

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Influencia de sobrenadantes de cultivos estresados de
Clostridium perfringens en la tolerancia del
microorganismo a las altas temperaturas.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE:

Químico Bacteriólogo Parasitólogo

PRESENTA

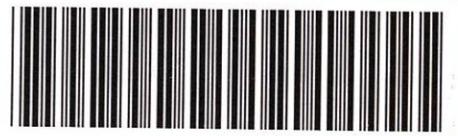
MIRNA ESTHELA ARAIZA MENDOZA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

ABRIL DE 1999

8

TL
QR01
.C54
A7
1999
c.1



1080092562

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Influencia de sobrenadantes de cultivos estresados de
Clostridium perfringens en la tolerancia del
microorganismo a las altas temperaturas.**

TESIS

presentada como requisito parcial para obtener
el título de *Químico Bacteriólogo Parasitólogo*

PRESENTA

Mirna Esthela Araiza Mendoza.

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

ABRIL DE 1999

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**Influencia de sobrenadantes de cultivos estresados de
Clostridium perfringens en la tolerancia del
microorganismo a las altas temperaturas**

TESIS

presentada como requisito parcial para obtener
el título de *Químico Bacteriólogo Parasitólogo*

PRESENTA

Mirna Esthela Araiza Mendoza

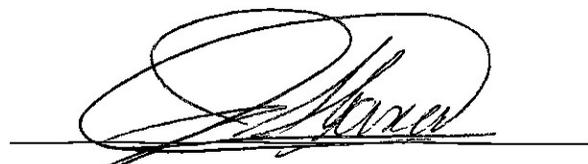
APROBADA

COMISIÓN DE TESIS



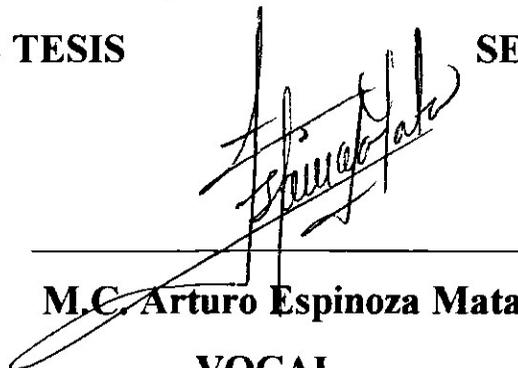
Dra. Norma Laura Heredia Rojas

DIRECTOR DE TESIS



Dr. José Santos García Alvarado

SECRETARIO



M.C. Arturo Espinoza Mata

VOCAL

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la asesoría del Dr. José Santos García Alvarado.

Esta investigación fué financiada por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT).

DEDICATORIA

**A tí mamá María Esthela Araiza Mendoza porque eres para mí
un ejemplo de fuerza, valor, dedicación y perseverancia.**

**Por darme libertad en mis desiciones
y por que siempre me has dado de tí lo mejor**

**A Eduardo Sánchez García porque te amo,
por hacerme feliz y acompañarme a conocer la vida.**

**Espero que sigamos adelante con nuestras metas
y que juntos alcancemos esos triunfos.**

**A Rosy, Ricardo, David, Javier, Andrea y Eva que son mi familia,
porque en los momentos agradables y difíciles de la vida
ustedes han estado a mi lado.**

**Especialmente a Rosalinda García Garza por su confianza,
consejos, apoyo y por abrirme las puertas de su casa con gran afecto.**

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) por brindar la ayuda económica necesaria para la realización de esta investigación.

A la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y al Dr. José Santos García Alvarado por su confianza al aceptarme en su equipo de investigación, por su paciencia, asesoría y enseñanzas durante mi formación profesional, y especialmente por su ayuda y apoyo en mi vida personal.

Al M.C. Arturo Espinoza por haber aceptado formar parte de mi Comisión de Tesis y por mejorar la presentación de este trabajo.

Al Q.B.P. Eduardo Sánchez García por tu constante disponibilidad para ayudarme, especialmente durante la etapa práctica de esta investigación.

A los maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas quienes me enseñaron los conocimientos básicos para mi preparación.

A todo el equipo de investigadores del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos porque de todos he recibido ayuda y me han enseñado a convivir en el ambiente de trabajo.

A mis amigas de la generación 93-98 de Q.B.P. Lucy, Myriam, Bety P, Brenda, Norma, Yesenia y Linda, con quienes he compartido momentos agradables, por soportarme en los malos ratos y por sus palabras de ánimo, gracias por su amistad.

INDICE DE CONTENIDO

Página de título	I
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Indice de contenido	V
Lista de figuras	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
Características del microorganismo	6
Esporulación	8
Enfermedades alimentarias por <i>C. perfringens</i>	10
Proteínas del estrés térmico	11
Termotolerancia	14
Sobrenadantes de células estresadas	17
Hipótesis	19
Objetivo	20
Material y Métodos	21
Activación de la cepa	21
Cinética de crecimiento	21
Ensayos con sobrenadantes	22
Ensayos de termotolerancia	22
Calentamiento de los sobrenadantes	23

Resultados	25
Discusión	29
Conclusiones	33
Literatura Citada	34

LISTA DE FIGURAS

- 1.- Combinación de sobrenadantes y células..... 23
- 2.- Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041. Los sobrenadantes fueron expuestos a diferentes tratamientos..... 25
- 3.- Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041. Los sobrenadantes fueron expuestos a 65°C..... 26
- 4.-Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041. Los sobrenadantes fueron expuestos a 65°C..... 27

LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{600\text{ nm}}$	Absorbancia a 600 nm
CO_2	Dióxido de Carbono
CPE	Enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
Eh	Potencial óxido-reducción
Fig.	Figura
h	Hora(s)
kDa	Kilodaltones
Log	Logaritmo base 10
ml	Mililitros
min	Minuto(s)
N_2	Nitrógeno (gas)
nm	Nanómetro(s)
PET	Proteínas del estrés térmico
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
α	Alfa
β	Beta
ι	Iota
ϵ	Epsilon
%	Por ciento

RESUMEN

Desde hace tiempo se demostró que cuando las células de *Clostridium perfringens* eran sometidas a un estrés térmico se inducía la producción de proteínas del estrés, las cuales entre otras funciones podían proteger a las células a temperaturas elevadas, normalmente letales.

Recientemente se ha demostrado que bacterias sujetas a un determinado tipo de estrés favorecen la inducción de diversos metabolitos que se liberan al medio y proporcionan la capacidad de adaptar a otras células a condiciones no permisibles para su supervivencia.

Ya que *C. perfringens* es una bacteria anaerobia patógena para el hombre y animales, el entendimiento de los factores que pudieran intervenir en la sobrevivencia de este patógeno resultarían interesantes.

El objetivo de este trabajo fue establecer si metabolitos liberados al medio de cultivo de células estresadas provocaban una protección contra una temperatura letal.

C. perfringens fue cultivado en caldo tioglicolato a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron la parte media de la fase logarítmica, fueron sometidos a un choque térmico de 50°C/30 min. Inmediatamente después las células se centrifugaron y los sobrenadantes se colocaron en tubos con células no sometidas al estrés de temperatura. Las diferentes combinaciones de tratamientos fueron colocados a 55°C y se tomaron alícuotas cada 15 min para determinar viabilidad celular por el método de difusión en placa.

Nuestros resultados indicaron que los sobrenadantes de células estresadas, no provocaban una protección a temperaturas letales como lo hacen las células completas, sin embargo, si permitían mayor tolerancia a altas temperaturas que las células no estresadas y que no fueron tratadas con estos sobrenadantes.

El efecto protector de los sobrenadantes disminuyó notablemente cuando estos fueron calentados a 100°C/15 min por lo que podemos sugerir que el/los metabolitos involucrados son de naturaleza proteica.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son consideradas como una de las principales causas de morbilidad en países industrializados y en vías de desarrollo, lo cual representa una gran problemática en el área de la salud y a nivel económico (Todd, E. C., 1989).

Los agentes etiológicos más importantes que causan problemas al ingerir alimentos son de origen microbiano, y el mayor porcentaje de infecciones e intoxicaciones son producidas por bacterias, los hongos juegan un papel importante y en una menor proporción los virus (Eley, A. R., 1996).

Las bacterias han desarrollado mecanismos de adaptación que les permite sobrevivir a condiciones adversas lo que ha causado problemas inesperados en la industria de alimentos.

Una de las más comunes e importantes enfermedades humanas gastrointestinales es el envenenamiento por alimentos causada por *Clostridium perfringens* tipo A. Esta bacteria patógena está ampliamente distribuída en suelo y aguas residuales (Mc Clane, B.A., 1997). Produce también otras enfermedades humanas como la gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial), enterocolitis necrotizante de infantes, muerte súbita infantil y enteritis necrótica, además es causante de enfermedades de importancia veterinaria como la disentería en corderos, diarreas en diversos animales, enterotoxemia en ovejas, borregos y ganado vacuno, la

enfermedad pulposa del riñon en cabras y la enteritis necrótica equina (Griffiths, N.J., 1997; Labbé, R.G., 1989; Meer, R. R., 1997).

Los factores que contribuyen a la aparición de brotes producidos por esta bacteria son asociados principalmente a los tiempos inadecuados de cocción de los alimentos y a una manipulación ó tratamiento incorrecto en etapas finales. Cabe mencionar además que este microorganismo puede tener un tiempo de duplicación muy corto (7.8 minutos) y la capacidad para formar esporas como estructuras de sobrevivencia (Labbé, R.G., 1989).

Desde hace tiempo se demostró que cuando las células de *C. perfringens* eran sometidas a un estrés térmico se inducía la producción de proteínas, las cuales entre otras funciones, podían proteger a las células a temperaturas elevadas normalmente letales (Heredia, N. *et al*, 1996).

Investigaciones más recientes demostraron que cuando células de *E. coli* eran sujetas a un estrés térmico, liberaban al medio de cultivo diversos metabolitos, los cuales podían proporcionar una protección al calor en otras células que no se sometieron a un estrés previo (Nikolaev, Y.A., 1997).

Debido a todo lo anterior, consideramos que el estudio de la capacidad protectora de los sobrenadantes de *C. perfringens* estresados pudiera ser de gran importancia ya que al ser un patógeno que contamina alimentos, estos podrían calentarse y provocar la liberación de metabolitos de la bacteria que pudieran favorecer la resistencia de otras bacteria contaminantes no sometidas a condiciones letales.

Los resultados de este trabajo pueden ser de gran importancia, para ayudar a establecer pautas sanitarias adecuadas para evitar la intoxicación alimentaria por esta bacteria.

ANTECEDENTES

Importancia:

C. perfringens actualmente es una de las bacterias patógenas más ampliamente distribuidas y estudiadas, sin embargo, fue reconocido como un importante agente causal de enfermedades a partir de las décadas de 1940 a 1960. Entre las enfermedades que causa se encuentran: la gangrena gaseosa, diarrea crónica humana, síndrome de muerte súbita infantil, el envenenamiento por alimentos, la gastroenteritis y la enteritis necrótica (McDonel, J.L., 1986). También se estableció que era el causante de enfermedades veterinarias como la enterotoxemia clostridial en animales domésticos y la enfermedad pulposa del riñón en corderos. Las tasas de mortalidad en estas llegaron a ser hasta de un 100% por lo que tuvo un gran impacto económico (Miserez, R., 1998).

Las enfermedades ocasionadas por *C. perfringens* son generalmente mediadas por la producción de enzimas extracelulares ó toxinas. Así en el envenenamiento por alimentos se involucró una enterotoxina (Labbé, R.G., 1989).

Características del microorganismo:

C. perfringens anteriormente conocido como *C. welchii*, pertenece a la familia *Bacillaceae*. Esta una bacteria anaerobia, gram-positiva, formadora de esporas, encapsulada, no móvil y de tamaño variable. Se puede encontrar como parte de la flora normal en suelo, agua, aire, alimentos y en tracto intestinal (McClane, B. A., 1996).

Dentro de las características más importantes presentadas por *C. perfringens* se encuentran: la capacidad de crecer a temperaturas relativamente altas (43-45°C), tiene un corto tiempo de generación de alrededor de 10 minutos, lo que permite su rápida multiplicación en los alimentos (Labbé, R., 1989). Esta bacteria se clasifica como un anaerobio obligado, sin embargo, crece en presencia de bajos niveles de oxígeno ya que requiere de modestas reducciones de potencial óxido-reducción (Eh) para su crecimiento (Hayes, P.R., 1992).

Al menos 13 toxinas diferentes son expresadas por *C. perfringens* y en base a que una célula produce un subgrupo definido de estas toxinas, se formó un sistema de tipificación de toxinas que es usado para clasificar a las cepas dentro de cinco tipos toxigénicos (A-E) (McClane, B. A., 1996). Sin embargo su virulencia ha sido asociada con su capacidad para expresar principalmente las toxinas α , β , ϵ , e ι (Yoo, H.S., 1997).

La alfa (α) toxina fue conocida también como fosfolipasa C ó lecitinasa y ha sido reconocido como unos de los más importantes factores de virulencia de este microorganismo. Esta metaloenzima multifuncional es la principal causante de la gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial); la cual posee actividad de fosfolipasa y esfingomielinasa que son las responsables de la citotoxicidad, necrosis y hemólisis (Rood, J. I., 1991).

En 1998 Miyamoto *et al*, demostraron que la epsilon (ϵ) toxina, fue capaz de ejercer una acción neurotóxica después de que se inyectó intravenosamente en animales de laboratorio, sin embargo sus efectos no fueron tan peligrosos como las

toxinas botulínica ó tetánica. Además, continuamente se han estado caracterizando nuevas toxinas producidas por este microorganismo (Maryse, G., 1997).

La enterotoxina (CPE) es otra toxina producida por *C. perfringens* que esta involucrada con la intoxicación por alimentos (Meer, R.R.,1997). Esta proteína presenta como características un peso molecular de 35,000 Da, un pl de 4.3, 319 aminoácidos de longitud y es inactivada a una temperatura mayor de 53°C por más de 5 min (Rood, J.I., 1991; McClane, B. A., 1996).

Esporulación

Cuando las condiciones ambientales no son favorables para la aparición de las células vegetativas, principalmente por la carencia de fuentes de carbono o de nitrógeno, *C. perfringens* comienza la formación de esporas. Estas últimas son estructuras de sobrevivencia que resisten el estrés del medio ambiente como la radiación, la desecación y el calor (Hayes, P., 1992).

La resistencia al calor de los microorganismos, probablemente es uno de los factores más estudiados, ya que tiene mayores implicaciones para la industria de alimentos, puesto que las esporas pueden sobrevivir durante la cocción de estos y después germinar (Brett, M.M.,1994; Labbé, R., 1989; McClane, B. A., 1996). Más investigaciones al respecto han demostrado la sobrevivencia de estas estructuras después de la cocción de carne contaminada a 100°C durante 1 h (Doyle, M., 1997).

Una gran cantidad de cepas de *C. perfringens* resistentes al calor han sido involucradas con brotes de envenenamiento por alimentos (Guzmán, A., 1989).

La activación de las esporas es el paso de espora a célula vegetativa y puede ser inducida por diversos factores, sin embargo el más ampliamente usado es su calentamiento a una temperatura subletal 75-80°C por 15-20 min (Labbé, R., 1989). El proceso de activación, no está bien definido, pero se ha determinado que el calor induce el cambio de una espora en latencia a un metabolismo activo, en donde la espora germinada presenta degradación de su corteza, una mayor cantidad de minerales y ácido dipicolínico liberados al medio (McClane, B. A., 1996).

El proceso de esporulación y producción de enterotoxina está relacionado de manera importante, ya que su expresión es fuertemente regulada durante este proceso. La toxina puede ser producida en grandes cantidades, llegando incluso a representar del 15 al 30% de la proteína total celular y generalmente su síntesis se detecta después de 2 a 3 h de haber comenzado el proceso de esporulación. La enterotoxina se libera cuando la célula madre se desintegra para liberar a la espora madura (McClane, B. A., 1996).

Aunque las células vegetativas pudieran ser capaces de producir pequeñas cantidades de enterotoxina esta no es significativa como para producir un cuadro patogénico. Se han realizado estudios para determinar si la enterotoxina juega un papel importante en el proceso de formación de esporas; Ryu y Labbe en 1989, encontraron solo pequeñas cantidades de enterotoxina asociados con la espora, con lo cual concluyeron que la enterotoxina no tenía un papel importante durante la formación de esta estructura.

Enfermedades alimentarias producidas por *C. perfringens*

Entre las enfermedades humanas producidas por *C. perfringens* y que podían ser transmitidas por alimentos se encontraban, el envenenamiento por alimentos y la enteritis necrótica (McDonel, J.L., 1986).

La enteritis necrótica es también conocida como Drambrand ó Pig-Bel. Esta es causada por cepas de *C. perfringens* tipo C mediante la producción de la β toxina, la cual se considera como el primer factor de virulencia involucrado en esta enfermedad y está relacionado con el consumo de carne de cerdo (Labbé, R., 1989).

Se ha reportado que el envenenamiento por alimentos ó la intoxicación alimentaria se desarrolla cuando se consume un alimento contaminado con un gran número de células vegetativas de *C. perfringens* enterotoxigénico. La mayoría de las células son destruidas a su paso por la acidez del estómago, sin embargo, la sobrevivencia de algunas células puede provocar la enfermedad debido a que estas pueden multiplicarse en un tiempo relativamente corto, y comenzar el proceso de esporulación con la subsecuente acumulación y liberación de la CPE (MC Clane, B.A., 1997).

Estudios en animales indicaron que la CPE actuaba sobre el intestino delgado, uniéndose rápidamente a la membrana de las células epiteliales y ahí era donde comenzaba a ejercer su acción citotóxica, provocando un daño histopatológico rápido a diferencia de otras toxinas (Mc Clane, A., 1997).

Después de 8-15 h de haber ingerido el alimento contaminado, los síntomas generales causados por la CPE son los cólicos abdominales severos y diarrea profusa.

Esta enterotoxina ha sido ligada también a otras enfermedades como las diarrea humana asociada a antibióticos y a diarreas veterinarias de animales domésticos (Rood, J.I., 1991).

Los alimentos más comúnmente relacionados con los brotes por *C. perfringens* fueron mencionados por Hobbs en 1973, reportando en una incidencia de hasta el 72% a los productos cárnicos y de aves de corral.

Doyle (1997) mencionó que los brotes de envenenamiento por alimentos producidos por *C. perfringens* fueron principalmente debido a la inadecuada temperatura y tiempo de cocción que podían resistir las esporas, además de crear condiciones de anaerobiosis que podían beneficiar el desarrollo del microorganismo. El lento enfriamiento de los alimentos fue particularmente riesgoso puesto que el tiempo de generación es muy rápido a esas temperaturas pudiéndose desarrollar un gran número de células vegetativas, así como también una inadecuada temperatura de refrigeración y un inapropiado recalentamiento de los alimentos (Hayes, P.R., 1992; Labbé, R., 1989).

Proteínas del estrés térmico

Existen factores que afectan el crecimiento y la sobrevivencia de los organismos, tales como la temperatura en que se desarrollan, el potencial de óxido-reducción, la actividad de agua, el pH, la concentración de sales, etc. (Labbé, R.G., 1989). Sin embargo, para su adaptación, los organismos han desarrollado diversos mecanismos protectivos. El principal puede ser el de la inducción de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés las cuales han sido altamente

conservadas durante la evolución y tienen funciones muy similares en todos los organismos (Yura, T., 1993).

Las proteínas del estrés en general tienen una función de protección no específica que permite la adaptación a cualquier tipo de estrés, sin embargo, algunas de ellas tienen un factor único de inducción para su expresión, por lo que estas se conocen como proteínas del estrés específicas (Hecker, M., 1996).

Las proteínas del estrés térmico (PET) son un ejemplo. Bajo condiciones normales de crecimiento, las PET son expresadas constitutivamente en niveles que van del 5-10% del total de proteínas. Estas pueden cumplir una función normal indispensable, sin embargo, su nivel puede incrementarse llegando a constituir el 90% de todas las proteínas celulares cuando las células son sometidas a condiciones de estrés (Morimoto, R.I., 1993).

Se ha demostrado que algunas de las proteínas del estrés térmico normalmente intervienen en el plegamiento de proteínas, reparación y degradación de estas. Actualmente se han clasificado a las proteínas del estrés térmico en diferentes familias según su peso molecular obtenido mediante técnicas de electroforesis. Las PET de alto peso molecular de 83 a 90 KDa intervienen en la unión a polipéptidos específicos y los mantienen en su propio compartimento celular. Las PET 70 con un peso molecular promedio de 66 a 78 KDa mantienen algunos polipéptidos en su estado de plegamiento para facilitar su translocación a través de la membrana, permiten la oligomerización y se unen a polipéptidos específicos. La familia de las PET 60 están presentes en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, se les ha llamado "chaperoninas" y ejercen una función similar a las PET 70 con las cuales presentan secuencias

altamente conservadas entre diferentes organismos procariotes y eucariotes (Bukau, B., 1993). La familia de las PET más pequeñas presentan un peso de 15 a 30 KDa su función en eucariotes es desconocida, sin embargo, en procariotes juegan un papel importante en la formación del septo. También, se han detectado algunas proteínas más grandes de 100 a 110 KDa con propiedades diferentes de estas otras familias (Morimoto, R.I., 1993). En general, las PET son productos de familias de multigenes similares en estructura, pero diferentes en su forma de regulación y sitio específico de acción (Schlesinger, M. J., 1988).

Concordando con lo anterior, Jindal (1996) mencionó que las proteínas del estrés térmico jugaban papeles biológicos muy importantes al actuar como "moléculas chaperonas" ya que se involucraban en diversas funciones celulares esenciales, así como también, las PET eran reconocidas por el sistema inmune como antígenos inmunodominantes e incluso podían inducir ciertas enfermedades autoinmunes (Lathigra, R.B., 1991; Young, D.B., 1992).

Neidhardt (1987) mencionó que se han detectado 17 PET en *E. coli* y que a nivel genético eran controladas por un regulón controlado por el gene regulatorio del estrés térmico, *htp R*.

La respuesta al estrés térmico fue caracterizada en *Bacillus subtilis* por Amori, et al (1986) quienes encontraron la inducción de 26 PET cuando la temperatura cambiaba de 20 a 32°C. De igual manera se indujo la síntesis de estas proteínas con etanol al 4%.

Posteriormente, Qoronfleh (1987) indujo la producción de proteínas del estrés térmico en el mismo microorganismo para determinar su localización subcelular

mediante autoradioflorogramas y determinó cuatro prominentes PET, de las cuales dos se asociaban a la fracción de membrana y las otras a la fracción de citosol.

Heredia *et al*, (1998) reportaron que con la aplicación de un choque térmico de 50°C se inducían siete proteínas del estrés en *C. perfringens*, la mayoría de estas fueron encontradas en la membrana y una pequeña cantidad en el citoplasma.

Termotolerancia

A las proteínas del estrés se les ha involucrado con varios procesos fisiológicos entre los que se encuentran, la termotolerancia, la cual se define como la capacidad de resistencia de las células a una temperatura letal debido a la exposición previa de estas células a un tratamiento térmico (Morimoto, R.I., *et al*, 1990).

En 1990, Bunning reportó que el fenómeno de adquisición de termotolerancia era influenciado en gran parte por las proteínas del estrés térmico ya que se había demostrado que durante el período de desarrollo de termotolerancia esta llega a un punto máximo al mismo tiempo que ocurre con estas proteínas, lo que sugirió que una ó más de las PET eran responsables de proteger a la célula contra el calor. Sin embargo, se ha demostrado que la termotolerancia puede desarrollarse en ausencia de la síntesis de estas proteínas y ser inducida por otro tipo de sustancias como por ejemplo, los glucocorticoides (Morimoto, R.I., *et al*, 1990).

Al menos cuatro familias de proteínas del estrés han sido asociadas con la adquisición de termotolerancia (la PET 104, PET 70, PET 60 y las PET de bajo peso molecular). Sin embargo, la más asociada con este fenómeno ha sido la PET 70,

puesto que se ha encontrado de manera conservada actuando como la principal responsable de la termotolerancia en diversos organismos (Sanders, B., 1993).

Así la adquisición de termotolerancia se ha buscado y encontrado en una gran variedad de organismos incluyendo los organismos hipertermofílicos del grupo arquea (Trent, J., 1996) así como en bacterias y eucariotes (Zeilstra, J., 1991; Sanders, B., 1993).

Durante el procesamiento de los alimentos, las bacterias son comúnmente sometidas a diferentes temperaturas, por lo tanto, esta condición es un factor crítico. Así que es muy importante determinar la respuesta al choque térmico y la termotolerancia de las bacterias consideradas como patógenos en alimentos, puesto que muchos de éstos son procesados térmicamente para asegurar su calidad (Kalpana, S., 1996; Jorgensen, F., 1996; Bunning, K., 1990).

La inducción de termotolerancia por la expresión de PET ha sido demostrada por Mackey (1987) en *Salmonella thompson* cuando resistió el calentamiento a 54°C y 60°C en medio de cultivo de laboratorio y en carnes, sólo si las células eran mantenidas a 48°C por 30 minutos.

La respuesta al estrés térmico y la termotolerancia, fue comparada en *Listeria monocytogenes* y *S. typhimurium* por Bunning *et al*, (1990) encontrando que cuando se sometían a temperaturas permisibles para su crecimiento a 35°C y eran subletalmente calentados a 42, 48 y 52°C por diferentes tiempos, solo se inducían incrementos significativos en la adquisición de termotolerancia en *S. typhimurium*, mientras que esta respuesta no fue observada por *L. monocytogenes* al ser sometidas a temperaturas normalmente letales de 57.8 ó 52°C.

Jorgensen *et al*, (1996) demostraron la adquisición de termotolerancia a 58°C en *L. monocytogenes* cuando las células fueron sometidas a diferentes temperaturas y tiempos de choque, concluyendo que existía poca correlación entre la pérdida de termotolerancia después del choque térmico y los niveles de concentración de estas proteínas.

La resistencia de células de *Escherichia coli* a temperaturas de 55°C mediante una exposición previa a 42°C fue observada por Yamamori (1978). Esta termotolerancia alcanzó un máximo a los 30 min y desapareció por completo a los 60 min. Sin embargo, no encontró asociación entre esta resistencia al calor con las PET. Sugiriendo que este comportamiento estuvo relacionado con efectos secundarios de la respuesta al estrés.

Se demostró que cuando *Yersinia enterocolitica* era sometida a una temperatura de 45°C durante 60 min, resultaba en un incremento en la supervivencia de las células a un subsecuente tratamiento de 55 ó 60 °C en medio de infusión cerebro corazón y en carne molida. Se determinó que las PET más relacionadas con este proceso fueron dos, con pesos moleculares de 70.5 y 58 KDa (Kalpana, S., 1996).

Hritz (1992), mencionó que cuando células de *Staphylococcus aureus* eran sometidas a condiciones de estrés a 37°C durante 30 min y posteriormente llevadas a una temperatura de 55°C, las células eran más resistentes a esta temperatura que aquellas células no sometidas al estrés térmico previo. Con esto ellos concluyeron que las PET jugaban un papel crucial en la adquisición de termotolerancia en la bacteria.

En bacterias esporuladas, también se ha demostrado la adquisición de termotolerancia. Sin embargo, las rutas de adquisición de termotolerancia en esporas y

células vegetativas son diferentes por la presencia de diversas PET (Condón, S., 1996).

Recientemente Heredia *et al*, (1997) reportaron que cuando era aplicado un estrés térmico subletal de 50°C por 30 min a *C. perfringens* se producía una marcada adquisición de termotolerancia, aumentando la resistencia al calor de 2 a 8 veces; además la duración de la termotolerancia adquirida era de al menos 2 h posteriores a la aplicación del estrés térmico subletal.

Sobrenadantes de células estresadas

Se ha demostrado que el efecto de factores adversos sobre células microbianas favorecía la presencia de una gran variedad de componentes celulares como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, lipopolisacáridos, etc. en el medio extracelular, y que la liberación de estos componentes intracelulares eran capaces de proporcionar una respuesta de adaptación como mecanismo de protección a condiciones ambientales extremas. Roschina y Petrov en 1997, determinaron que células de *E. coli* sometidas a condiciones de estrés térmico ó de almacenamiento, liberaron proteína al medio extracelular como respuesta a un proceso adaptativo no específico, ya que durante la liberación de esta proteína la viabilidad de las células fue mantenida a un nivel constante. Sin embargo, cuando la concentración de proteína alcanzaba un valor estacionario, las células morían exponencialmente.

Recientemente se reportó que cuando las células de *E. coli* eran expuestas a un estrés térmico (48°C), frío (5-15°C), oxidativo (N-ethylmaleimida) o por tetraciclina, se inducía la secreción de compuestos no identificados en el medio. Estos compuestos

eran capaces de proteger a *E. coli* contra el mismo ó diferentes tipos de estrés (Nikolaev, Y.A., 1997).

Tomando como base los antecedentes anteriores, y sabiendo la importancia de *C. perfringens* como microorganismo causante de enfermedades, que es capaz de producir una respuesta al estrés y que como resultado de esta puede adquirir termotolerancia, consideramos de interés el estudio de la inducción de tolerancia al calor por metabolitos liberados al medio de cultivo. Las repercusiones de nuestro trabajo, pudieran ser de gran interés para ayudar a entender la patogénesis de este microorganismo.

HIPÓTESIS

Las células de *Clostridium perfringens* sometidas a un choque térmico liberan metabolitos en el sobrenadante que originan la adquisición de termotolerancia en células no expuestas a este tratamiento.

OBJETIVO

Establecer si sobrenadantes de células estresadas tienen capacidad de proteger a otras células a temperaturas letales.

MATERIAL Y MÉTODOS

ACTIVACIÓN DE LA CEPA

Se utilizó la cepa enterotoxigénica de *C. perfringens* FD-1041 la cual fue proporcionada por el Dr. Stanley Harmon de la FDA E.U.A. Esta cepa se mantuvo como cultivo esporulado en medio de carne cocida (Difco) a -20° C.

A partir de nuestro cultivo de reserva, se tomó una alícuota de esta y se colocó en un tubo con 10 ml de caldo con tioglicolato (Difco). Posteriormente se realizó un choque térmico a 75°C/15 min. La cepa se enfrió a temperatura ambiente con agua de la llave y se incubó a 37°C por 14-16 h.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

A partir de la cepa activada se inocularon (al 1%) tubos de 13 x 100 mm conteniendo 5 ml de caldo con tioglicolato y se incubó a 37°C en un baño de agua. Cada h se tomaron lecturas espectrofotométricas y alícuotas para determinar la viabilidad celular por el método de difusión en placa.

Para esta última se realizaron diluciones decimales y se sembraron en cajas Petri a las que se les agregó medio nutritivo con agar. Las placas una vez solidificadas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de N₂ : CO₂ (95:5%) durante 24 h.

A partir de la curva de crecimiento se determinó el tiempo en el cual el cultivo llegó a la mitad de la fase logarítmica.

ENSAYOS CON SOBRENADANTES

Se inoculó (al 1%) la cepa activada en tubos de 18 x 150 mm con 10 ml de caldo con tioglicolato y se incubaron a 37°C en un baño de agua. Cuando los cultivos alcanzaron un crecimiento correspondiente a una absorbancia (600 nm), de 0.2 (al rededor de la mitad de la fase logarítmica) algunos de los cultivos fueron sometidos a un choque térmico de 50°C durante 30 min y otros permanecieron en incubación.

Después del tiempo de choque térmico, todos los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 min.

Los sobrenadantes de células sometidas al tratamiento y los de las células control fueron combinados. Tal como lo muestra la fig 1.

ENSAYOS DE TERMOTOLERANCIA

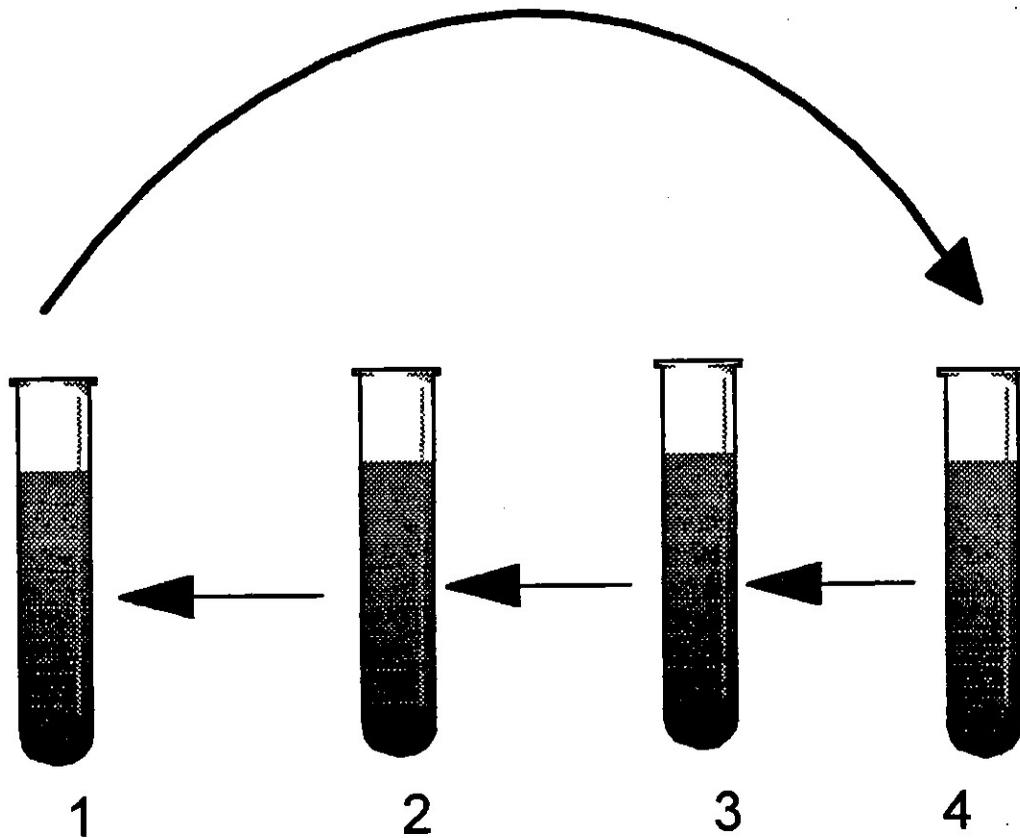
Las células de todos los tratamientos se colocaron en un baño de agua a 55°C. A los 0, 15, 30, 45 y 60 min se tomaron alícuotas de los tratamientos, se realizaron diluciones y se determinó la sobrevivencia de células mediante cuenta en placa por el método de difusión, utilizando el mismo medio nutritivo con agar. Las cajas Petri se incubaron en una atmósfera de N₂:CO₂ (95:5%) a 37°C durante 24 h.

Los resultados obtenidos se graficaron para obtener las curvas de sobrevivencia.

CALENTAMIENTO DE LOS SOBRENADANTES

Se procedió como en el caso anterior, solo que después del choque térmico, los cultivos fueron centrifugados 3000 rpm por 15 min. Posteriormente los sobrenadantes de células de todos los cultivos se sometieron a tratamientos térmicos de 65 y 100°C durante 15 min. Una vez concluído esto, los sobrenadantes se dejaron enfriar a temperatura ambiente y finalmente se procedió con la misma metodología anteriormente mencionada de ensayos de termotolerancia.

Fig. 1 Combinación de sobrenadantes y células.



TRATAMIENTO 1.- Células con choque + sobrenadante con choque (control positivo)

TRATAMIENTO 2.- Células con choque + sobrenadante sin choque

TRATAMIENTO 3.- Células sin choque + sobrenadante sin choque (control negativo)

TRATAMIENTO 4.- Células sin choque + sobrenadante con choque

RESULTADOS

Cuando probamos los sobrenadantes de células que habían sido sometidos a estrés, pudimos observar que las células fueron más tolerantes al calor en comparación con las células no sometidas a dicho tratamiento térmico (Fig 2).

Sin embargo, encontramos que la principal tolerancia al calor fue dada por las células estresadas. Aunque se eliminara el sobrenadante, estas conservaban la capacidad protectora a altas temperaturas.

Para tratar de determinar la naturaleza química del ó los componentes protectivos, los sobrenadantes se calentaron tanto a 65 como a 100°C.

Encontramos que cuando los sobrenadantes se calentaron a 65°C no se producía ninguna respuesta similar a la de los sobrenadantes que no se calentaron (Fig 3).

Una disminución en la tolerancia por efecto de los sobrenadantes estresados pudo ser observada cuando estos se calentaron a 100°C. Sin embargo, aún así las células siguieron siendo ligeramente más tolerantes que el control, al que no se agregó ningún sobrenadante sometido a estrés (Fig 4).

Todo esto nos puede sugerir que la naturaleza química del o los exometabolitos protectivos es peptídica.

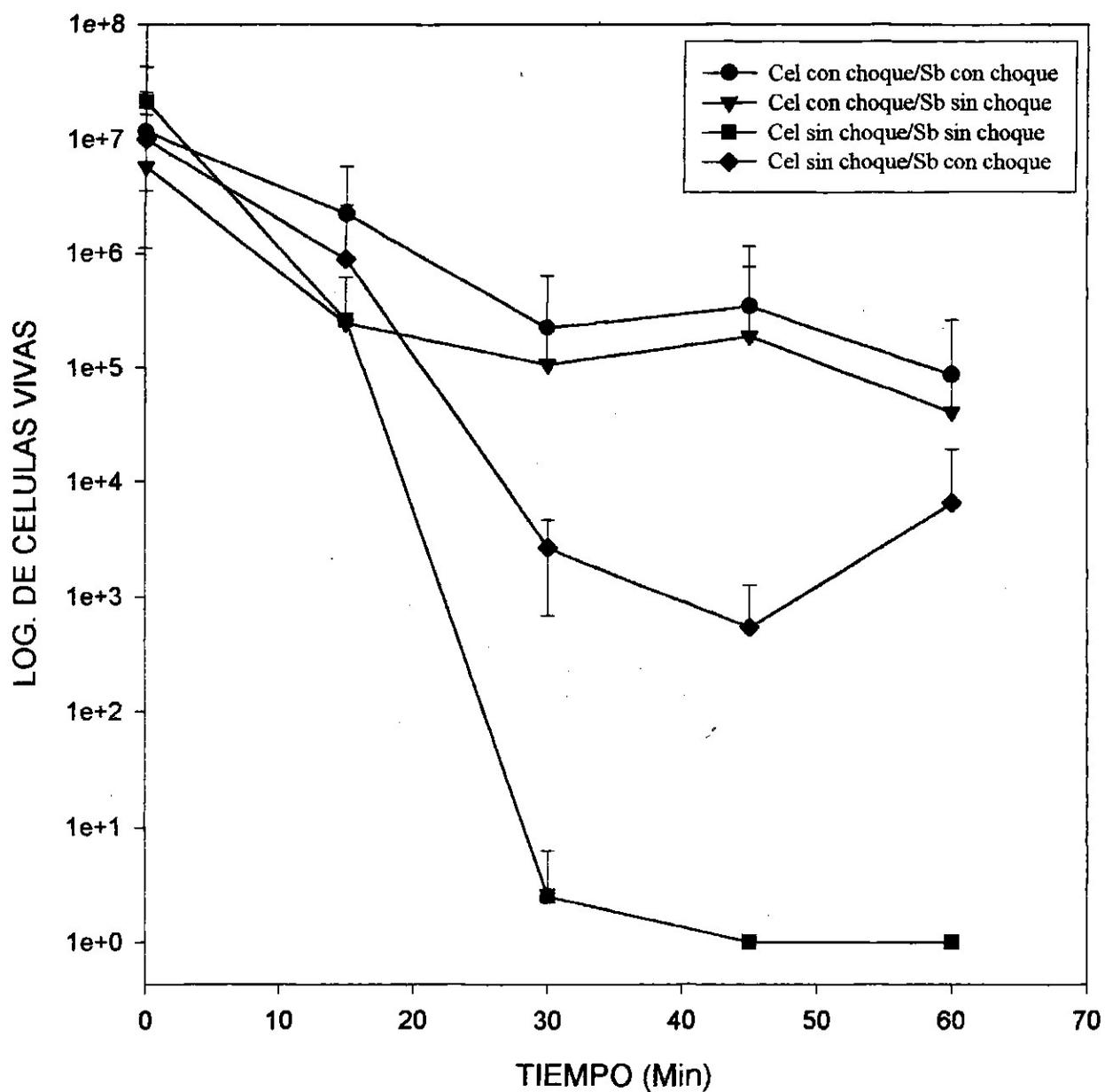


Fig 2. Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041. Los sobrenadantes fueron expuestos a diferentes tratamientos.

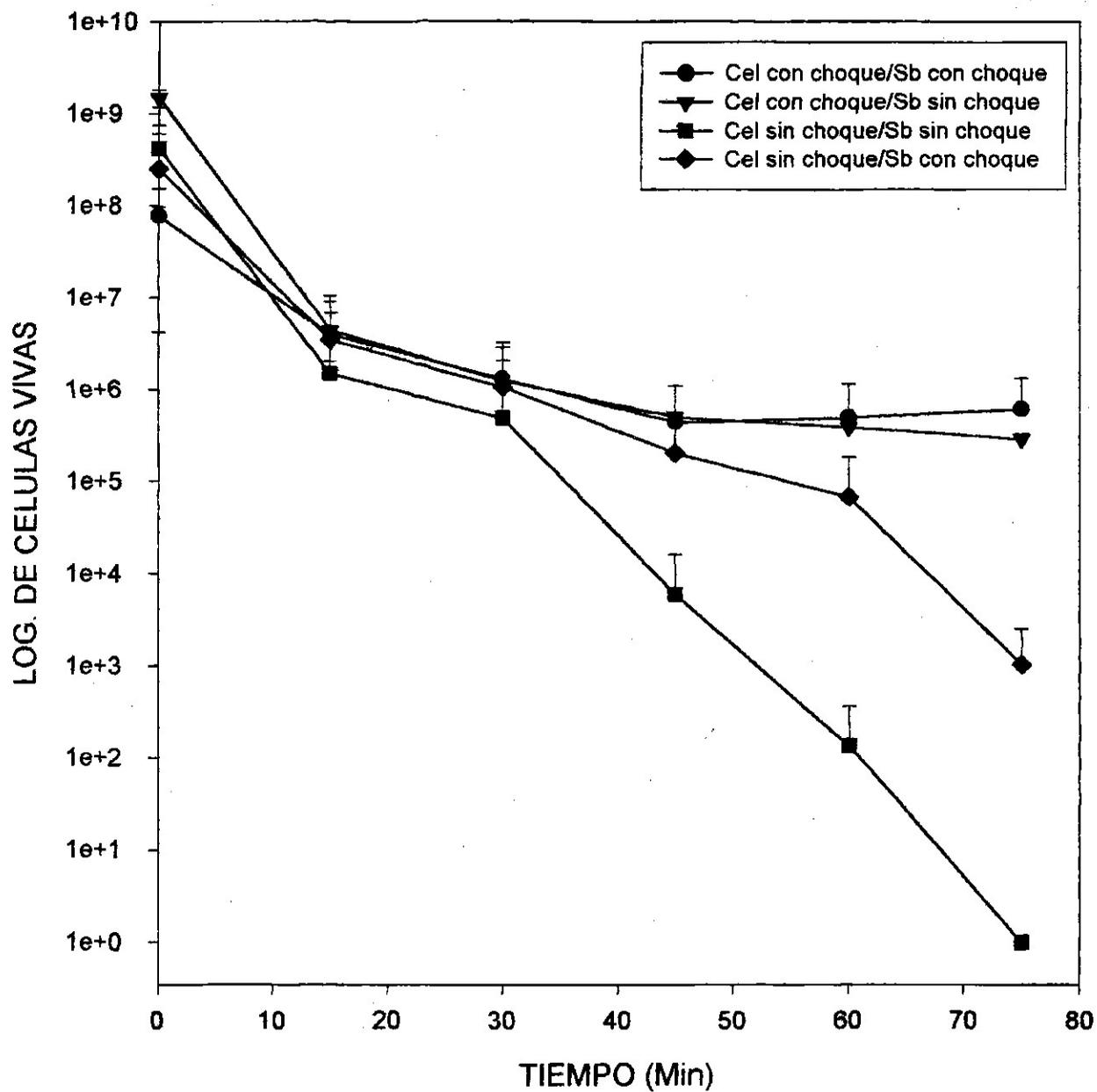


Fig 3. Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041.
 Los sobrenadantes fueron expuestos a 65°C

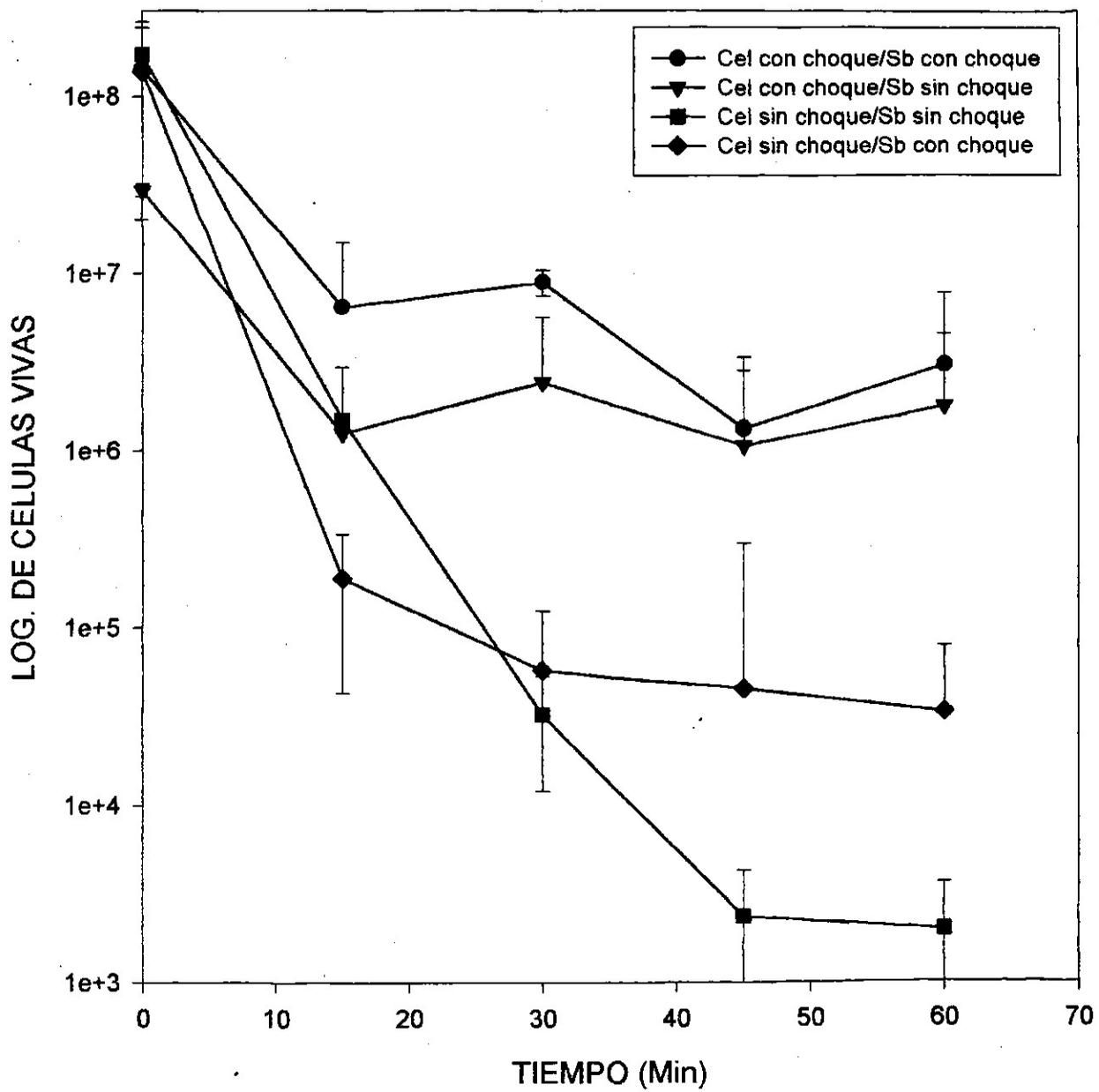


Fig 4. Curvas de muerte a 55°C de *C. perfringens* FD-1041
 Los sobrendantes fueron expuestos a 100°C

DISCUSIÓN

La inducción de proteínas del estrés mediante un tratamiento térmico ha sido la base de muchas investigaciones, debido a las implicaciones que tiene en la industria alimentaria.

En trabajos previos, se comprobó que la aplicación de un choque térmico de 50°C/30 min, en *C. perfringens* FD-1041 inducía la producción de proteínas del estrés específicas (Heredia N. L., *et al*, 1997). Se ha demostrado en otras bacterias que esas proteínas intervienen en funciones de protección de las células en su capacidad de sobrevivencia a temperaturas normalmente letales, desarrollándose el fenómeno de adquisición de termotolerancia (Hecker, M., 1996; Morimoto, R.I., *et al*, 1990). Además, se ha sugerido que esta respuesta en células vegetativas de *C. perfringens* estaban bajo la acción de 8 PET la mayoría de las cuales fueron localizadas en la envoltura celular (Heredia, N. L., *et al*, 1997).

Las curvas de muerte demostraron que la exposición de las células y sobrenadantes a las condiciones de choque (tratamiento 1), las hacía más tolerantes a la temperatura de 55°C en comparación con los otros tratamientos.

Cuando el sobrenadante fué calentado a 65 ó 100°C (Fig 3 y 4) no se observó diferencia en el comportamiento del tratamiento anterior, debido a que mantuvo la sobrevivencia máxima, por lo que podemos sugerir que esta tolerancia se presentó principalmente por las células sometidas al choque térmico, al igual que en el tratamiento 2 (células estresadas combinadas con un sobrenadante normal) en el cual

no se observó una marcada diferencia. Sin embargo, la sobrevivencia de estas células fué levemente menor. Este comportamiento podría estar dado por el o los metabolitos presentes en el sobrenadante.

Con respecto a las células y sobrenadantes de *C. perfringens* que no fueron sometidos al choque térmico (tratamiento 3), la sobrevivencia de las células disminuía drásticamente al someterlas a temperaturas letales en los primeros min en todos los experimentos.

Los resultados demostraron que en el tratamiento 4, cuando las células fueron sometidas a las condiciones de estrés y el sobrenadante fué combinado con células normales, estas ofrecieron cierta resistencia a la temperatura letal de 55°C, puesto que la sobrevivencia de las células fué mayor que la del tratamiento 3. Sin embargo, no presentó la misma resistencia observada por las células y sobrenadantes sometidos al tratamiento térmico. Esto nos pudiera indicar la presencia de componente(s) presente(s) en el sobrenadante que pudieran ser los responsables de dicha termoprotección, puesto que el número de componentes involucrados podrían variar en número y naturaleza química, los cuales pudieran depender de las condiciones de estrés (Roschina, E.K., 1997).

Investigaciones anteriores mencionaron que estos metabolitos tenían una composición similar a una gran cantidad de compuestos celulares tales como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos. Se creía que su liberación estaba asociada con un daño en la pared celular ó con la lisis de una porción de la población de células bajo la acción de algún factor de estrés. Sin embargo, Melekhov (1983) mencionó que la liberación de componentes intracelulares

era una respuesta adaptativa de la célula a condiciones extremas del medio ambiente la cual pudiera ayudar a su sobrevivencia.

Se demostró que cuando las células vegetativas de *C. perfringens* eran sujetas a un choque térmico (50°/30 min) a la mitad de la fase logarítmica se adquiría tolerancia al calor, al menos durante 2 h (Heredia, N.L., *et al* 1997). Sin embargo, es importante considerar la intensidad y duración del estrés, ya que para que los exometabolitos desempeñaran un papel protector debería ocurrir un tiempo no muy corto para que estos metabolitos tuvieran oportunidad de ser liberados a fin de ejercer su efecto sobre las células normales (Nikolaev, Y.A., 1997).

El mecanismo de liberación de los metabolitos al medio no está claro, sin embargo, Nikolaev (1997) mencionó que la inducción de un estrés influía en el efecto protector de estos exometabolitos que pudieran ser sintetizadas con la participación de enzimas preformadas, o bien ser acumuladas anteriormente y liberados al medio por procesos de transporte activo bajo la estimulación del estrés.

Se ha sugerido que los diferentes tipos de estrés, son capaces de inducir la formación de distintos grupos de exometabolitos protectivos (Nikolaev, Y. A., 1997). En este trabajo consideramos que el o los metabolitos liberados al medio pudieran ser de naturaleza proteica.

La precipitación de las proteínas del medio celular está sujeta a una variedad de condiciones y procesos que pueden conducir a la pérdida de actividad ó alteración de la estructura mediante procesos físicos ó químicos (Murray, P. 1990). Sin embargo, la desnaturalización de proteínas por calor, puede ser descrito como un proceso de primer orden, puesto que inducen rupturas de puentes de diferente naturaleza y se

presenta un marcado cambio conformacional (Scopes, R.K., 1988), lo que trae como consecuencia una pérdida de la actividad termoprotectora del sobrenadante.

En este experimento se expusieron a dos diferentes temperaturas de calentamiento inicialmente 65°C (Scheif, R. 1981) y posteriormente a una mayor de 100°C, ya que péptidos ó algunas proteínas termoestables pudieran no ser totalmente inactivados a la primera condición (Deutscher, M. P., 1990).

Además, es importante considerar la presencia de proteasas en el sobrenadante debido a que durante cortos intervalos de calentamiento y altas temperaturas, estas aún pueden ser estables al calor degradando la proteína de interés y disminuyendo la actividad del sobrenadante (Deutscher, M. P., 1990; Scopes, P. K., 1988).

Con respecto a lo anterior, los resultados obtenidos demostraron que a 65°C la actividad del sobrenadante del tratamiento 4 no presentó diferencias importantes en su termoprotección en comparación con los experimentos previos, sin embargo, a 100°C la actividad del sobrenadante se perdió. Con lo cual se sugiere que el o los responsables de esta capacidad protectora son de naturaleza proteica, pero debido a que aún proporcionan resistencia a esta temperatura, presumiblemente se trate de péptidos con una mayor capacidad termoestable.

CONCLUSIONES

- 1) El sobrenadante de células estresadas por un choque térmico de 50°C por 30 min, provocó una mayor tolerancia a 55°C de células no estresadas.
- 2) Dicha termotolerancia adquirida fué menor que la encontrada por las células tratadas con un choque térmico, aunque se eliminara su sobrenadante.
- 3) Cuando el sobrenadante de células estresadas se somete a calentamiento (65 ó 100°C) la capacidad termoprotectora se ve disminuída, por lo que podemos sugerir que el/los metabolitos involucrados en esa termoprotección son de naturaleza proteica.

LITERATURA CITADA

- Archer, D. L.** 1996. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptative mutations. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 91-95.
- Bery, G. R., W. E. Inniss and J. J. Heikkila.** 1987. Stress proteins and thermotolerance in psychrotrophic yeasts from arctic environment. *Can. J. Microbiol.* 33: 383-389.
- Bezirtzoglou, E., A. Panagiou, I. Savvaidais and V. Maipa.** 1997. Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. *Anaerobe.* 3(2-3):169-172.
- Brett, M.M.** 1994. Outbreaks of food-poisoning associated with lecithinase-negative *Clostridium perfringens*. *J. Med. Microbiol.* 41:405-407.
- Bryan, F. L.** 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *J. Food Prot.* 43(2) 140-150.
- Bukau, B.** 1993. Regulation of *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.* 9(4): 671-680.
- Bunning, K., R. G. Crawford, J. T. Tierney and J. T. Peeler.** 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal Heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10):3216-3219.

Condón, S., A. Palop, J. Raso and F. J. Sala. 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 149-152.

Conway de Macario, E. and A. J. Macario. 1994. Heat-shock response in Archae. Tib. Tech. 12: 512-518.

Decaudin, M. and J. Tholozan. 1996. A comparative study on the conditions of growth and sporulation of three strains of *Clostridium perfringens* type A. Can. J. Microbiol. 42: 298-304.

Deutscher, M. P. 1990. Guide to protein purification. Methods in Enzimology. By Academic Press Inc.182:84.

Deyrick, O. D. and R. James. 1991. Identification of a gene , closely linked to dna K, wich is required for high-temperature growth of *Escherichia coli*. J. Microbiol. 131: 1271-1277.

Eley, A.R. 1996. Microbial food poisoning. 2a. edition. Published by Shapman & Hall, London. pp 1-7.

Georgopulos, C. 1992. The emergence of chaperone machines. Trens in Biochem. Sci. 17: 295-199.

Griffiths, N.J., J.R. Walton and G.B. Edwards. 1997. An Investigation of prevalence of the toxigenic types of *Clostridium perfringens* in horses with anterior enteritis: preliminary results. Anaerobe 3(2):121-125.

Gross, C.A., D. B. Straus, J. W. Erickson and T. Yura. 1990. The function and regulation of HSP in *E. coli* IN Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Geougopoulos. (Ed) Stress proteins in biology and medicine. Cold. Harbor. Lab. Press. pp 167-181.

Gupta, R.S. 1995. Evolution of chaperonin families (Hsp 60, Hsp 10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukariotic cells. *Mol. Microbiol.* 15(1):1-11.

Guzmán, A.M., B. Micalizzi, C.T. Pagano and D.F. Giménez. 1989. Incidence of *Clostridium perfringens* in fresh Sausages in Argentina. Research Note. Cátedra of Bacteriología and Laboratorio de Alimentos, Universidad de San Luis, Argentina.

Hartl, F.U. and J. Martin. 1992. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp 70 and Hsp 60. *Annu. Rev. Biophys Biomol. Struct.* 21: 293-322.

Hayes, P.R. 1992. Food Microbiology and hygiene. 2a. edition. Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 40-44.

Hecker, M., W. Scumann and U. Völker. 1996. Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19(3): 417-428.

Heredia, N.L., R. G. Labbé and J. S. García. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* Type A following heat shock. *J. Food Prot.* 61(2): 1143-1147.

Heredia, N.L., G. A. García, R. Luévanos, R. G. Labbé and J. S. García-Alvarado. 1997. Elevation of heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sublethal heat shock. *J. Food Prot.* 60: 998-1000.

Hobbs, B. D., M. E. Smith, C. L. Oakley, G. H. Warrack and J. C. Cruickshank. 1973. *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.* 51:75-101.

Hritz, M., C. A. Bortner, and M. W. Qoronfleh. 1992. Are heat shock proteins (hsp) involved in thermotolerance in *Staphylococcus aureus*. Phila. Col. Osteopathic Ned., Philadelphia, PA.

Jäättelä, M and D. Wissing. 1992. Emerging role of heat shock proteins in Biology and Medicine. *Ann. Med.* 24:249-258.

Jindal, S. 1996. Heat shock proteins: applications in health and disease. *Tib. Tech.* 14: 17-20.

Jorgensen, F., B. Panaretou, P. S. Stephens and S. Knochel. 1996. Effect of pre- and post- heat shock temperature on the persistence of thermotolerance and heat shock -induced proteins in *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 216-224.

Kalpana, S. and E. A. Murano. 1996. Effect of Heat Shock on the thermotolerance and protein composition of *Yersinia enterocolitica* in Brain Heart Infusion Broth and Ground Pork. *J. Food Prot.* 59(4): 360-364.

Khoury, P. H., M. W. Qoronfleh, U. N. Streips, and R. A. Slepecky. 1990. Altered Heat resistance in spores and vegetative cells of a mutant from *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 21: 249-253.

Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane. 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin. The clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. E 1240 Biomedica Science Tower. Academic Press Department of Molecular genetics and Biochemistry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15261, USA.

Kurtz, S., J. Rossi, L. Petko and S. Lindquist. 1986. An Ancient Developmental Induction: Heat-Shock Proteins Induced in Sporulation and Oogenesis. *Science.* 231:1154-1159.

Labbé, R. 1988. *Clostridium perfringens*. Food Tech. pp. 195-196.

Labbé, R.G. 1989 *Clostridium perfringens*. IN Doyle M.P. (Ed) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker Inc. New York. p.p.198-205.

Lathigra, R.B., P. D. Butcher, T. R. Garbe and D. B. Yung. 1991. Heat shock proteins as virulence factors of pathogens. Current topics in Microbiology and Immunology. 167: 125-143.

Lopes, G. S., M. H. Juliani, J. C. Maia and A. M. Silva. 1986. Heat Shock Proteins synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 168(2): 923-930.

Mackey, B M. and Ch. M. Derrick. 1987. The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. Lett. Appl. Microbiol. 5: 115-118.

McClane, B. A. 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Toxicon. 34(11/12): 1335-1343.

McDonel, J.L. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E, p. 477-517. IN Dorner, F. and H. Drews (Ed), *Pharmacology of bacterial toxins*. Pergamon Press, Oxford.

Meer, R.R., J. G. Songer, and D.L. Park. 1996. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 150: 75-94.

Meer, R.R. and J. G. Songer.1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. AJVR 58:7 pp 702-705.

Anónimo. 1996. Surveillance for Foodborne-Disease outbreaks United States, 1988-1992. U.S. Department of Health and human Services.

Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Geougopoulos. 1990. The stress response function of the protein and perspectives. IN Morimoto R.I., Tessieres A. and Geougopoulos C. (Ed) Stress Proteins in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 11724 U.S.A. p.p. 1-36.

Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Geougopoulos. 1990. Stress Proteins in Biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York 11724. p.p.2-11.

Neidhardt, F. and R. Bogelen. 1987. Heat shock response. IN: Neidhardt F, Ingraham, J, Magasanik B, Low B, Schaechter M, & Umbarger H (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and Molecular Biology, Washington, D.C. American Society for Microbiology. Vol 2 (pp 1334-1345).

Nenh-Jen S. and R. G. Labbe. 1996. Sporulation-Promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. ASM. 62(4):1441-1443.

Nikolaev, Y. A. 1997. Involvement of exometabolites in stress adaptation of *E. coli*. Microbiol. 66 (1): 28-31.

Qoronfleh, M. W. and U.N. Streips. 1987. Initial subcellular localization of heat shock proteins in *B. subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 43: 373-377.

Qoronfleh, M. H., U. N. Streips and B. J. Wilkinson.1990. Basic features of the Staphylococcal heat shock response. Antoine Van Leeuwenhoek. 58:79-86.

Roschina, E. K. and L. N. Petrov. 1997. Excretion of protein into Extracellular medium as Nonspecific Response of *Escherichia coli* to stress. Microbiol. 66: 146-150.

Ryu, S. and R. G. Labbe. 1989. Coat and enterotoxin-related proteins in *Clostridium perfringens* spores. J. Microbiol. 135:3109-3118.

Sanders, B. 1993. Stress proteins in Aquatic organisms: An environmental Perspective. *Rev. Toxicol.* 23(1): 49-75.

Schleif, R. F. and P. C., Wensink. 1981. *Practical Methods in Molecular Biology*. 5a. edition. Springer-Verlag New York inc. Heidelberg Berlin. pág. 107

Schlesinger, M. J. 1988. Function of Heat Shock Proteins. *ISI Atlas of Science Biochem.* pp.161-164.

Scopes, R. K. 1988. *Protein Purification. Principles and Practice*. Second edition. Springer-Verlog New York Inc.

Songer, J.G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microb. Rev.* 9(2): 216-234.

Streips, U. and F.W. Polio. 1985. Heat shock proteins in Bacilli. *J. Bacteriol.* 162(1): 434-437.

Todd, J. A, T. J. Hubbard, A. Travers and D. J. Ellar. 1985. Heat shock proteins during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS.* 188(2): 209-214.

Todd, E. C. 1988. Preliminary Estimates of costs of Foodborne Disease in the United States. *J. Food Prot.* 52(8): 595-601.

Trent, J. D. 1996. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archea. *FEMS Microbiol. Rev.* 18:249-258.

Vishnu, Ch., T. Flynn, W. Niehaus and B. Wong. 1996. tress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* 142: 937-943.

Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Völker, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker. 1994. Analysis of induction of general stress proteins of *B. subtilis*. Microbiol. 140: 741-752.

Xylouri, E., C. Papadopoulou, G. Antoniadis and E. Stoforos. 1997. Rapid Identification of *Clostridium perfringens* in animal feedstuffs. Anaerobe. 3(2-3):191-193.

Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura and T. Yura. 1978. Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. J. Bacteriol. 134:1133-1140.

Yoo, H.S., S.U. Lee, K.Y. Park and Y.H. Park. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 35(1): 228-232.

Young, D.B. 1992. Heat Shock proteins: immunity and autoimmunity. Current Opinion in Immunology. 4:396-400.

Yura, T., H. Naguri and H. Mori. 1993. Regulation of the heat shock response in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 47: 321-350.

Zeilstra-Ryalls J., O. Fayet and C. Georgopoulos. 1991. The universally conserved Gro E (Hsp 60) chaperonins. Ann.Rev. Microbiol. 45: 301-325.

