, R. Fouracre, L. McIlvaney and O. Farish. 1999. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1312-1315.
42. Rowbury, R. J. 2000. Killed cultures of *Escherichia coli* can protect living organisms from acid stress. *Microbiology* 146(8): 1759-1760.
43. Rowbury, R. 2001. Cross-talk involving extracellular sensors and extracellular alarmones gives early warning to unstressed *Escherichia coli* of impending lethal chemical stress and leads to induction of tolerance responses. *Journal of Applied Microbiology* 90(5): 677-695.
44. Sanders, B. M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology* 23(1): 49-75.
45. Schön, U. and W. Schumann. 1994. Construction of His<sub>6</sub>-tagging vectors allowing single-step purification of GroES and other polypeptides produced in *Bacillus subtilis*. *Gene* 147(1): 91-94.
46. Schumann, W. 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress & Chaperones* 8(3): 207.

47. Shenhar, Y., A. Rasouly, D. Biran and E. Z. Ron. 2009. Adaptation of *Escherichia coli* to elevated temperatures involves a change in stability of heat shock gene transcripts. *Environmental Microbiology* 11(12): 2989-2997.
48. Solís Soto, L.Y. 2003. Adquisición de termotolerancia en *Bacillus cereus* por sobrenadantes de células estresadas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. pp. 22-30.
49. Spiegel, M.R., Schiller, J. & Srinivasan, R.A. 2007. Análisis de la varianza. Probabilidad y estadística. Editorial McGraw-Hill. 2°ed. México, D.F. pp. 335-371.
50. Srinivasan, S., J. Östling, T. Charlton, R. de Nys, K. Takayama and S. Kjelleberg. 1998. Extracellular signal molecule (s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio sp.* strain S14. *Journal of Bacteriology* 180(2): 201-209.
51. Tavaría, M., T. Gabriele, I. Kola and R. L. Anderson. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress & Chaperones* 1(1): 23.
52. Thompson, J. N. 1999. The evolution of species interactions. *Science* 284(5423): 2116-2118.
53. van Schaik, W. and T. Abee. 2005. The role of  $\sigma^B$  in the stress response of Gram-positive bacteria—targets for food preservation and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 16(2): 218-224.
54. Voet D. and Voet J.G. 1995. *Biochemistry*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York. pp. 396–400.
55. Wu, L. and N. Welker. 1991. Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *Journal of Bacteriology* 173(15): 4889-4892.

## 12. TRABAJOS PRESENTADOS EN FOROS INTERNACIONALES

  
**Congreso Internacional de  
Inocuidad Alimentaria 2013**

Joel Elizondo-Luévano, Mayra Gómez, Santos García, Norma Heredia.

Otorga a:  
la presente

por su participación en el Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria 2013 en la modalidad de presentación

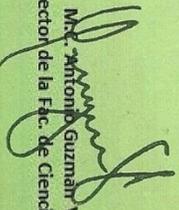
# Constancia

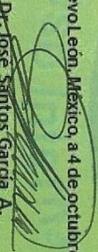
**CARTEL**

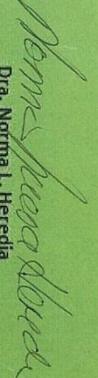
Con el Título:  
**CAPACIDAD TERMOPROTECTORA DE EXOMETABOLITOS EN CÉLULAS DE *Bacillus cereus* MEDIANTE CULTIVOS ESTRESADOS Y NO ESTRESADOS DE *Geobacillus stearothermophilus*.**

Llevado a cabo en la Biblioteca Magna Universitaria "Rafael Rangel Frías", del 2 al 4 de octubre del presente año.  
"Alere Flamam Veritatis"

Monterrey, Nuevo León, México, a 4 de octubre de 2013

  
MSc. Antonio Guzmán Velasco  
Director de la Fac. de Ciencias Biológicas

  
Dr. José Santos García A.  
Coordinador

  
Dra. Norma L. Heredia  
Coordinadora

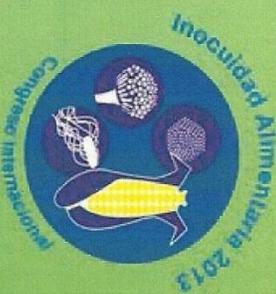
  
ANIVERSARIO  
1953-2013  
80 años  
de fundación de la Universidad Autónoma de Nuevo León

  
COMACIT

  
BioCluster

  
AMEPAL

  
AMECA

  
Inocuidad Alimentaria 2013  
Congreso Internacional

### **13. RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Q.B.P. JOEL HORACIO ELIZONDO LUEVANO**

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: **TERMOTOLERANCIA MEDIADA POR EXOMETABOLITOS ENTRE *Bacillus cereus* Y *Geobacillus stearothermophilus*.**

Campo de Estudio: Inocuidad Alimentaria

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 13 de Julio de 1986.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en 2010.

## 14. NOTAS



