

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



EFFECTO DE SUSTANCIAS GENERALMENTE RECONOCIDAS COMO SEGURAS  
(G.R.A.S.) Y MEZCLAS DE ELLAS SOBRE LA ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA  
A BAJAS TEMPERATURAS EN *Clostridium perfringens*.

Por

Q.B.P. JULIO CÉSAR LIMÓN GUTIÉRREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología.

Octubre, 2005

EFFECTO DE SUSTANCIAS GENERALMENTE RECONOCIDAS COMO SEGURAS  
(G.R.A.S.) Y MEZCLAS DE ELLAS SOBRE LA ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA  
A BAJAS TEMPERATURAS EN *Clostridium perfringens*.

Aprobación de la Tesis:

---

Director de Tesis: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

---

Secretario: M.C. Luisa Yolanda Solís Soto

---

Vocal: Dr. José Santos Alvarado García

---

Subdirector de Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo que me brindó al otorgarme la beca número 177423 para realizar mis estudios de maestría.

De igual manera agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León que a través del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), Convocatoria 2003, respaldó con el proyecto de investigación SA-1001-04 titulado “Efecto de sustancias generalmente reconocidas como seguras (G.R.A.S.) sobre la adquisición de tolerancia a diferentes tipos de estrés en *Clostridium perfringens*”, el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco profundamente a la Dra. Norma L. Heredia y al Dr. José Santos García, quienes siempre me han recibido y me brindaron su aceptación y apoyo para realizar la presente investigación en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos a su cargo.

Agradezco a la M.E.S. Marta Santoyo, por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

Agradezco también al Dr. Jozsef Baranyi, quien con su asesoría me ayudo a interpretar los resultados obtenidos durante esta investigación.

Una mención especial de agradecimiento a mis compañeros y maestros de laboratorio, Q.F.B. Fabiola Venegas, M.C. Eduardo Sánchez, M.C. Luisa Y. Solís, Biol. Esteban Maldonado, Israel Reyes, Suleida Guerrero, Brenda del Ángel Torres, Ángela Aguilar, Q.F.B. Alejandra Morales, Carolina Arellano, Rocío, Sagrario, Rodolfo, Berenice Valles, M.C. Guadalupe Rojas Q.B.P. Sandra Castillo, quienes en mayor o menor grado compartieron conmigo esta etapa de estudios y trabajo en el laboratorio y han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

## **DEDICATORIA**

Para ti, Fabiola, amor mío, te has convertido en el mayor descubrimiento en esta etapa de mi vida, y ahora juntos estamos iniciando la aventura más grande.

Para mis padres, Luis Limón y Catalina Gutiérrez, quienes siempre me han demostrado su amor y han sido el mejor ejemplo en mi vida.

Para mis hermanos, José Luis, Adriana y Juana María, por todo su amor y apoyo que me han brindado.

Para mis cuñados, Guadalupe Zavala y Gabriel Martínez, quienes me han brindado su amistad sincera.

Para mis sobrinos, Karen Arely, Axel, Alexis, Carolina, Ileana Catalina y Arturo, fuente de amor y alegría en mi familia.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS . . . . .	III
DEDICATORIA . . . . .	IV
TABLA DE CONTENIDO . . . . .	V
LISTA DE TABLAS . . . . .	VI
LISTA DE FIGURAS . . . . .	VII
LISTA DE SÍMBOLOS . . . . .	XI
RESÚMEN . . . . .	1
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	2
2. ANTECEDENTES . . . . .	5
3. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN . . . . .	16
4. HIPOTESIS . . . . .	17
5. OBJETIVOS . . . . .	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	20
7. RESULTADOS . . . . .	27
8. DISCUSIÓN . . . . .	48
9. CONCLUSIONES . . . . .	51
ANEXO 1 . . . . .	52
LITERATURA CITADA . . . . .	62

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentraciones empleadas de las diferentes sustancias G.R.A.S. para estudiar el efecto sobre la adquisición de tolerancia al frío en <i>Clostridium perfringens</i> . . . . .	.24
2. Dosis empleadas de las diversas sustancias G.R.A.S. para determinar la concentración mínima inhibitoria sobre <i>Clostridium perfringens</i> .. . . .	.27
3. Valores de muerte a 10°C (D <sub>10</sub> ) y tiempo para incrementar en 1 log las UFC/mL (Crecimiento) de <i>C. perfringens</i> expuesto a diferentes sustancias G.R.A.S. y mezclas de ellas. Los cultivos fueron expuestos a un prechoque subletal de 28°C/60 min en algunos tratamientos (CH-F). Control (-) = NO tolerancia a 10°C, Control (+) Tolerancia a 10°C.. . . .	.32

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Benzoato de sodio 0.15%. . . . .	34
2. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Sorbato de potasio 0.2%. . . . .	35
3. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	36
4. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	37
5. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15% y Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	38
6. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2% y Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	39
7. Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15% y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	40

<b>Figura</b>	<b>LISTA DE FIGURAS, continúa...</b>	<b>Página</b>
8.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2% y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	41
9.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	42
10.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125% y Sorbato de potasio 0.05%. . . . .	43
11.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05% y Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	44
12.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05% y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	45
13.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	46
14.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	47
15.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075% y Sorbato de potasio 0.1%. . . . .	53



<b>Figura</b>	<b>LISTA DE FIGURAS, continúa...</b>	<b>Página</b>
16.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375% y Sorbato de potasio 0.15%. . . . .	54
17.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1% y Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	55
18.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15% y Nitrito de sodio 180 ppm. . . . .	56
19.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1% y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	57
20.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15% y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	58
21.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	59
22.	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	60

<b>Figura</b>	<b>LISTA DE FIGURAS, continúa...</b>	<b>Página</b>
<b>23.</b>	Curvas de sobrevivencia de <i>Clostridium perfringens</i> al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%. . . . .	61

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo(s)
h	Hora(s)
min	Minuto(s)
L	Litro (s)
mL	Mililitro(s)
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
g	Gramo(s)
Abs	Absorbancia
nm	Nanómetro(s)
µL	Microlitro(s)
p/v	Peso/Volumen
G.R.A.S.	Generally recognized as safe

## RESUMEN

Julio César Limón Gutiérrez

Fecha de Graduación: Octubre, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Biológicas

**Título del estudio:** EFECTO DE SUSTANCIAS GENERALMENTE RECONOCIDAS COMO SEGURAS (G.R.A.S.) Y MEZCLAS DE ELLAS SOBRE LA ADQUISICION DE TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS EN *Clostridium perfringens*.

**Número de páginas:** 65

**Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología.**

**Área de Estudio:** Fisiología de los microorganismos.

**Propósito y Método del estudio:** La seguridad de los alimentos es una de las principales exigencias hoy en día. Uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos es *Clostridium perfringens*. Estudios previos demostraron que esta bacteria es capaz de adquirir tolerancia a bajas temperaturas. Algunos ingredientes en alimentos pueden afectar la respuesta de los microorganismos hacia el estrés recibido durante su procesamiento. Dentro de los ingredientes en alimentos encontramos los considerados como generalmente reconocidas como seguros (G.R.A.S.), que incluyen conservadores como benzoato de sodio, sorbato de potasio y nitrito de sodio y otros como glutamato monosódico. El propósito de nuestro estudio fue analizar si la presencia de las sustancias G.R.A.S. afectaba la capacidad de adquirir tolerancia a 10°C en *C. perfringens*, cepas FD1041 (enterotoxigénica) y FD1 (no enterotoxigénica). Las células fueron expuestas a las diferentes sustancias G.R.A.S., con o sin un tratamiento de un prechoque subletal a 28°C por 60 min. Se expusieron a la temperatura letal de 10°C hasta por 90 min. Se realizaron cuentas en placa para observar el comportamiento de la población bacteriana.

**Contribuciones y Conclusiones:** Las sustancias G.R.A.S. afectaron la capacidad de adquisición de tolerancia a 10°C en *C. perfringens* FD1 y FD1041. La exposición al choque subletal de 28°C fue un factor importante para la adquisición de tolerancia al frío. En 15 de 23 tratamientos se provocó la tolerancia a 10°C en *C. perfringens*, e incluso tendencia al crecimiento, al menos en una de las cepas estudiadas. En los 8 tratamientos restantes, solo se provocó la adquisición de tolerancia en al menos una de las cepas estudiadas sin promover crecimiento de la población bacteriana. Uno de los tratamientos provocó tolerancia a 10°C en la cepa *C. perfringens* FD1041, aun sin exposición al choque subletal. En 5 de los tratamientos se provocó la adquisición de tolerancia a 10°C en *C. perfringens* FD1 sin la exposición al choque subletal. Con esto se contribuye al entendimiento de la adaptación y sobrevivencia de los organismos patógenos en alimentos y nos permite tomar medidas adecuadas para su control.

**FIRMA DEL ASESOR** \_\_\_\_\_

## INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones actuales de mayor interés para el ser humano es el contar con productos alimenticios que, además de satisfacer sus requerimientos nutricionales, sean seguros y que puedan ser almacenados por un periodo de tiempo razonable sin perder su inocuidad, propiedades nutricionales y organolépticas.

Al existir una gran variedad de organismos deteriorantes, patógenos e inclusive sus toxinas, que pueden ser transmitidos por los alimentos, el ser humano ha desarrollado diversos métodos y técnicas tales como tratamientos térmicos, frío, empaques especiales, etc. e inclusive la adición de ciertos ingredientes para eliminar o inhibir a los microorganismos presentes en él.

Uno de los microorganismos patógenos importantes transmitido por alimentos es *Clostridium perfringens*, al cual, en un principio se le asoció con la gangrena gaseosa y posteriormente en la década de 1940's se relacionó con intoxicaciones alimentarias (Labbe y García, 2001).

*C. perfringens* es un bacilo gram positivo, anaerobio, formador de esporas, encapsulado e inmóvil, produce diversas proteínas biológicamente activas, algunas son enzimas y varias de ellas son tóxicas para el ser humano (Labbe y Garcia, 2001). Dentro de éstas se encuentra una enterotoxina (CPE), producida durante el proceso de esporulación y causante de la intoxicación alimentaria. Otra de las características importantes de este microorganismo es su tiempo de generación, el cual es el menor reportado hasta la fecha para bacterias, 7.1 minutos a 41°C, además de contar con un rango de temperatura de crecimiento de 15 a 50°C y un pH óptimo entre 6.0 y 7.0.

La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* se presenta usualmente de 8 a 12 horas después de la ingestión del alimento contaminado con un gran número de células vegetativas. Siendo los alimentos cárnicos los principales relacionados. Los síntomas que se presentan incluyen diarrea y dolor abdominal, siendo menos común la náusea, sin embargo, la muerte puede ocurrir en individuos debilitados, especialmente ancianos.

Los alimentos frecuentemente son sometidos a diferentes tratamientos, entre los que se encuentran cambios de temperatura, pH y propiedades osmóticas, con el fin de obtener un producto con mayor calidad e inocuidad, sin embargo, los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia que les pueden permitir su sobrevivencia a dichos tratamientos.

Actualmente se sabe que cuando un microorganismo es sometido a una condición adversa subletal inicia la síntesis de diversas proteínas, llamadas proteínas del estrés, a fin de protegerse y sobrevivir a las condiciones que normalmente serían letales para los microorganismos.

Diversos estudios han revelado que un microorganismo al ser sometido a un estrés en particular, como puede ser un choque por calor, aparte de conferir tolerancia al calor tiene la capacidad de conferir tolerancia o resistencia a otras condiciones diferentes, por ejemplo, bajas temperaturas; además, la exposición a otros factores tensionantes como acidez, anoxia, etanol, peróxido de hidrógeno y bajos niveles de glucosa pueden promover la respuesta de protección al estrés, conocida en la actualidad como respuesta cruzada al estrés.

Dentro de los recursos que el ser humano ha empleado en la elaboración de los alimentos está la adición de sustancias que después de su estudio y análisis se han reconocido como seguras y las ha designado como sustancias G.R.A.S. (en inglés Generally Recognized As Safe), siempre y cuando se empleen de acuerdo a las cantidades y forma de uso recomendadas (FDA).

Estas sustancias incluyen algunas que ayudan a controlar a los microorganismos presentes en los alimentos para evitar enfermedades, extender la vida de anaquel o conferir otras características favorables para el alimento. Clasificados como sustancias G.R.A.S. se reportan algunos conservadores empleados en alimentos, como el ácido benzoico, el ácido sórbico y las sales de ambos (Luck, 1990). Otra sustancia G.R.A.S. es el nitrito de sodio, empleado como agente curante para conservar e impartir un sabor característico a embutidos y carnes frías.

Como conservadores, estas sustancias deben añadirse a las concentraciones adecuadas que aseguren su acción efectiva para evitar el desarrollo de los microorganismos en el alimento, además, de que al nivel empleado no tengan un efecto adverso en el alimento o en el ser humano.

Teniendo conocimiento de que *C. perfringens* es una bacteria de gran importancia en salud pública, al ser causante de una toxi-infección alimentaria, de tener la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de estrés y así sobrevivir en alimentos y al hecho de que los agentes empleados como conservadores en alimentos no siempre matan a los microorganismos, se hace evidente estudiar el efecto de las sustancias G.R.A.S. sobre la adquisición de tolerancia en *C. perfringens* a diferentes tipos de estrés.

## ANTECEDENTES

### a) *Clostridium perfringens*

Esta bacteria perteneciente a la familia *Bacillaceae* y está ubicada en el género *Clostridium*, el cual es un grupo diverso de bacterias que crecen en ausencia de oxígeno y tienen la capacidad de formar endosporas; muchas de las bacterias pertenecientes a este género son patógenas para el ser humano y para los animales. Históricamente ha sido reconocido como el causante de la gangrena gaseosa. *C. perfringens* es un bacilo gram positivo, anaerobio, formador de esporas, encapsulado e inmóvil, y dentro del grupo clostridial es la especie más prolífica productora de toxinas, responsables estas de una gran variedad de enfermedades de importancia médica y veterinaria (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001).

Esta bacteria se ha clasificado en 5 tipos (A-E), basándose en la producción de toxinas extracelulares y enzimas hidrolíticas. Las enfermedades causadas por este microorganismo al transmitirse por alimentos se han asociado principalmente con *C. perfringens* tipo A (productor de enterotoxina), y aunque los tipos C y D también producen la enterotoxina, no se ha encontrado evidencia que los impliquen en enfermedades transmitidas por alimentos (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001, McClane, B.A., 1997).

Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos producidas por *C. perfringens* tenemos a la enteritis necrótica (pig-bel), la cual es raro encontrarla y la intoxicación producida por la producción de la enterotoxina (*Clostridium perfringens* enterotoxin o CPE), la cual es producida durante el proceso de esporulación del microorganismo (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001).



La asociación de *C. perfringens* con enfermedades transmitidas por alimentos fue propuesta hace más de 100 años, pero fue confirmada en las décadas de 1960 y 1970. Las características de esta bacteria que le permiten ser uno de los principales agentes patógenos transmitidos por alimentos son su amplia distribución en la naturaleza (suelo, aire, agua y alimentos), la formación de esporas termoresistentes que le permiten sobrevivir el cocimiento o la esterilización inadecuada, su capacidad de reproducirse rápidamente (7.1 min en condiciones ideales), y como ya se mencionó, la producción de una enterotoxina activa intestinalmente (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001).

Otras características de crecimiento de *C. perfringens* es su amplio rango de temperatura de crecimiento (15-50°C), teniendo una temperatura óptima de 42°C y pH óptimo de 6.0-7.0 (McClane, B.A., 1997).

La enfermedad gastrointestinal causada por la enterotoxina de *C. perfringens* se manifiesta principalmente por diarrea y dolores abdominales, esta enterotoxina es producida intracelularmente en el intestino durante el proceso de esporulación de la bacteria y es liberada junto con la spora madura. La enfermedad aparece después de 8 a 24 h de ingerido el alimento contaminado con un número elevado de células vegetativas ( $>10^5$  UFC/g). No se ha demostrado plenamente que ingerir la toxina de forma directa cause la enfermedad, ya que la cantidad requerida de células para esto sería tan grande que el alimento no estaría en condiciones de ser consumido (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001, McClane, B.A., 1997).

Aparte de la diarrea y los dolores abdominales, que son los síntomas principales pudiera presentarse náusea ocasionalmente, la fiebre y el vómito no son comunes. La muerte es rara, pero ha ocurrido en personas debilitadas, particularmente en ancianos (Heredia, N.L. and R.G. Labbé, 2001).

## **b) Respuesta al estrés**

Como ya se conoce, los organismos están diseñados para funcionar óptimamente en su medio ambiente normal. Cualquier cambio extremo del nivel óptimo en las condiciones ambientales va a provocar un estrés en el organismo y dependiendo del nivel del cambio el organismo puede morir, detener su crecimiento o tener una fase de retardo de crecimiento aumentada y menor desarrollo (Beales, N., 2004).

Se ha establecido que esta capacidad para sobrevivir en condiciones desfavorables es medida por la inducción de la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés. Diversos investigadores han demostrado la producción de estas proteínas en una gran cantidad de organismos, procariotes y eucariotes, después de la exposición de los microorganismos a condiciones desfavorables (Jones, P.G. *et al.* 1987; Schlesinger, M.J., 1988; Morimoto, R.I. *et al.*, 1990).

Los primeros estudios de esta respuesta fueron realizados aplicando a las células un choque térmico y se encontró que era una respuesta universal y altamente conservada evolutivamente.

En *Escherichia coli* se ha encontrado la síntesis de diversas proteínas como respuesta a un choque térmico de 37°C a 42°C. De ellas las primeras caracterizadas fueron la proteína DnaK de la familia PCHT 70 y la proteína GroEL de la familia PCHT 60 (Morimoto, R.I. *et al.* 1990, Jaatela, M. and D. Wissing 1992). En tanto que en *Mycobacterium bovis*, se ha reportado que la respuesta al choque térmico estimulaba la producción de proteínas homólogas a la DnaK, DnaJ y GroEL de *E. coli* (Patel, B.K. *et al.* 1991).

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

1994 observaron que *Pasteurella multocida* también sintetizó proteínas del choque térmico al ser tratada a 42°C, no así cuando fue sometida a 30°C.

A medida que esta respuesta se caracterizó se requirió clasificar a las proteínas en 5 familias de acuerdo a los pesos moleculares y a las funciones de ellas: a) Proteínas de muy alto peso molecular, mayores a 110 kDa, b) Proteínas de alto peso molecular, de 83 a 90 kDa, c) familia PCHT 70, de 66-78 kDa, d) familia PCHT 60, presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, también llamadas chaperoninas y e) proteínas del choque térmico de bajo peso molecular, de 15 a 30 kDa (Morimoto, R.I. *et al.*, 1990).

### **c) Adquisición de tolerancia.**

Se ha establecido que la mayoría de las células incluyendo a las bacterias, son capaces de soportar cambios en las condiciones ambientales e incluso pueden adaptarse (tolerar), conforme pasa el tiempo a esta nueva situación, aumentando de esta manera su capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles que anteriormente resultaban letales, este fenómeno es conocido como adquisición de tolerancia (Davidson P.M. and M.A. Harrison, 2002; Villarreal, L. et al., 2002; Beales, N., 2004).

Estudiando este aspecto se ha detectado que en esta respuesta adaptativa las proteínas del estrés juegan un papel importante, encontrándose que son responsables de funciones protectoras críticas, como el transporte y ensamble correcto de proteínas (Jaatela, M. and D. Wissing, 1993).

Todos los seres vivos requieren de ciertas condiciones para sobrevivir, entre estas encontramos los factores ambientales como la temperatura, pH, humedad, nutrientes, etc. Para cada factor hay un rango en que las células sobreviven y un valor óptimo en el cual el organismo específico se desarrolla y reproduce al máximo de su capacidad, pero, al encontrarse en condiciones con valores superiores o inferiores a sus requerimientos óptimos, responderá con un mecanismo de adaptación, que le permitirá sobrevivir a estas

condiciones produciendo unas proteínas especiales que son conocidas como proteínas del estrés (Jaatela, M. and D. Wissing, 1992).

La capacidad de adaptación de los microorganismos por medio de la adquisición de tolerancia a condiciones estresantes ha sido estudiada ampliamente. Uno de los primeros estudios para entender esta respuesta se realizó con *Staphylococcus aureus*, el cual fue sometido a altas temperaturas (50°C) y varias condiciones de humedad relativa en superficies como vidrio, metal y cerámica, obteniéndose como resultado la capacidad de este microorganismo a sobrevivir hasta 48 horas en ambientes con baja humedad relativa (McDade, J.J. *et al.*, 1964).

Otras investigaciones se han enfocado al estudio de los daños causados por cambios de temperatura en la célula, como lo reportaron para *S. aureus*, donde al someter a la bacteria a incrementos de temperatura se observaba la pérdida de viabilidad y liberación de material intracelular (Allwood, M. C. and A. D. Russell, 1967). Además, se encontró que la temperatura de degradación de ribosomas era similar a la temperatura de daño subletal en la célula intacta (Haight, R.D. and Z.J. Ordal, 1968). También se demostró que el crecimiento y metabolismo se alteraban cuando las células de *S. aureus* se transferían después del tratamiento térmico a condiciones normales, asumiendo que el calor afectaba la composición de los productos del metabolismo (Allwood, M.C. and A.D. Russell, 1969).

Hurst, A. *et al.* (1974) demostraron que el efecto del calor sobre la célula es diferente dependiendo de la edad del cultivo. Se observó en *S. aureus* mayor resistencia en la fase estacionaria.

El efecto de sustancias añadidas a los medios de cultivo adicionales a la exposición de algún factor estresante como el calor, refrigeración o baja actividad de agua, también se ha estudiado desde hace tiempo, tal es el caso de células de *S. aureus*, las cuales al ser sometidas a un estrés de los ya mencionados (calor, refrigeración, etc.), permitiendo solo una baja recuperación de células, sin embargo al añadirse catalasa al

medio de cultivo, se incrementó esta recuperación. Con esto se trató de demostrar que debido al estrés, la bacteria perdía capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno, pero que al adicionarse la catalasa, ésta le ayudaba en su sobrevivencia (Flowers, R.S. *et al.*, 1977).

Investigaciones realizadas en 1987 demostraron que algunos microorganismos, entre ellos *Salmonella* Typhimurium, incrementaba su tolerancia térmica si previamente se sometía a choques térmicos subletales (Mackey, B.M and C.M. Derrick, 1986). De la misma forma *S. thompson* presentaba el fenómeno de adquisición de tolerancia al calor cuando se sometía previamente a un choque térmico subletal (Mackey, B.M. and C.M. Derrick 1987).

La adquisición de termotolerancia se ha estudiado no únicamente en células vegetativas. Se ha establecido que cuando células de *C. perfringens* en proceso de esporulación fueron sometidas a un choque térmico subletal de 50°C por 30 minutos, las esporas formadas fueron mas tolerantes al calor (Luévanos, R., 1995). Además se estableció que las células vegetativas también fueron capaces de adquirir termotolerancia a 55°C siempre y cuando fueron expuestas previamente a un choque térmico subletal. Se estableció que dicha tolerancia tenía una duración al menos por 2 horas después de la aplicación del choque subletal (García, G., 1996).

#### **d) Respuesta al frío**

Aunque los primeros estudios sobre adquisición de tolerancia se realizaron a altas temperaturas, la necesidad de estudiar estas respuestas a diferentes temperaturas se volvió una necesidad, ya que son condiciones reales a las que los microorganismos se exponen, y dentro de estas tenemos las temperaturas de refrigeración.

Jones, P.G. *et al.* (1987) encontraron que cuando *E. coli* se sometía a un cambio de temperatura de 37°C a 10°C se detenía el crecimiento microbiano, sin embargo, las células entraban en una fase de adaptación, en donde se incrementaron los niveles de algunas de sus proteínas de 3 a 300 veces. A estas proteínas se les llamó proteínas del

choque frío. Se estableció que la proteína del choque frío de 7.4 kDa era sumamente importante (Goldstein, W.A. *et al.*, 1990).

Otros microorganismos donde se ha estudiado la adaptación a bajas temperaturas son *Bacillus subtilis*, al cambiar la temperatura de 37°C a 10°C (Willimsky *et al.*, 1992) induciéndose la producción de proteínas del choque frío; también este efecto se observó en *L. monocytogenes* al ser expuesta a 5°C (Bayles *et al.*, 1996); de igual manera la bacteria termofila *Streptococcus thermophilus*, al ser expuesta a 20°C sintetizó proteínas del choque frío como respuesta adaptativa (Wouters *et al.*, 1999).

Se ha reportado en *Bacillus psychrophilus* que al someterse a un cambio a temperatura fría se inducía la síntesis de proteínas del choque frío y otras proteínas que llamaron de aclimatación al frío (PAF), sugiriéndose que estas últimas conferían la capacidad de sobrevivir y adaptarse a bajas temperaturas (White, L.G. and W.E. Innis 1992). La inducción de las proteínas del choque y adaptación al frío se ha encontrado también en la bacteria *Aquaspirillum arcticum* (Roberts, M.E. and W.E. Innis 1992).

Así mismo, se ha establecido que *C. perfringens* al ser expuesto a un choque subletal frío de 28°C por 60 min, provoca la adquisición de tolerancia a 10°C (normalmente letal para esta bacteria) (Villarreal *et al.*, 2002).

#### **e) Respuesta Cruzada**

Se ha reportado que algunos microorganismos al ser sometidos a ciertos choques subletales son capaces de adquirir tolerancia a un estrés diferente al del choque subletal. A este fenómeno se conoce como respuesta cruzada.

Arnosti *et al.* (1986) reportaron que *Bacillus subtilis* adquiriría termotolerancia al ser sometido a un choque térmico subletal y que ésta tolerancia al calor podía ser promovida por otros factores como la exposición a etanol.

En el año siguiente Berg *et al.* (1987), trabajando con *Trichosporon pullulans* y *Sporobolomyces salmonicolor* observaron la inducción de proteínas del choque térmico al someter a las células a anaerobiosis.

Cuando se sometió a *S. enteritidis* a condiciones alcalinas se observó que adquiría termotolerancia (Humphrey, T.J. *et al.*, 1991), lo mismo ocurrió a *B. subtilis* después de la exposición a concentraciones bajas de sal adquiriendo termotolerancia y de la misma manera al someterse a un choque térmico subletal adquiría halotolerancia (Völker, U. *et al.*, 1992).

Boutibonnes *et al.* (1993) reportaron que *Enterococcus faecalis* aumentaba su termotolerancia al ser cultivado en presencia de etanol al 2% ó 4% y al crecer a 45 ó 50°C se incrementaba su tolerancia al etanol.

En *Vibrio cholerae* se ha reportado que la exposición previa a un choque subletal ácido (pH 5.5) provoca una respuesta de adaptación que le permite sobrevivir a la presencia de jugo biliar humano y además no se afecta la producción de la enterotoxina (Alvarez, G., 2002).

También, cuando a *C. perfringens* se le sometió a un choque térmico de 50°C por 30 minutos se observó que adquirió tolerancia a 10°C y al ser sometido a un choque frío de 28°C por 60 minutos adquirió tolerancia a 55°C (García *et al.*, 2001). Este comportamiento es de gran importancia en seguridad de alimentos, ya que demuestra la capacidad de este microorganismo de sobrevivir a temperaturas de calentamiento y refrigeración comunes en la práctica del manejo de alimentos, siendo esta capacidad un factor de riesgo de enfermedad para el consumidor.

#### **f) Conservadores y Sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (G.R.A.S.)**

Para controlar el desarrollo de los microorganismos en alimentos, en ocasiones se emplean sustancias químicas, la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América, ha establecido a algunas de ellas con el prefijo Generally recognized

as safe (G.R.A.S.), lo cual involucra un sistema de revisión y aprobación de ingredientes a añadir a los alimentos. Para que una sustancia pueda ser considerada G.R.A.S. se requiere la evaluación y aprobación de los ingredientes por expertos calificados que establecen que no provocan daños para la salud a las concentraciones de uso establecidas (Burdock, G.A. and I.G. Carabin, 2004).

La efectividad de varias sustancias G.R.A.S usadas como conservadores, tales como, sorbato de potasio, benzoato de sodio y nitrito de sodio sobre los microorganismos patógenos *Bacillus cereus*, *E. coli* vero citotoxigénica y *S. aureus* fue reportada por Thomas, *et al.* (1993). Estos investigadores encontraron que el sorbato de potasio fue efectivo para inhibir el crecimiento de *E. coli* cuando se combinaba con otros factores como pH, concentración de cloruro de sodio y temperatura. En tanto, el benzoato de sodio fue el más efectivo contra *S. aureus*, especialmente a pH<6. En ese estudio el nitrito de sodio fue el conservador menos efectivo, particularmente contra *S. aureus*.

Se ha recomendado la adición de benzoato de sodio al 0.1% en sidra de manzana para garantizar la inocuidad de este producto, con el objetivo de eliminar a *E. coli* O157:H7 y el desarrollo de hongos y levaduras (Zhao, T. *et al.* 1993).

En diversos estudios se ha comprobado la eficacia del sorbato de potasio como conservador en alimentos, ejemplo de ello es el pollo empacado al vacío, al cual cuando se agregó sorbato de potasio se extendió su vida de anaquel hasta 12 días (Kolsarici, N. and K. Candogan, 1995). Blocher y Busta en 1985 reportaron que la adición de este conservador inhibió *In Vitro* la germinación de esporas de *C. botulinum*. Además, estudios recientes han reportado que la adición de algunos conservadores a alimentos favorecen la inactivación por calor de diferentes microorganismos. Dock, L.L. *et al.* (2000) adicionaron sorbato de potasio, benzoato de sodio y ácido málico a sidra de manzana y observaron la disminución drástica en los tiempos de inactivación por calor de *E. coli* O157:H7.



Los conservadores no sólo pueden matar a los microorganismos, sino que en ocasiones aquellos que sobreviven pueden verse afectados en su metabolismo y/o en sus características físicas, tal como se observó en *C. sporogenes*, al añadirse sorbato, nitrito o ácido clorhídrico al medio de cultivo; en donde se detectó que las células no se separaban y al microscopio se observó la formación de filamentos (Ronning, I.E. and H.A. Frank, 1989). De la misma manera, cuando se añadió sorbato de potasio al medio de cultivo donde crecía *Listeria monocytogenes* esta perdió la capacidad de producir la Listeriolisina O (Kouassi, Y. and L.A. Shelef, 1995).

De igual manera el empleo de ácido sórbico o nitrito de sodio en el medio de cultivo disminuyó la producción de RNAm codificante para toxina de *C. botulinum* a un nivel 10 a 25 veces menor que los cultivos control (Sharkey, F.H., S.I. Markos, and R.W. Haylock, 2004).

Algunos tratamientos que utilizan conservadores, como el uso de baños por inmersión en soluciones de sorbato de potasio 5% y ácido láctico 5% o de ácido acético 5%, diacetato de sodio 5% o benzoato de potasio 5% han sido reportados ser efectivos para prevenir la contaminación con *L. monocytogenes* y otros microorganismos especialmente en embutidos rebanados tipo bologna (Samelis, J. *et al.*, 2001).

Se han hecho estudios para evaluar la efectividad de conservadores G.R.A.S. (benzoato de sodio, sorbato de potasio, propionato de sodio y diacetato de sodio) en reducir la población o inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* encontrándose una disminución en la población bacteriana después del tratamiento de pollo y salchichas de pavo tratados con estas sustancias G.R.A.S. (Islam *et al.*, 2002).

Sin embargo, se ha encontrado que ciertas sustancias G.R.A.S. que no son empleadas como conservadores, pueden ayudar a las bacterias a adquirir tolerancia a ciertas condiciones letales. Se ha observado que *E. coli* enterohemorrágica en presencia de glutamato de sodio aumenta su resistencia al ácido (Lin, J. *et al.*, 1996).

En otros organismos como *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado que el ácido benzoico y ácido sórbico añadidos a un medio con bajo pH provocaban una inhibición de la tolerancia al calor provocada por un choque térmico subletal. Sin embargo, cuando los conservadores se añadían a un medio con un pH mayor a 5.5, se promovía la adquisición de tolerancia a altas temperaturas (Cheng, L. and P.W. Piper, 1994).

Así mismo, se ha observado que cuando *E. coli* O157:H7 se expuso a diferentes acidulantes empleados en alimentos, como el ácido acético, cítrico, láctico, málico y clorhídrico se provocaba un incremento en la resistencia a la radiación de este microorganismo 1.2 a 3.3 veces (Buchanan, R.L. *et al.*, 2004).

Se ha comprobado que la adición de ácidos orgánicos débiles, tales como el ácido benzoico y sórbico, afectan en diferente grado a los microorganismos, Principalmente interrumpiendo el transporte de sustratos o inhibiendo algunas vías metabólicas (Beales, N., 2004).

Por todo lo anterior y dado que no se conoce el efecto de las sustancias G.R.A.S. sobre la adquisición de tolerancia al frío en *C. perfringens*, pensamos que sería útil estudiar este aspecto, ya que si se provoca la tolerancia al frío en *C. perfringens*, pudiera resultar un punto de cuidado ya que estas condiciones continuamente se presentan en el procesamiento de alimentos. De ahí el presente trabajo.

## IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN

*Clostridium perfringens* ocasiona una toxi-infección transmitida por el consumo de alimentos contaminados. Este microorganismo tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir al ser expuesto a diferentes condiciones adversas lo que permite su desarrollo en el alimento con el riesgo potencial de causar la enfermedad al consumidor final. La adición de conservadores a los alimentos, practica ampliamente usada, no siempre garantiza la eliminación del microorganismo, ya sea por ineffectividad del conservador para el microorganismo en particular o, por encontrarse a dosis menores a las recomendadas.

Debido a lo anterior es muy importante conocer el efecto a diferentes concentraciones de cuatro sustancias generalmente reconocidas como seguras (G.R.A.S.) en la adquisición de la tolerancia al frío en *C. perfringens*. Los resultados obtenidos ayudarán a comprender el comportamiento de esta bacteria y generar conocimientos que nos ayuden a obtener alimentos más seguros.

## **HIPÓTESIS**

A dosis menores a las letales, las sustancias consideradas como seguras (G.R.A.S.) afectan la adquisición de tolerancia al frío de *C. perfringens*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de sustancias G.R.A.S. sobre la adquisición de tolerancia a bajas temperaturas en *Clostridium perfringens* tipo A.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de cuatro sustancias G.R.A.S. (Sorbato de potasio, Benzoato de Sodio, Nitrito de sodio y Glutamato monosódico) comúnmente utilizadas en la industria de alimentos para *C. perfringens* tipo A.

Determinar el efecto de dosis menores a la CMB de dichas sustancias G.R.A.S. sobre la adquisición de tolerancia al frío en *C. perfringens*.

## MATERIAL Y METODO

### 1. Cepas

Las cepas empleadas en esta investigación fueron: *Clostridium perfringens* FD-1041 (enterotoxigénica) y *Clostridium perfringens* FD-1 (no enterotoxigénica), donadas por el Dr. Ronald Labbé de la Universidad de Massachussets, E.U.A.

Las cepas se mantuvieron en congelación a -20°C en medio de carne cocida, como cultivo esporulado de reserva.

#### 1.1 Activación de las cepas

Para reactivar las esporas se inocularon unas gotas del medio de cultivo de reserva en caldo con tioglicolato (DIFCO) sometiéndolas inmediatamente a un choque térmico de 75°C por 15 minutos para estimular así la germinación y posteriormente fueron incubadas a 37°C por 16-18h. Este cultivo activado fue utilizado como inóculo en los diferentes experimentos.

### 2. Sustancias G.R.A.S.

Las sustancias G.R.A.S. utilizadas fueron:

Benzoato de Sodio grado alimenticio C.A.S. 532-32-1

Sorbato de Potasio grado alimenticio C.A.S. 24634-61-5

Nitrito de Sodio grado alimenticio C.A.S. 7632-00-0

Glutamato Monosódico grado alimenticio C.A.S. 142-47-2

Estas sustancias fueron proporcionadas por la compañía Laboratorios Griffith de México S.A. de C.V. y se conservaron en empaques cerrados, a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Para su utilización se prepararon soluciones de la sustancia G.R.A.S. con agua destilada y esterilizadas por filtración. Solo se preparó la cantidad adecuada para emplear en cada ensayo, ya que la solución no puede almacenarse por riesgo de degradación de las sustancias empleadas.

### **3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

En tubos de cultivo con caldo tioglicolato se adicionaron diversas dosis de cada una de las sustancias G.R.A.S. mencionadas en el apartado anterior, basándonos en las concentraciones recomendadas de uso de cada una de ellas.

Las concentraciones ensayadas fueron:

Benzoato de sodio: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5%.

Sorbato de potasio: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5%.

Nitrito de sodio: 10, 25, 50, 100, 180, 360, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 ppm.

Posteriormente los medios fueron inoculados al 1% v/v con el cultivo activado de *C. perfringens*, incubados a 37°C y se realizaron plaques a las 2h y 4h de cultivo para realizar la cuenta en placa y determinar la mortalidad de las células. El método empleado para esto último fue la técnica de difusión en placa, la cual consiste en colocar 100µl del cultivo (o dilución) en la placa de petri y sobre esta alícuota se añadió el agar para cuenta en placa (Agar bacteriológico 15g, peptona de caseína 15g, extracto de levadura 7g y agua 1L) posteriormente con movimientos circulares se distribuyó el cultivo y se dejó solidificar, para luego incubar las placas en anaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>) a una temperatura de 37°C, contando las unidades formadoras de colonia por mililitro a las 24h.



#### **4. Estudio del Efecto de las sustancias G.R.A.S. sobre la adquisición de tolerancia al frío.**

##### **4.1 Efecto individual**

Dado que la CMB encontrada para estas sustancias fue mayor que la dosis recomendada, se emplearon estas últimas (tabla 1) para los ensayos siguientes.

Para la determinación del efecto individual de cada sustancia G.R.A.S. sobre la tolerancia al frío, la dosis correspondiente de cada sustancia fue añadida a una serie de tubos con 5 mL de caldo tioglicolato. De igual forma se prepararon tubos con 5 mL de caldo tioglicolato sin adicionar conservador para ser empleados como cultivos control.

Todos los tubos fueron inoculados (al 1%) con la cepa activada. Los cultivos fueron incubados a 37°C hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica ( $A_{600} = 0.4-0.5$ ,  $1 \times 10^7$  UFC/mL).

Una vez alcanzada esta, una serie de tubos fue expuesto a una temperatura subletal (prechoque) de 28°C por 60 minutos. Posteriormente todos los cultivos fueron sometidos a la temperatura letal de 10°C por un periodo de 90 minutos. Se tomaron alícuotas al tiempo “0” y cada 15 minutos para realizar cuenta en placa utilizando la técnica de difusión en placa, tal y como se explicó anteriormente; las placas fueron incubadas en anaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>) a una temperatura de 37°C, contando las unidades formadoras de colonia por mililitro a las 24h.

Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de sobrevivencia.

##### **4.2 Efecto combinado**

Se utilizaron diferentes mezclas (Tabla 1) de cada una de las sustancias G.R.A.S. para estudiar su efecto en la adquisición de tolerancia al frío y se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior.

### **4.3 Análisis Estadístico:**

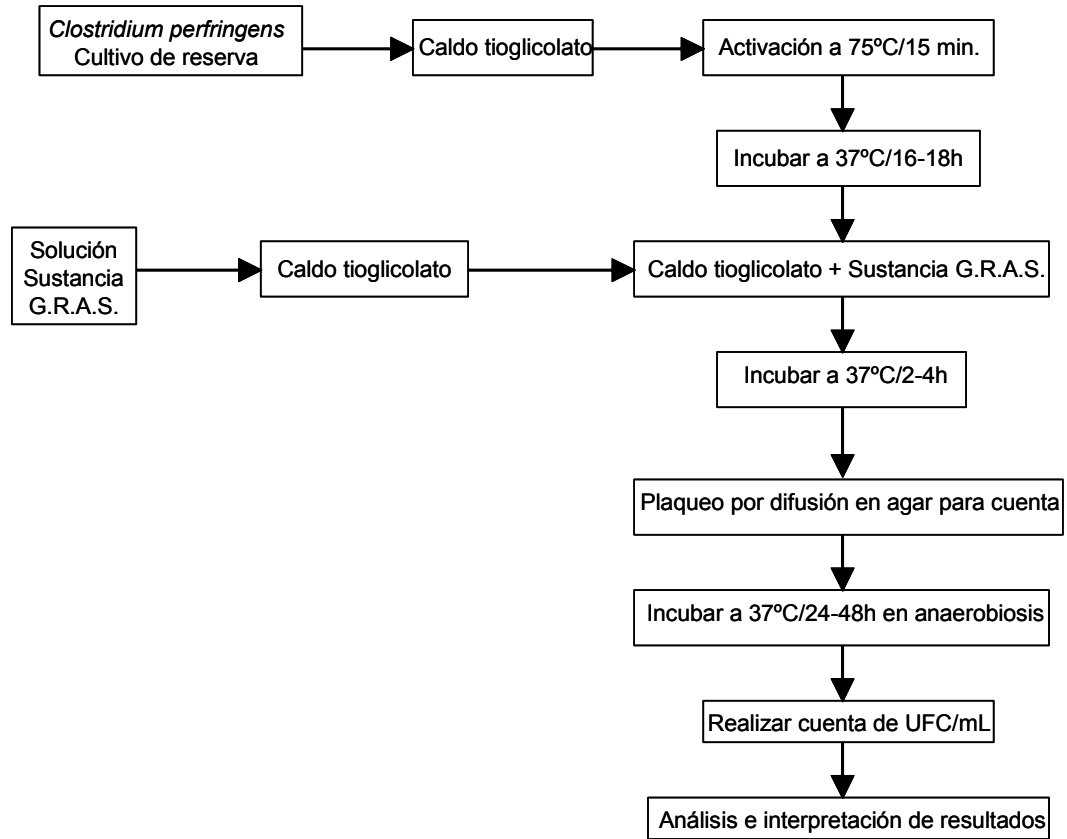
Se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos, empleando para ello análisis de varianza múltiple, comparación múltiple de medias de Tukey y comparación de pendientes.

**Tabla 1.** Concentraciones empleadas de las diferentes sustancias G.R.A.S. para estudiar el efecto sobre la adquisición de tolerancia al frío en *Clostridium perfringens*.

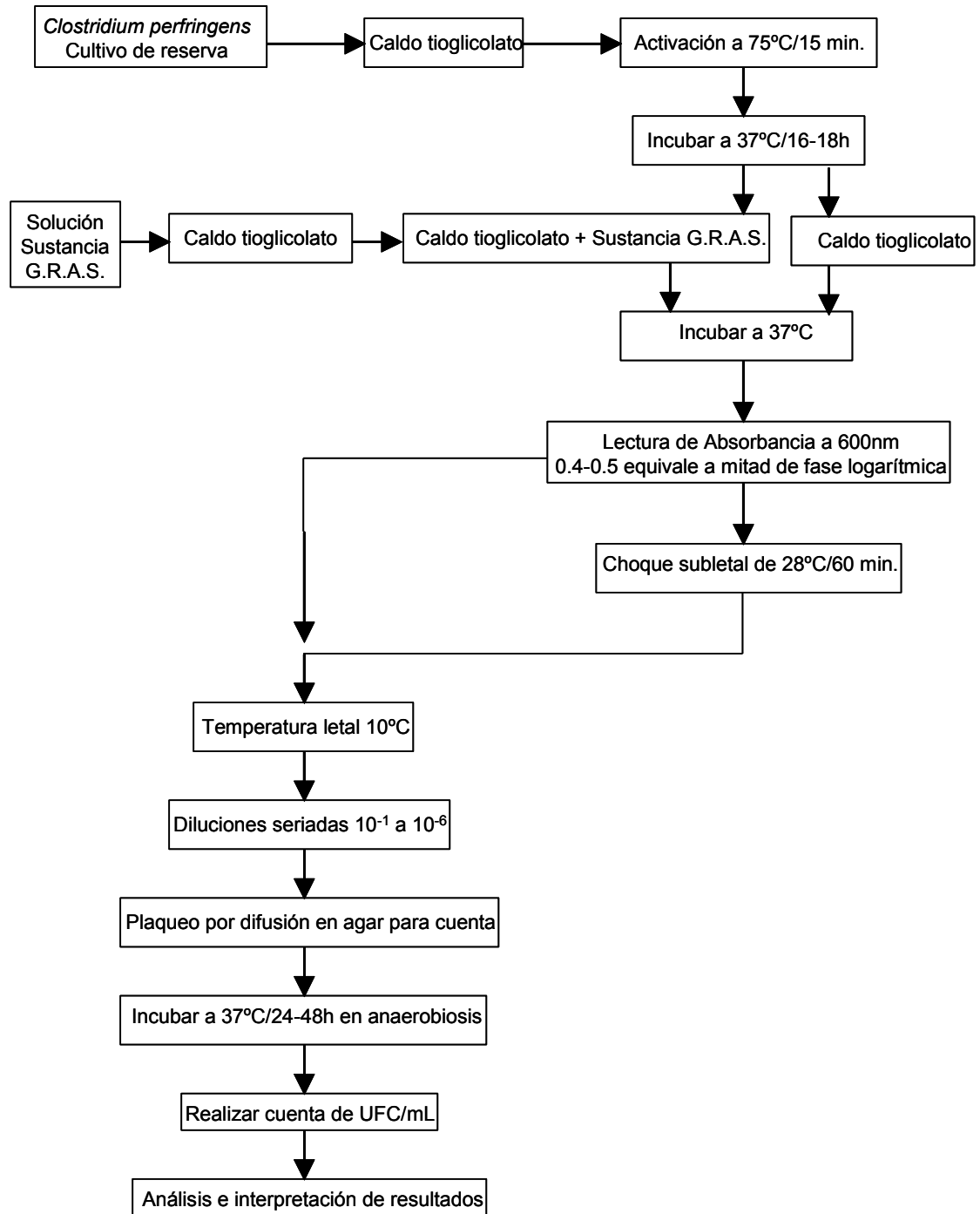
# Tratamiento	SUSTANCIAS G.R.A.S. ADICIONADAS			
	Benzoato de sodio (%)	Sorbato de potasio (%)	Nitrito de sodio (ppm)	Glutamato monosódico (%)
1	0.1500	--	--	--
2	--	0.20	--	--
3	--	--	180	--
4	--	--	--	0.15
5	0.1500	--	180	--
6	--	0.20	180	--
7	0.1500	--	--	0.15
8	--	0.20	--	0.15
9	--	--	180	0.15
10	0.1125	0.05	--	--
11	0.0750	0.10	--	--
12	0.0375	0.15	--	--
13	0.1125	0.05	180	--
14	0.0750	0.10	180	--
15	0.0375	0.15	180	--
16	0.1125	0.05	--	0.15
17	0.0750	0.10	--	0.15
18	0.0375	0.15	--	0.15
19	0.1125	0.05	180	0.15
20	0.0750	0.10	180	0.15
21	0.0375	0.15	180	0.15
22	0.1500	--	180	0.15
23	--	0.20	180	0.15

-- No se agregó sustancia G.R.A.S.

METODOLOGÍA  
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA



METODOLOGÍA  
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS SUSTANCIAS G.R.A.S. SOBRE LA  
ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA A 10°C



## RESULTADOS

### Concentración Mínima Bactericida

Los resultados obtenidos de los experimentos para determinar la concentración mínima bactericida de las sustancias G.R.A.S. empleadas, mostraron que el benzoato de sodio, sorbato de potasio y el nitrito de sodio fueron incapaces de inhibir el crecimiento de *C. perfringens* a las dosis recomendadas y a las dosis máximas empleadas de cada uno de ellos (Tabla 2).

Basados en estos resultados se tomó la decisión de emplear la dosis máxima recomendada de cada una de las sustancias G.R.A.S. para estudiar su efecto sobre la adquisición de tolerancia al frío en *C. perfringens*, en los casos del Benzoato de sodio y del Sorbato de potasio se emplearon las dosis máxima, así como, el 75%, 50% y 25% de dicha dosis, en diferentes tratamientos (Tabla 1).

Sustancia G.R.A.S.	Uso Recomendado*	Máximo Nivel Evaluado	Inhibición
Benzoato de Sodio	0.20%	Hasta 0.5%	No <sup>+</sup>
Sorbato de Potasio	0.20%	Hasta 0.5%	No <sup>+</sup>
Nitrito de Sodio	180 ppm	Hasta 10,000ppm	No <sup>+</sup>
Glutamato monosódico	BPM	N.D.	N.D.

\*NOM-122-SSA1-1994, NOM-130-SSA1-1995; N.D. = No determinado; BPM = Buenas prácticas de manufactura

+(p<0.05)

**Tabla 2.** Dosis empleadas de las diversas sustancias G.R.A.S. para determinar la concentración mínima inhibitoria sobre *Clostridium perfringens*.

## Efecto Individual

Los ensayos para evaluar el efecto del benzoato de sodio al 0.15% (tratamiento 1) sobre la adquisición de tolerancia en *C. perfringens* mostraron que para el caso de la cepa FD1041 (enterotoxigénica) se obtuvo adquisición estadísticamente significativa de tolerancia a 10°C en los tratamientos en donde se aplicó el prechoque subletal frío con y sin el benzoato de sodio (Fig. 1), e incluso en el cultivo con el tratamiento 1 se observó tendencia al crecimiento ( $p < 0.05$ ) en estas condiciones (220 min para incrementar 1 log en comparación con el control quien tuvo una  $D_{10}$  de 459 min para disminuir 1 log de la población). En el caso de los cultivos no sometidos al prechoque subletal, se observó que cuando no se agregaba el conservador la  $D_{10}$  fue de 23.19, y cuando se agregó el benzoato de sodio al 0.15% se obtuvo adquisición de tolerancia, ya que la  $D_{10}$  fue de 170.63. Estos resultados sugieren que el benzoato de sodio puede favorecer la sobrevivencia al frío en esta bacteria, sin embargo, el análisis estadístico ( $p < 0.05$ ) no reveló diferencia entre el cultivo con el tratamiento 1 y los cultivos sometidos al prechoque subletal de 28°C (Fig. 1, Tabla 3).

En el caso de la cepa no enterotoxigénica (FD1), se observó que al tratar al cultivo con benzoato de sodio al 0.15% y aplicar un prechoque subletal se provocaba un incremento de la población a 10°C (incremento de un log en 30.58 min), estadísticamente significativo con respecto al cultivo control. Esto sugiere un efecto sinérgico del benzoato y del prechoque subletal en la adquisición de tolerancia al frío. Cuando los cultivos tratados con benzoato que no se sometieron al choque subletal, su comportamiento fue similar al control ( $D_{10}=44.37$  con benzoato y control  $D_{10}=28.50$ ), y no se detectó diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1).

Para los cultivos con el Tratamiento 2 (sorbato de potasio al 0.2%), cuando no fueron sometidos a un prechoque subletal de 28°C, en ambas cepas se comportaron de manera similar al cultivo control, es decir no hubo adquisición de tolerancia a 10°C. La cepa FD1 presentó un valor  $D_{10}=75.42$ , el cual es estadísticamente similar al valor del control ( $D_{10}=28.50$ ). Cuando los cultivos fueron tratados con el prechoque subletal, si se presentó adquisición de tolerancia a 10°C, sin embargo, esta se vio disminuida, en aproximadamente un 50% con respecto al cultivo tratado con prechoque subletal pero en ausencia del sorbato de potasio (Fig. 2, Tabla 3).

Un caso interesante se presentó con el tratamiento 3 (nitrito de sodio a 180ppm), el cual provocó en la cepa *C. perfringens* FD1 adquisición de tolerancia a 10°C, incluso cuando el cultivo no se sometió al prechoque subletal, mientras que *C. perfringens* FD1041 requirió del prechoque subletal para adquirir tolerancia, independientemente del conservador agregado (Fig. 3, Tabla 3).

En el tratamiento en que agregamos glutamato monosódico (Tratamiento 4), encontramos que para inducir tolerancia a 10°C se requirió la aplicación del choque frío subletal, aunque se obtuvo un aumento de tolerancia en el tratamiento aplicando el choque subletal y que se había agregado esta sustancia G.R.A.S. (Fig. 4).

### **Efecto combinado**

Con el tratamiento 5 (mezcla benzoato de sodio al 0.15% y nitrito de sodio a 180 ppm) se inició el estudio de las mezclas de las sustancias G.R.A.S. Observamos que para la inducción de tolerancia a 10°C se requirió del prechoque subletal (Fig. 5, Tabla 3). Este efecto se observó en ambas cepas a diferencia de lo que habíamos observado cuando el benzoato de sodio al 0.15% se agregó solo al medio de cultivo y se inducía tolerancia a 10°C y cuando se agregó en mezcla con el nitrito de sodio, la capacidad de adquirir tolerancia a 10°C se perdió ( $p < 0.05\%$ ).

Cuando se combinaron el nitrito de sodio a 180 ppm y el sorbato de potasio a 0.2% (tratamiento 6), encontramos que tampoco se favoreció la inducción de tolerancia a 10°C en la cepa FD1041 e incluso observamos una disminución de la capacidad de resistir 10°C aún y cuando se aplicó el choque subletal frío ( $p < 0.05$ ). En este tratamiento encontramos que la presencia del sorbato de potasio no permitió el efecto favorecedor del nitrito de sodio en la adquisición de tolerancia en FD1 (Fig. 6, Tabla 3).

Los efectos combinados del benzoato de sodio y glutamato monosódico (tratamiento 7) se observan en la Fig. 7 y Tabla 3. De nuevo se observó la necesidad del prechoque subletal para la adquisición de tolerancia a 10°C, ya que los cultivos que no lo recibieron no presentaron tolerancia a 10°C ( $p < 0.05$ ).

La mezcla de sorbato de potasio y glutamato monosódico (tratamiento 8), presentó un comportamiento estadísticamente similar a los cultivos a los que no se agregaron estas sustancias G.R.A.S., requiriéndose la exposición al prechoque subletal,



para adquirir tolerancia a 10°C. Sin embargo, observamos que en la cepa FD1 la tolerancia adquirida fue menor que el cultivo sin las sustancias G.R.A.S. Los cultivos no sometidos al prechoque subletal no adquirieron tolerancia (Fig. 8, Tabla 3).

En el tratamiento 9 (nitrito de sodio y glutamato monosódico), se observó adquisición de tolerancia a 10°C por parte de las cepas que recibieron además el choque subletal e incluso detectamos tendencia al crecimiento de la bacteria, presentándose diferencia estadística al comparar contra los cultivos control. En los cultivos sin el prechoque subletal no observamos adquisición de tolerancia, aquí observamos la pérdida ( $p < 0.05$ ) del efecto del nitrito de sodio para provocar tolerancia en la cepa FD1 en ausencia del choque subletal (Fig. 9, Tabla 3).

En el caso del tratamiento 10 (benzoato de sodio al 0.11% y sorbato de potasio al 0.05%), observamos la misma tendencia que con los tratamientos anteriores, es decir, se requirió del prechoque subletal para adquirir tolerancia a 10°C ( $p < 0.05$ ). Sin embargo en este caso, la cepa FD1041 incrementó su población al agregar los conservadores y exponerla al prechoque subletal ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento no se observó en la cepa FD1, en donde los conservadores disminuyen la tolerancia de esta bacteria a 10°C (Fig. 10, Tabla 3).

La mezcla de benzoato de sodio al 0.075% y sorbato de potasio al 0.1% (tratamiento 11) provocaron la adquisición de tolerancia a 10°C en la cepa FD1 que no recibió el prechoque subletal ( $p < 0.05$ ). En el caso de *C. perfringens* FD1041, después del prechoque subletal y en presencia de los conservadores se observó crecimiento estadísticamente significativo de la bacteria a 10°C (Fig. 15, Tabla 3). Cuando se empleó la siguiente proporción de esta mezcla (tratamiento 12) también se observó la inducción de tolerancia a 10°C en los cultivos no expuestos al prechoque subletal. Sin embargo, esta tolerancia fue menor que la observada como resultado del choque subletal ( $p < 0.05$ ). Este efecto protector solo fue observado en la cepa FD1 (Fig. 16, Tabla 3).

En el caso del tratamiento 13, donde ya se incluyó al nitrito de sodio, además del benzoato de sodio y sorbato de potasio, los cultivos que no fueron expuestos al prechoque subletal no presentaron adquisición de tolerancia a 10°C ( $p < 0.05$ ), en tanto que los que fueron únicamente sometidos al prechoque subletal adquirieron tolerancia a 10°C e incluso presentaron crecimiento de la bacteria a esta temperatura (Fig. 11, Tabla 3).

Cuando variamos las concentraciones de estos 3 conservadores obtuvimos resultados similares que los reportados en el caso anterior (tratamientos 14 y 15).

Cuando agregamos benzoato de sodio, sorbato de potasio y glutamato monosódico en 3 diferentes concentraciones (tratamiento 16 al 18), encontramos resultados variables estableciendo que en la mayoría de los casos, en las concentraciones de los tratamientos 16 y 17, se obtuvo adquisición de tolerancia a 10°C independientemente ( $p < 0.05$ ) de la exposición al choque subletal (Fig. 12, Tabla 3). Esta resistencia se perdió ( $p < 0.05$ ) cuando se utilizaron las concentraciones de los conservadores del tratamiento 18 en donde para adquirir tolerancia a 10°C fue necesaria la aplicación del prechoque subletal de 28°C.

Cuando probamos las 4 sustancias G.R.A.S. a diferentes concentraciones (tratamientos 19 al 21) observamos que en ocasiones (tratamiento 19) se perdió la capacidad tolerante a 10°C que se obtenía por la aplicación del choque subletal, no observándose diferencia estadística contra los cultivos control (Fig. 13, Tabla 3). Además, en otros tratamientos (20 y 21) observamos que las sustancias G.R.A.S. no influyeron en la capacidad para tolerar 10°C por estas cepas; encontrando que se requirió la exposición al prechoque subletal para que hubiera tolerancia a 10°C por ambas cepas.

Cuando probamos benzoato de sodio, nitrito de sodio y glutamato monosódico (tratamiento 22), los cultivos de *C. perfringens* FD1041 tratados, expuestos al prechoque subletal, adquirieron prácticamente el doble de tolerancia que el cultivo no tratado ( $p < 0.05$ ), mientras que la cepa FD1 tratada, adquirió tolerancia en un nivel estadísticamente similar al cultivo no tratado. Sin embargo, los cultivos tratados no expuestos al prechoque subletal, no adquirieron tolerancia a 10°C (Fig. 14, Tabla 3).

También observamos que al agregar sorbato de potasio, nitrito de sodio y glutamato monosódico (tratamiento 23) se obtuvo adquisición de tolerancia a 10°C ( $p < 0.05$ ), similar o ligeramente menor que la observada por el efecto del prechoque subletal de 28°C (Fig. 23, Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de muerte a 10°C (D<sub>10</sub>) y tiempo para incrementar en 1 log las UFC/mL (Crecimiento) de *C. perfringens* expuesto a diferentes sustancias G.R.A.S. y mezclas de ellas. Los cultivos fueron expuestos a un prechoque subletal de 28°C/60 min en algunos tratamientos (CH-F). Control (-) = NO tolerancia a 10°C, Control (+) Tolerancia a 10°C.

Tratamiento	<i>C. perfringens</i> FD1041		<i>C. perfringens</i> FD1	
	D <sub>10</sub>	Crecimiento	D <sub>10</sub>	Crecimiento
Control (-)	23.2 ± 16.1	--	28.5 ± 14.6	--
Control (+)	459.0 ± 262.2	--	396.5 ± 103.2	--
1	170.6 ± 33.3	--	44.3 ± 8.0	--
1 CH-F	--	220.4 ± 384.5	--	30.5 ± 40.4
2	26.5 ± 4.33	--	75.4 ± 49.1	--
2 CH-F	204.3 ± 94.0	--	188.8 ± 121.1	--
3	40.56 ± 6.0	--	--	3440.9 ± 39.1
3 CH-F	--	126.5 ± 51.8	--	1828.4 ± 269.1
4	17.0 ± 3.2	--	27.1 ± 16.6	--
4 CH-F	--	279.1 ± 171.7	--	190.8 ± 175.5
5	20.2 ± 0.7	--	19.2 ± 9.4	--
5 CH-F	--	214.5 ± 119.5	--	209.7 ± 94.1
6	24.9 ± 4.8	--	19.1 ± 5.7	--
6 CH-F	--	341.5 ± 131.4	123.3 ± 11.3	--
7	31.7 ± 8.7	--	22.7 ± 8.2	--
7 CH-F	267.9 ± 58.2	--	--	248.1 ± 97.1
8	23.7 ± 12.1	--	17.5 ± 3.5	--
8 CH-F	492.1 ± 89.5	--	137.9 ± 35.7	--
9	17.5 ± 4.4	--	19.2 ± 9.2	--
9 CH-F	--	95.8 ± 21.5	--	1513.6 ± 28.2
10	25.5 ± 19.9	--	44.9 ± 27.0	--
10 CH-F	--	783.3 ± 853.8	187.1 ± 22.5	--
11	33.5 ± 24.6	--	165.7 ± 44.9	--
11 CH-F	--	88.5 ± 21.2	178.3 ± 114.4	--
12	77.4 ± 46.6	--	71.0 ± 17.7	--
12 CH-F	48.5 ± 26.7	--	246.4 ± 55.2	--
13	33.8 ± 8.3	--	27.1 ± 20.2	--
13 CH-F	--	148.0 ± 86.0	--	5205.6 ± 4371.3
14	40.5 ± 12.1	--	34.3 ± 4.5	--
14 CH-F	--	141.7 ± 33.6	--	38.6 ± 69.8

--:No aplica; CH-F: tratamiento con choque subletal a 28°C/60 min.

(p<0.05)

**Tabla 3.** Continuación...

Tratamiento	<i>C. perfringens</i> FD1041		<i>C. perfringens</i> FD1	
	D <sub>10</sub>	Crecimiento	D <sub>10</sub>	Crecimiento
15	40.4 ± 10.5	--	25.3 ± 8.9	--
15 CH-F	165.2 ± 93.2	--	204.6 ± 120.2	--
16	32.8 ± 0.4	--	110.6 ± 98.3	--
16 CH-F	--	463.4 ± 293.8	1493.2 ± 1013.1	--
17	24.9 ± 1.3	--	--	1703.6 ± 156.8
17 CH-F	--	2223.6 ± 133.7	135.2 ± 86.8	--
18	27.2 ± 3.6	--	71.1 ± 50.3	--
18 CH-F	232.9 ± 166.9	--	--	376.6 ± 294.3
19	27.07 ± 9.7	--	25.6 ± 10.8	--
19 CH-F	--	1684.8 ± 1302.3	62.2 ± 2.5	--
20	31.3 ± 13.4	--	22.5 ± 7.9	--
20 CH-F	435.7 ± 46.1	--	584.4 ± 132.5	--
21	29.1 ± 10.0	--	25.3 ± 8.9	--
21 CH-F	120.4 ± 27.3	--	253.2 ± 105.8	--
22	34.8 ± 18.3	--	37.7 ± 11.2	--
22 CH-F	923.2 ± 22.3	--	232.8 ± 99.4	--
23	38.9 ± 4.4	--	12.3 ± 2.3	--
23 CH-F	504.73 ± 267.3	--	144.8 ± 62.5	--

--:No aplica; CH-F: tratamiento con choque subletal a 28°C/60 min.

(p<0.05)

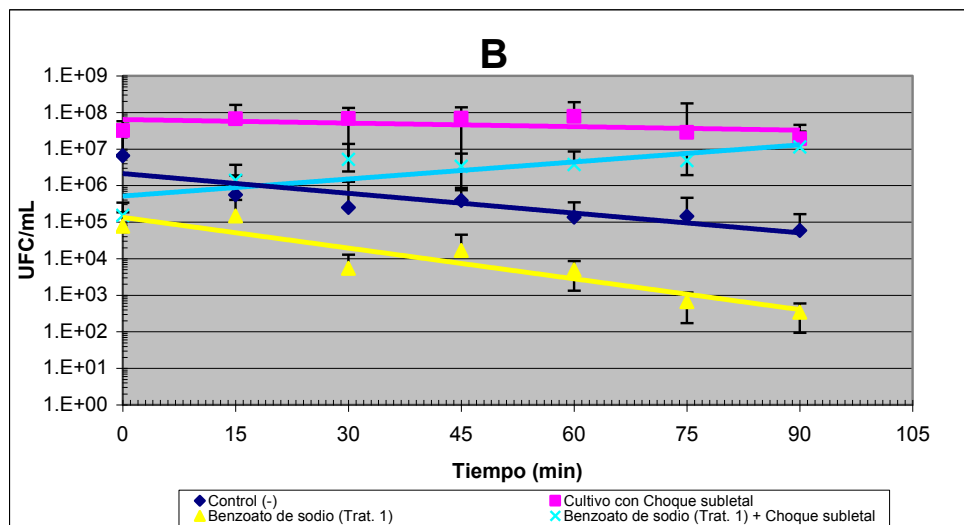
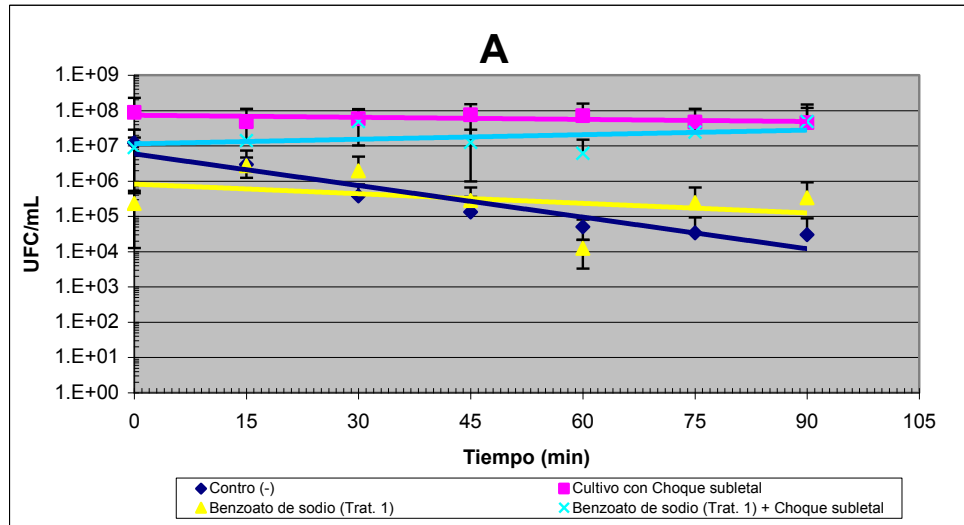


FIGURA 1. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Benzoato de sodio 0.15%.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

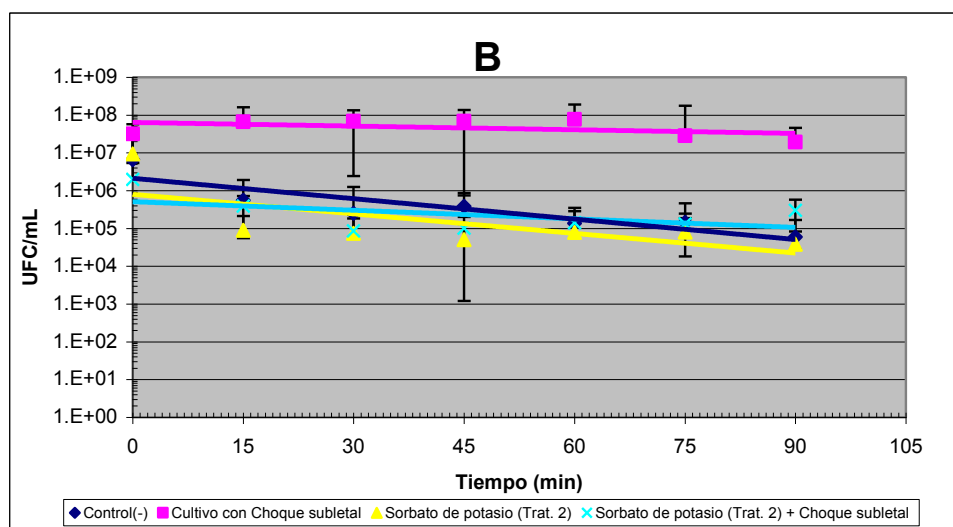
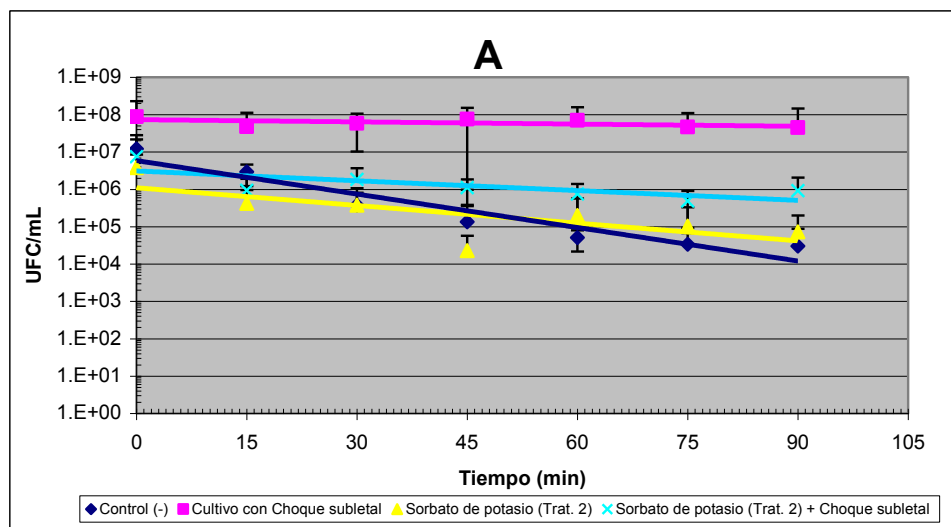


FIGURA 2. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Sorbato de potasio 0.2%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

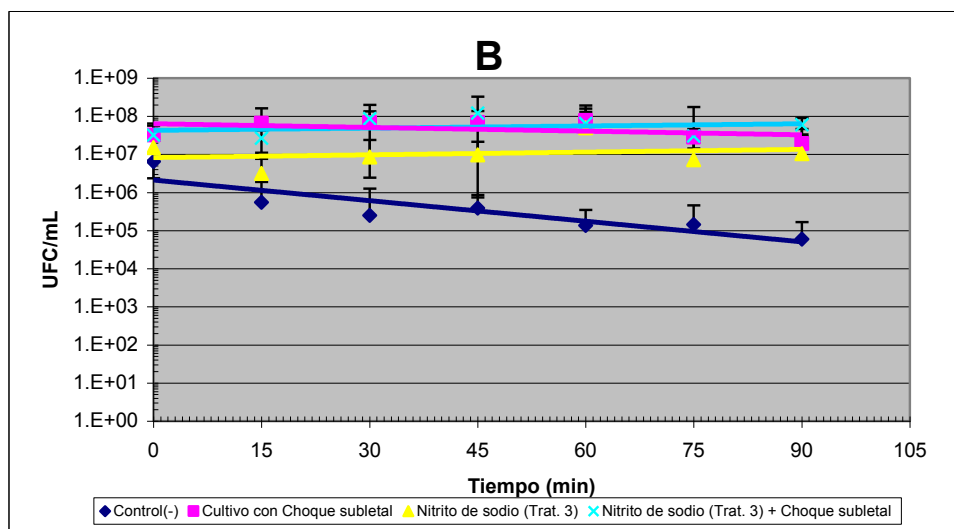
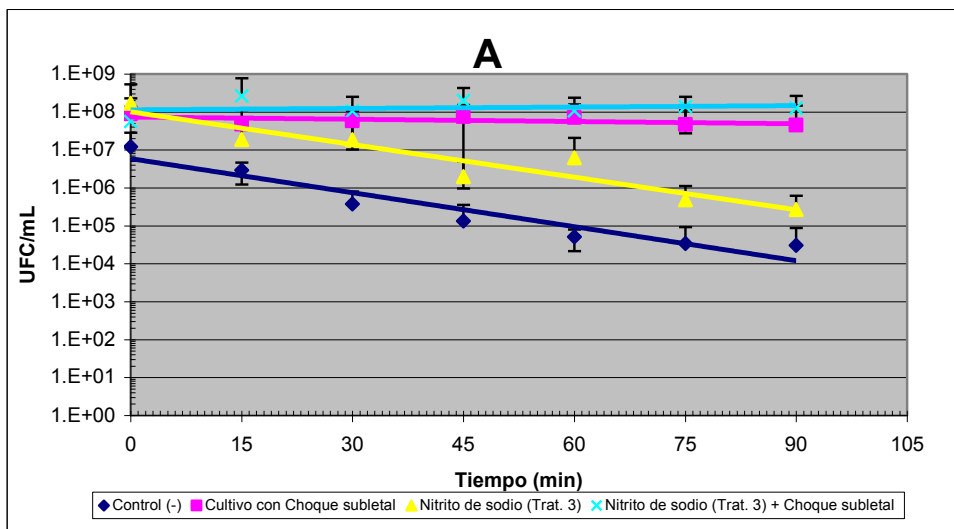


FIGURA 3. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Nitrito de sodio 180 ppm.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

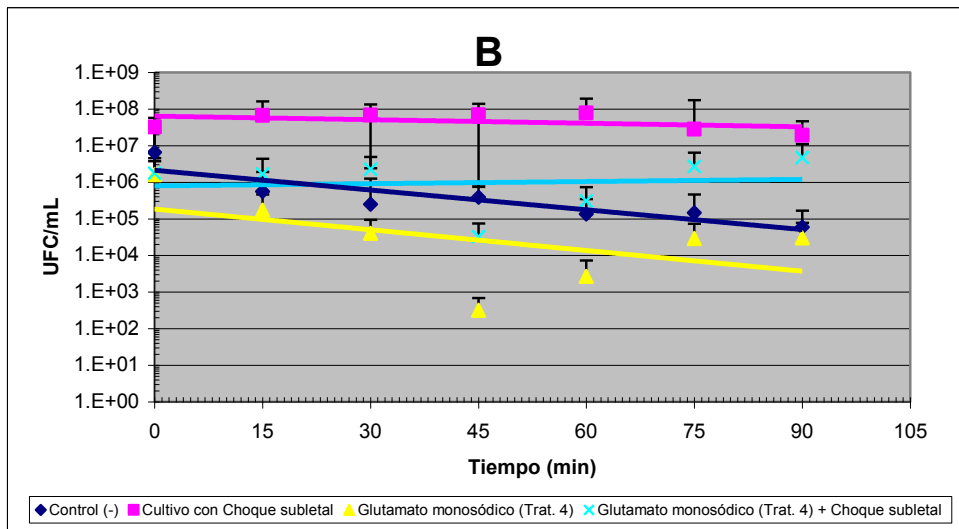
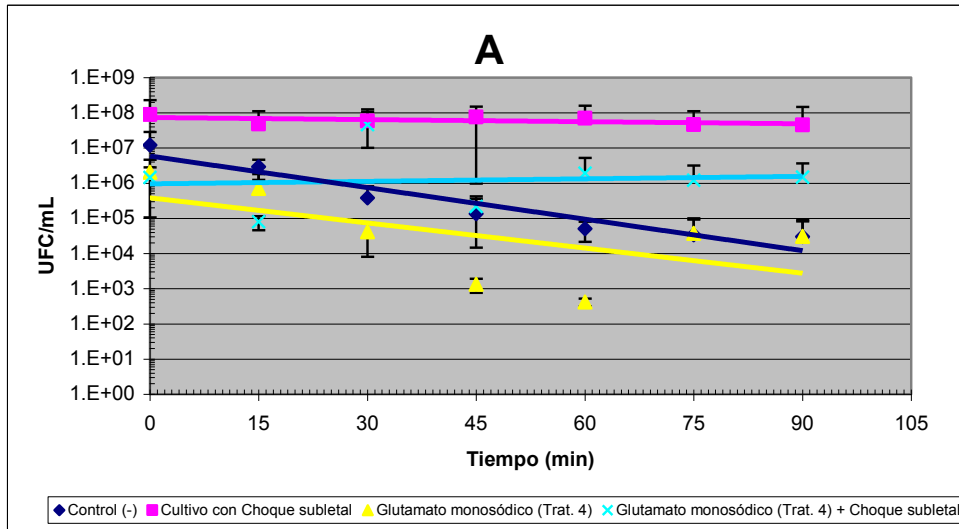


FIGURA 4. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)



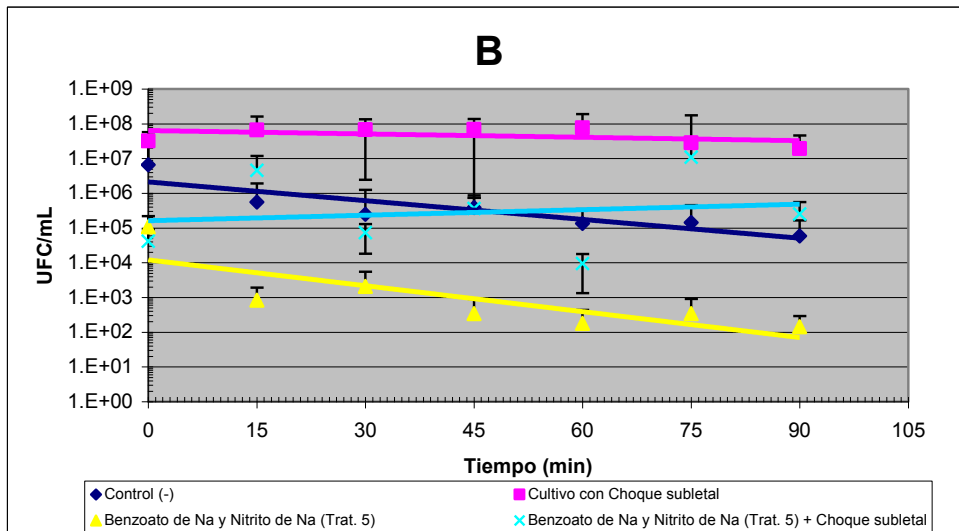
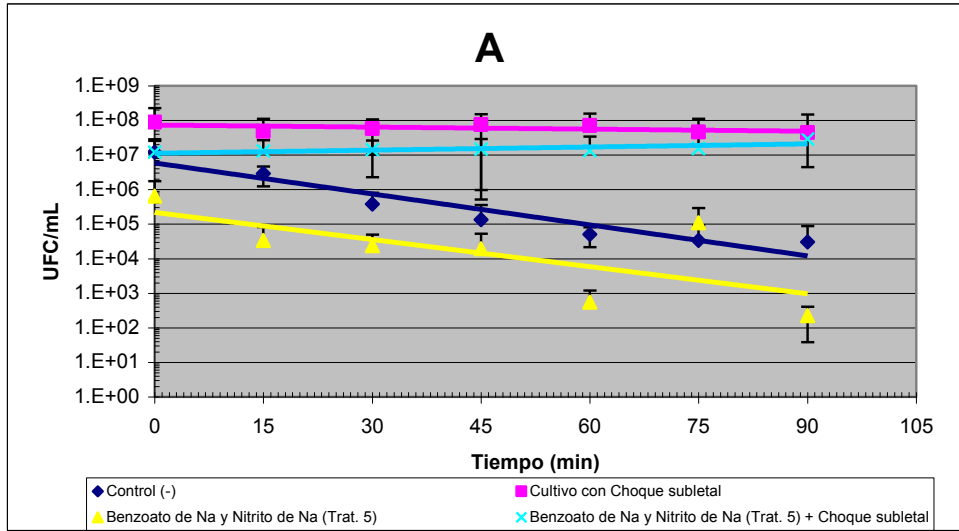


FIGURA 5. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15% y Nitrito de sodio 180 ppm.

**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

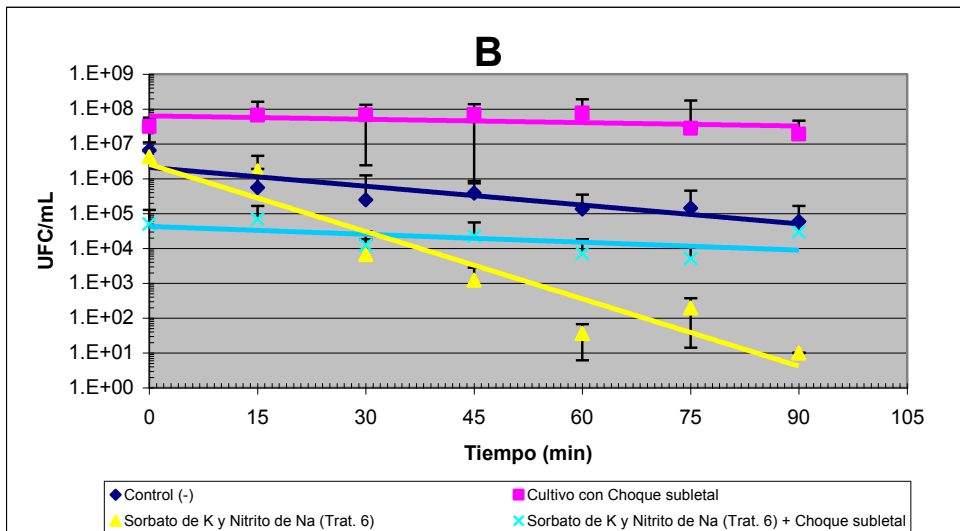
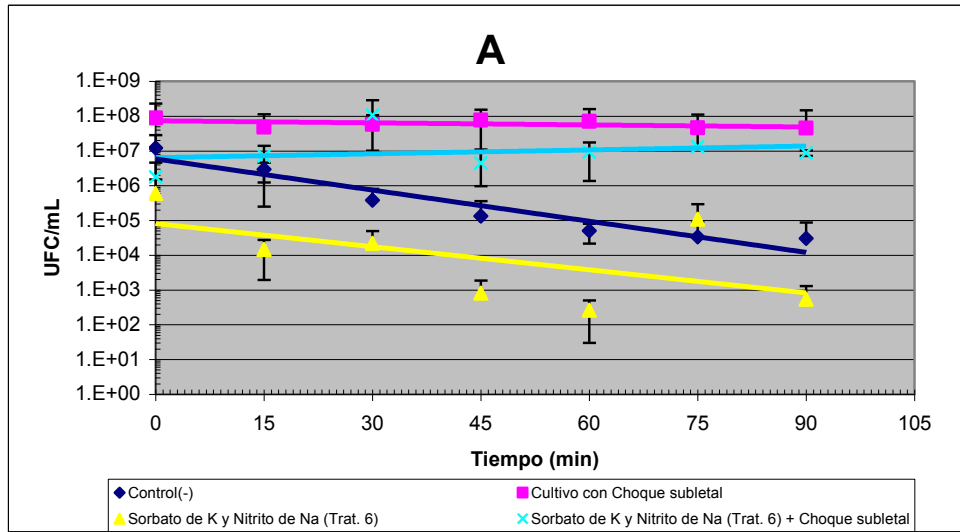


FIGURA 6. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2% y Nitrito de sodio 180 ppm.

**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

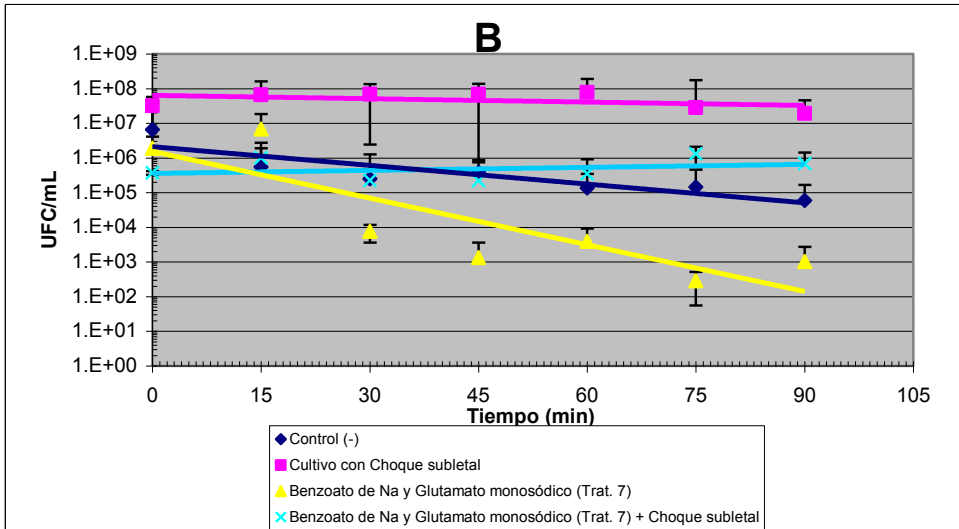
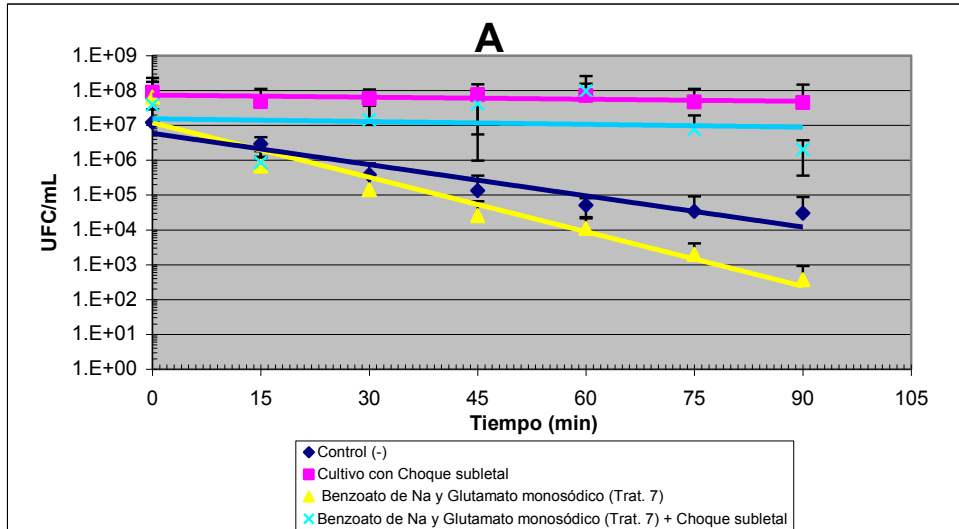


FIGURA 7. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15% y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

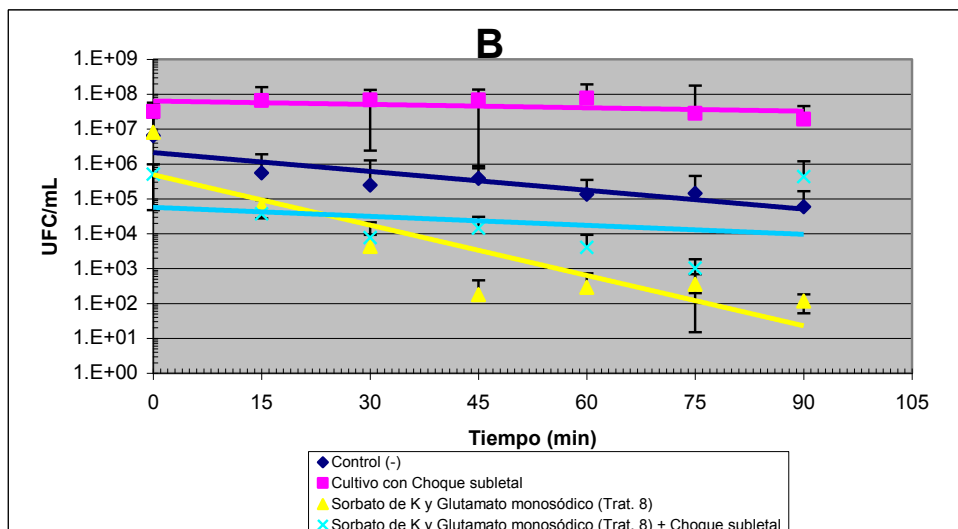
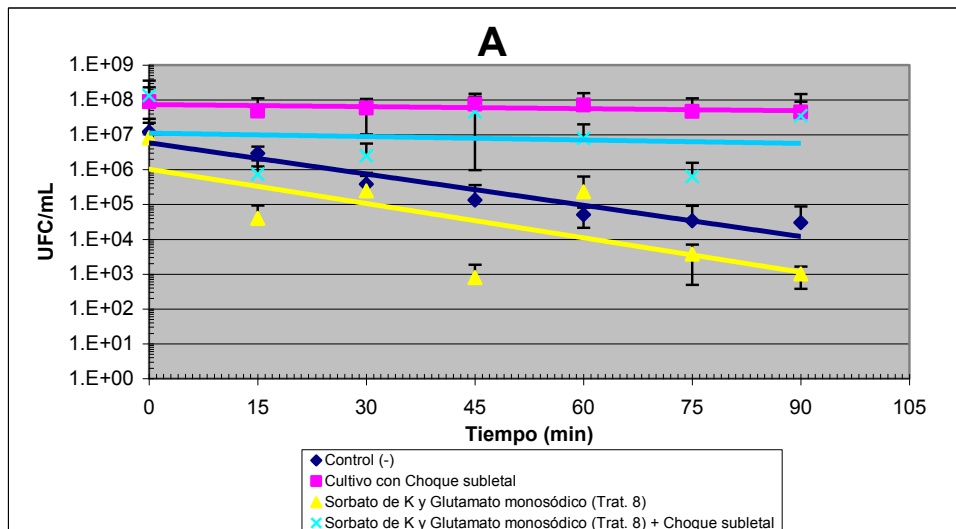


FIGURA 8. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2% y Glutamato monosódico 0.15%.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

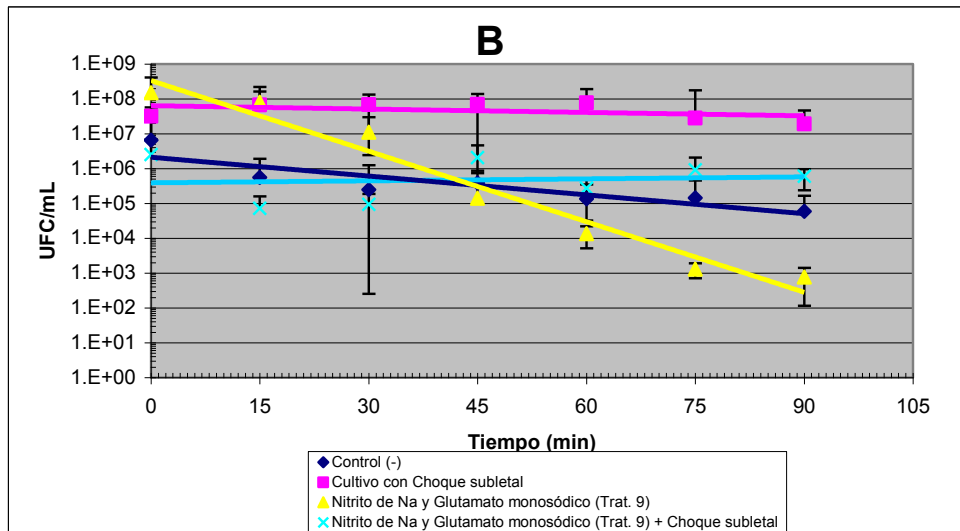
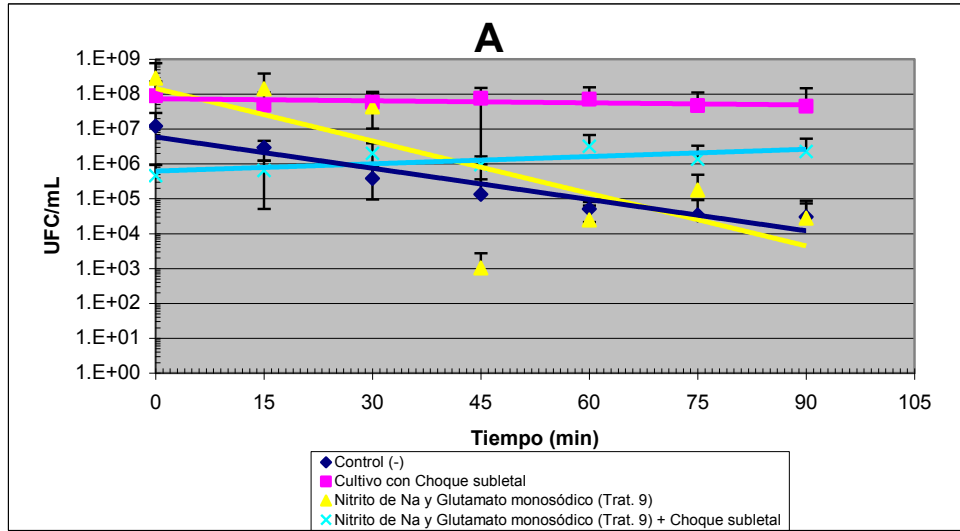


FIGURA 9. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.

**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

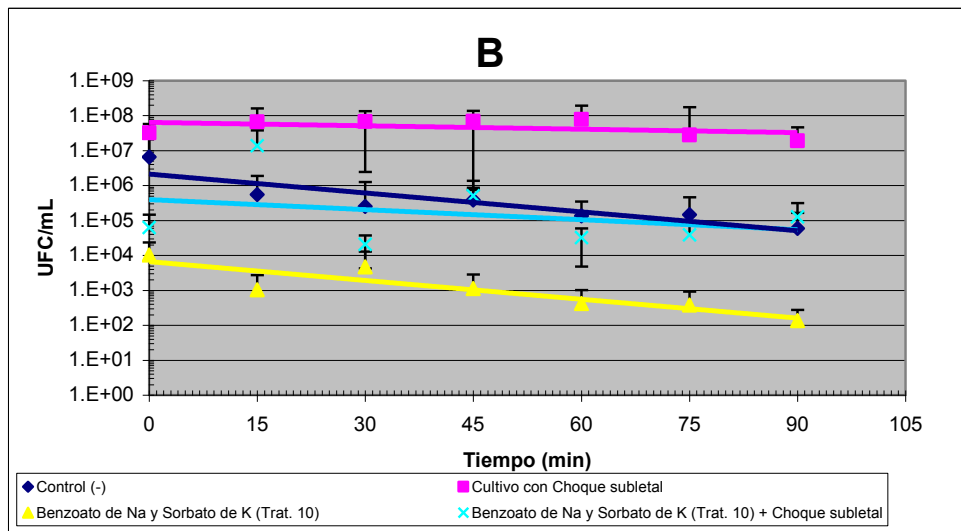
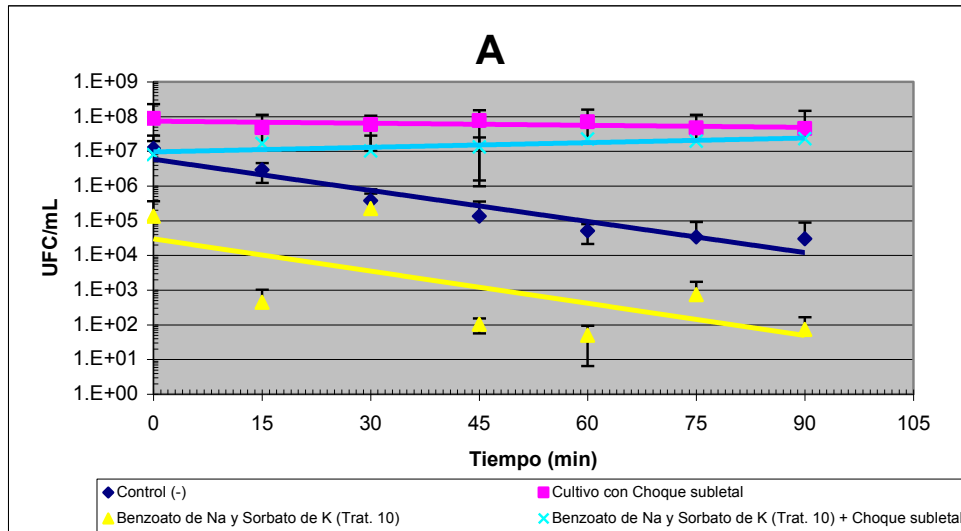


FIGURA 10. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125% y Sorbato de potasio 0.05%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

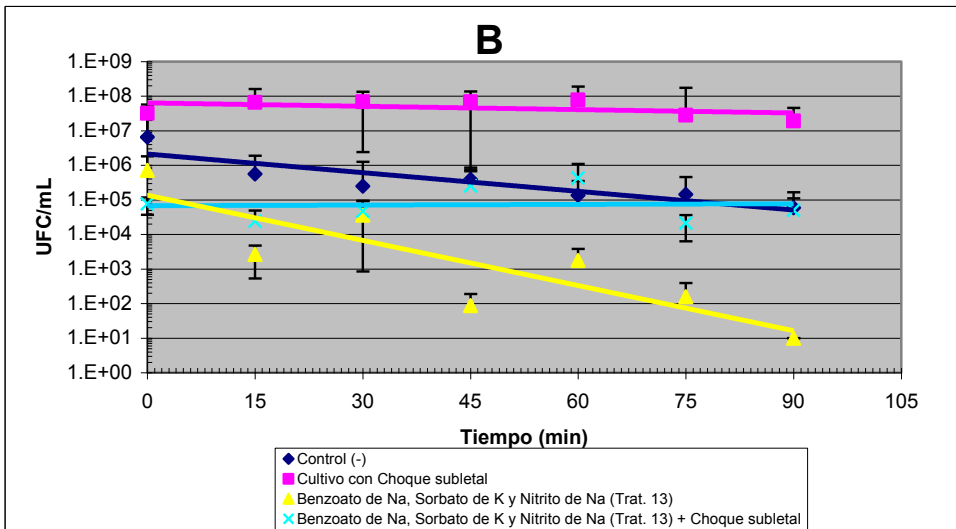
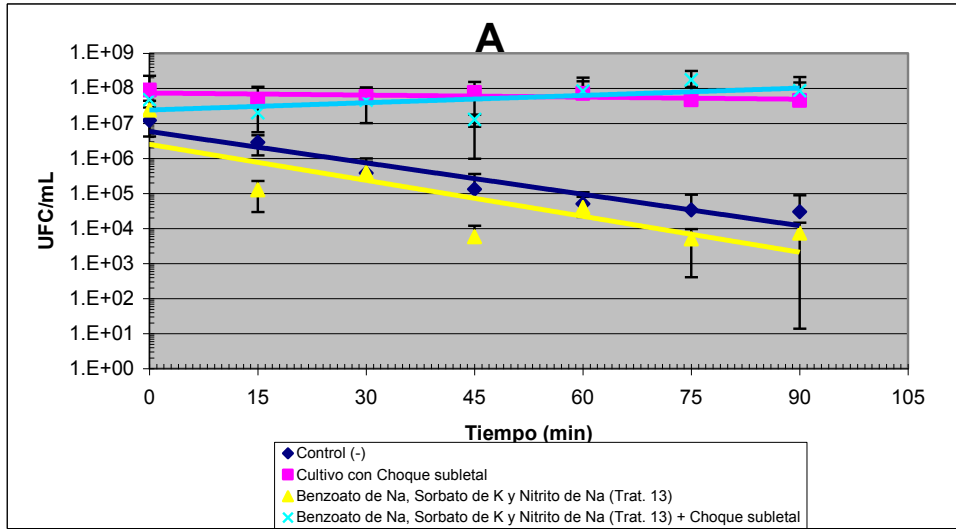


FIGURA 11. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05% y Nitrito de sodio 180 ppm.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

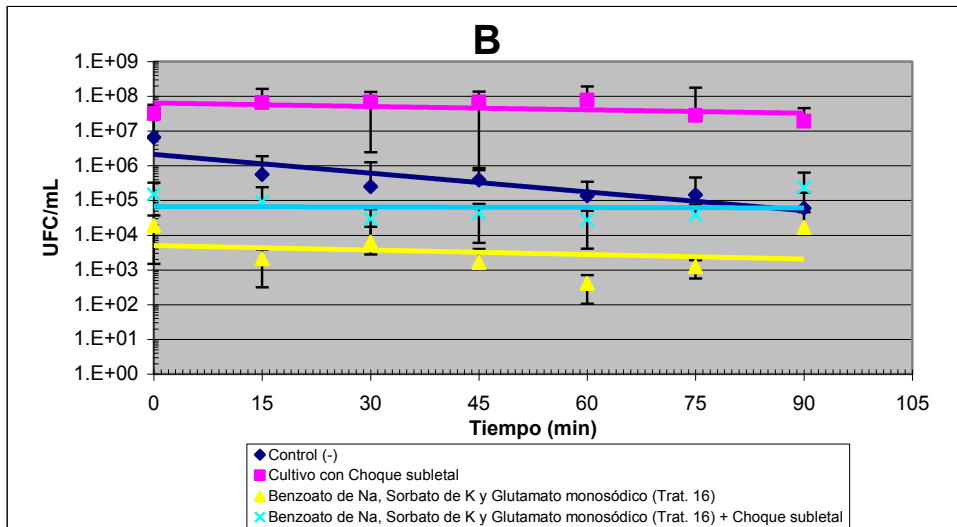
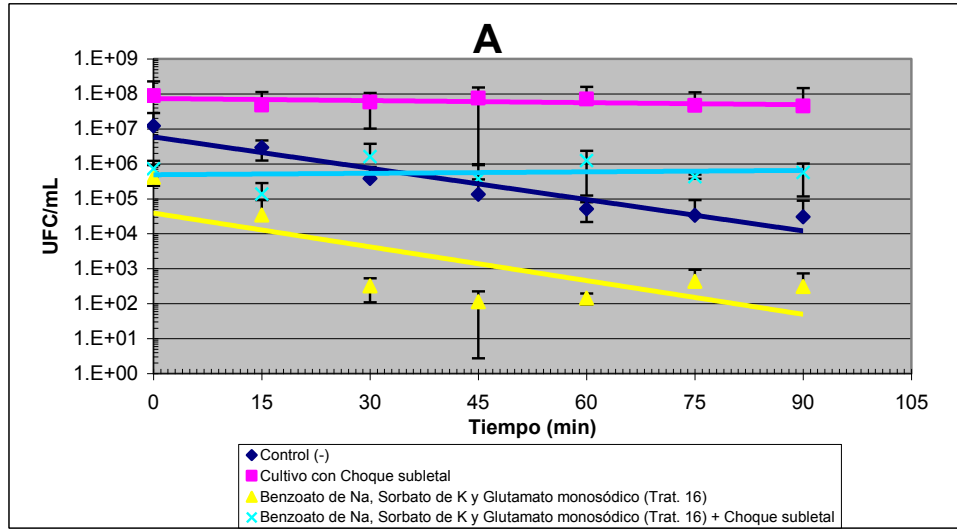


FIGURA 12. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05% y Glutamato monosódico 0.15%.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)



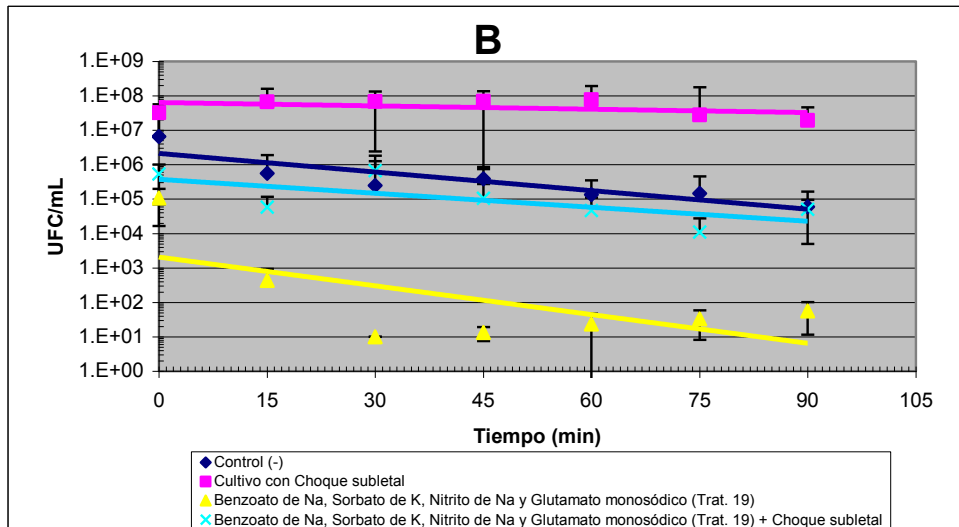
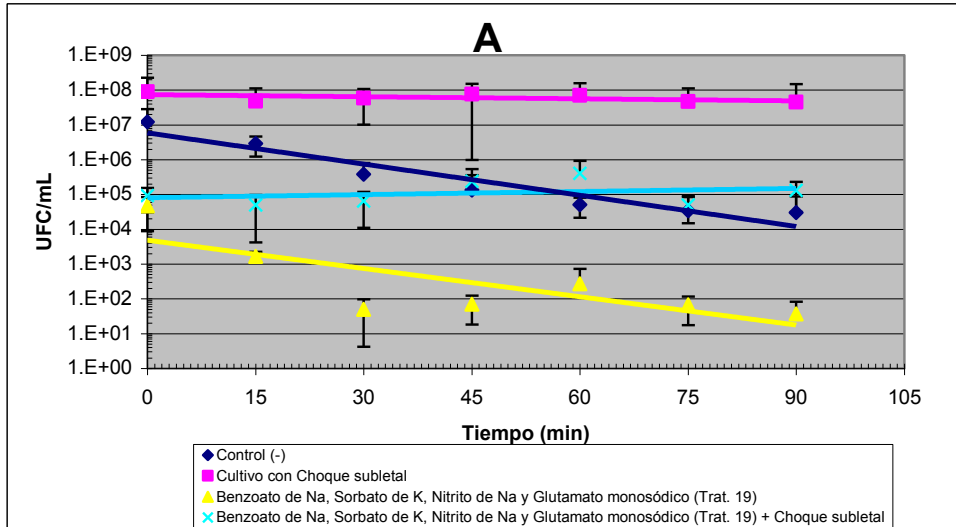


FIGURA 13. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.1125%, Sorbato de potasio 0.05%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

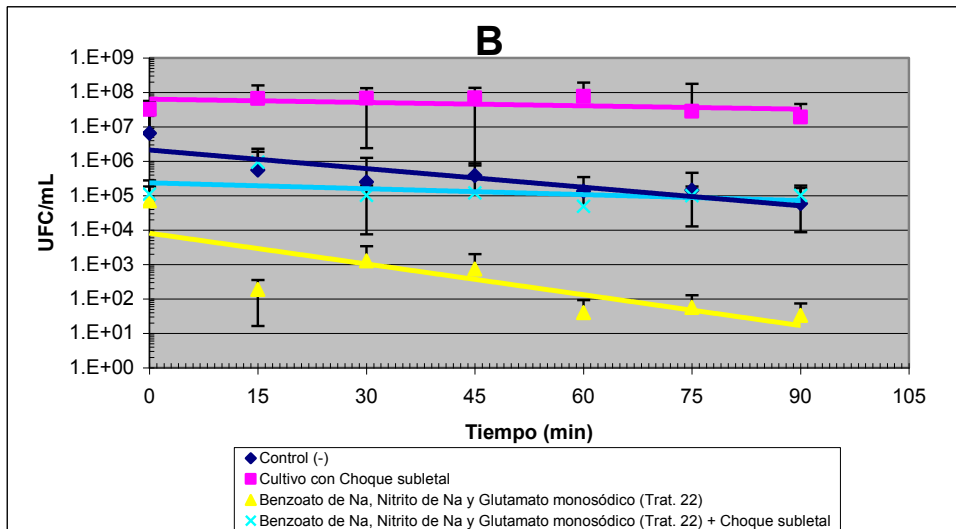
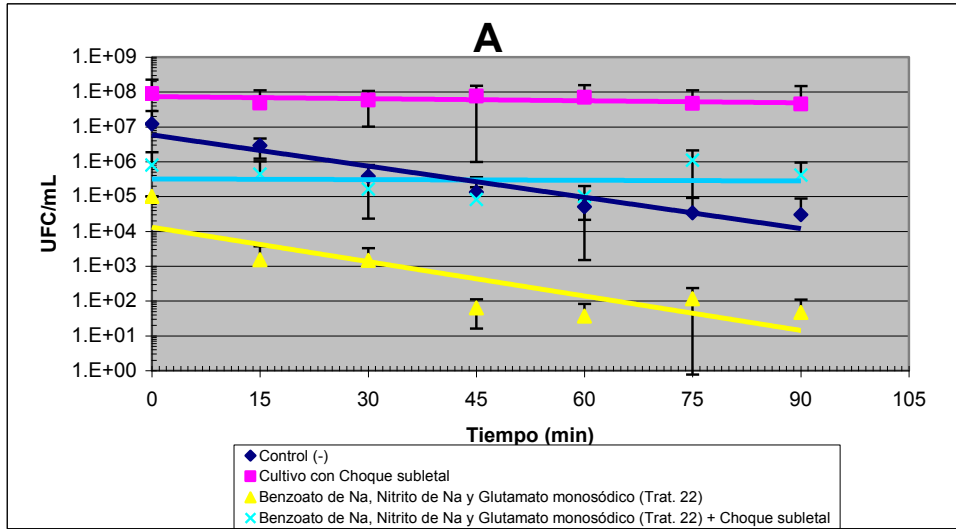


FIGURA 14. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.15%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados nos muestran que *Clostridium perfringens*, es capaz de adquirir tolerancia al frío al ser sometido previamente a una temperatura subletal fría de 28°C por 60 min., tal y como lo había reportado Villarreal *et al.* (2002) para esta bacteria, así como otros autores para otros microorganismos como *E. coli* (Jones, P.G. *et al.*, 1987, Goldstein, W.A. *et al.* 1990; Elhanafi, D. *et al.*, 2004). También se ha reportado la capacidad de crecimiento de *C. perfringens* en temperaturas frías, si la temperatura es disminuida gradualmente y en tiempos largos (Doyle, E. 2002), lo que concuerda con la adquisición de tolerancia observada en este trabajo, ya que en otras investigaciones en las que no se exponía a las células a una temperatura de adaptación demostraron que la bacteria no fue capaz de crecer a 10°C (Jong, A.E., F.M. Rombouts, and R.R. Beumer, 2004); lo anterior demostró la importancia de usar los métodos adecuados de cocimiento y refrigeración para prevenir el riesgo de enfermedad por este microorganismo (Kalinowski, R.M. *et al.*, 2003).

Por otro lado, considerando la gran difusión del empleo de agentes conservadores y sustancias G.R.A.S., encontramos que las sustancias seleccionadas para este trabajo, es decir, el benzoato de sodio, sorbato de potasio, nitrito de sodio y glutamato monosódico, no provocaron la muerte a *C. perfringens* a las concentraciones de uso recomendadas, tal y como se ha visto para otras bacterias que sobreviven a la presencia de agentes conservadores como *Clostridium sporogenes*, en presencia de sorbato de potasio (Ronning, I.E. y H.A. Frank, 1989) o el caso reportado por Kouassi y Shelef (1995) para *Listeria monocytogenes*, que sobrevivió a la presencia del sorbato de potasio; sin embargo en ambos casos los microorganismos fueron afectados en sus funciones metabólicas. Aunque hay reportes en *C. perfringens* de una concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) provocada por ácido benzoico a 2.2 mg/mL, se reconoce también que es un valor mucho mayor comparando la CMI de dicha sustancia para otras bacterias, y también el empleo de ácido sórbico demostró la presencia de cepas

resistentes a este conservador (Banerjee, M. and P.K. Sarkar, 2004). En estudios con benzoato de sodio demostraron que no tuvo actividad bactericida contra *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *L. monocytogenes* ni *Salmonella enterica* (Friedman, M., P.R. Henika, and R.E. Mandrell, 2003). Esto demostró la capacidad de los microorganismos a resistir el empleo de sustancias antimicrobianas, así como para antisépticos y desinfectantes (McDonnell, G. y A.D. Russell, 1999).

En nuestros ensayos en el tratamiento con el glutamato monosódico (tratamiento 4), no se observó un efecto por si solo de esta sustancia en la adquisición de tolerancia, pero al combinarse con la exposición a la temperatura subletal de 28°C, se observó un crecimiento de la bacteria, lo que sugirió un efecto sinérgico provocando el incremento de la tolerancia a 10°C. Esto pudiera estar en concordancia con investigaciones en *E. coli*, donde la presencia del glutamato monosódico incrementó la tolerancia de la bacteria al ácido (Lin, J. *et al.*, 1996).

Como ya se ha mencionado, el efecto de los ingredientes añadidos al ambiente donde se encuentran los microorganismos afectan en diferente grado, como la adición de ácidos orgánicos débiles (por ejemplo el ácido benzoico y el ácido sórbico), los cuales dependiendo de su concentración y del tipo de microorganismo pueden afectar en el mantenimiento del pH, interrumpiendo el transporte de sustratos o inhibiendo vías metabólicas (Beales, N., 2004). Esto puede explicar lo observado en nuestros resultados, ya que aunque el conservador no eliminó al microorganismo si puede haberlo afectado en cualquiera de sus funciones. Incluso este mismo efecto ha sido reportado con algunos antibióticos dependiendo de la concentración y tipo usado, como lo reportaron Drimmond, *et al.* (2003) quienes emplearon dosis menores de la CMI de antibióticos contra *C. difficile* y observaron en algunas cepas retraso en el crecimiento de la bacteria y producción mas temprana de toxinas.

Se ha reportado además que la exposición a agentes antimicrobianos provocan que algunas células de la población mueran, en tanto que otras van a ser resistentes de forma natural (Davidson, P.M. y M.A. Harrison, 2002), lo que puede provocar una

disminución de la población pero las sobrevivientes continuarían su desarrollo. Esta observación pudiera ayudar a entender el porque en algunos tratamientos nuestros (tratamientos 5, 10, 11, 16, 18, 22 y 23, entre otros), se redujera la población al exponerse a las sustancias G.R.A.S. e iniciara los ensayos de la exposición a temperatura de 10°C en cuentas claramente mas bajas que la de los cultivos no tratados.

También se ha reportado para algunos microorganismos, como *E. coli* (Buchanan, R.L. *et al.*, 2004), que dependiendo del agente conservador que se esté usando (un acidulante por ejemplo), la resistencia adquirida a un estrés en particular (radiación) puede variar. Esto puede ser comparado con nuestros resultados, donde dependiendo de la sustancia o mezcla de sustancias G.R.A.S. y su concentración se observó un comportamiento variable en cuanto a los grados de adquisición o pérdida de la tolerancia a 10°C de *C. perfringens* entre los diferentes tratamientos.

El efecto de la concentración de pirofosfato de sodio (0.15-0.3%) sobre la tolerancia al calor de *C. perfringens* presente en alimentos se ha estudiado y se ha encontrado que disminuye la resistencia térmica de esta bacteria (Juneja, V.K., and B.S. Marmer, 1998). Esto coincide con nuestros resultados al utilizar otras sustancias G.R.A.S., lo que nos manifiesta la relevancia de nuestro estudio, ya que el conocer el comportamiento de los agentes patógenos en relación a los ingredientes de los alimentos es sumamente importante para tomar medidas adecuadas para evitar el riesgo de enfermedades provocadas por esta bacteria.

Los resultados obtenidos y analizados en este trabajo nos permiten aceptar nuestra hipótesis de que la presencia de las sustancias G.R.A.S., en particular las que nosotros empleamos, si afectan la capacidad de adquirir tolerancia al frío de *Clostridium perfringens*.

## CONCLUSIONES

La presencia de sustancias G.R.A.S. si afecta estadísticamente la capacidad de adquisición de tolerancia al frío en *C. perfringens* FD1 y FD1041.

La exposición a un choque subletal frío de 28°C es un factor importante para la adquisición de tolerancia al frío ( $p<0.05$ ).

La presencia de las sustancias G.R.A.S. analizadas, provocan un comportamiento errático en la adquisición de la tolerancia en *C. perfringens*.

Los tratamientos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18 y 19 provocan la adquisición de tolerancia a 10°C en *C. perfringens* al añadirse al medio de cultivo ( $p<0.05$ ), e incluso tendencia al crecimiento a 10°C, al menos en una de las cepas estudiadas.

Los tratamientos 2, 8, 12, 15, 20, 21, 22 y 23, solo provocan la adquisición de tolerancia estadísticamente significativa al menos en una de las cepas de *C. perfringens* estudiadas, pero sin promover el crecimiento de la población bacteriana a 10°C.

El tratamiento 1 provoca adquisición de tolerancia en la cepa *C. perfringens* FD1041, aun sin la exposición al choque subletal de 28°C por 60 min. ( $p<0.05$ ).

Los tratamientos 3, 11, 12, 16 y 17 provocan adquisición de tolerancia a 10°C en la cepa *C. perfringens* FD1 sin requerir de la exposición al choque subletal de 28°C por 60 min. ( $p<0.05$ ).

# **ANEXO 1**

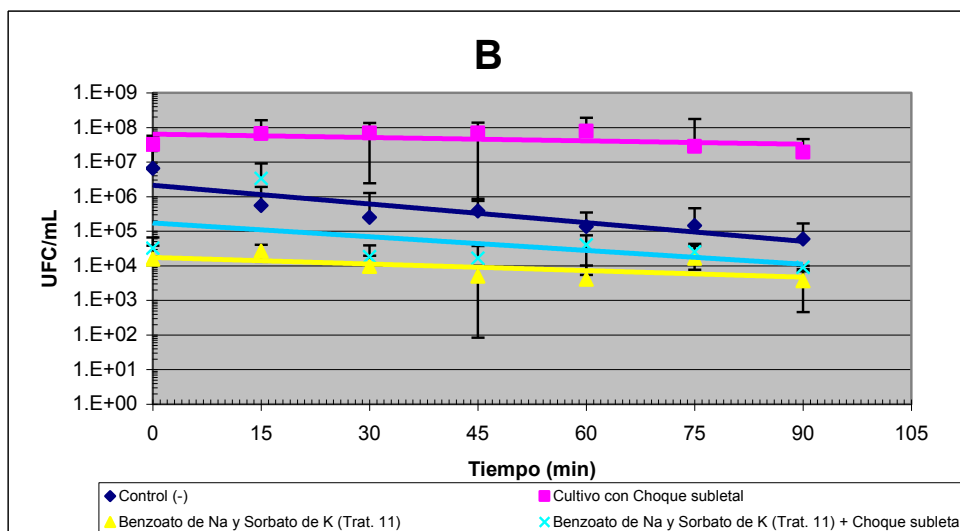
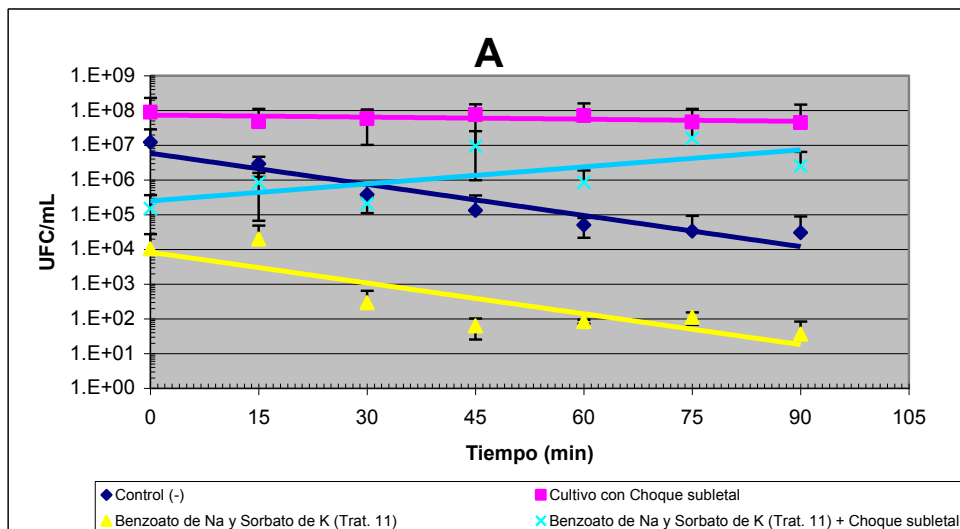


FIGURA 15. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075% y Sorbato de potasio 0.1%.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)



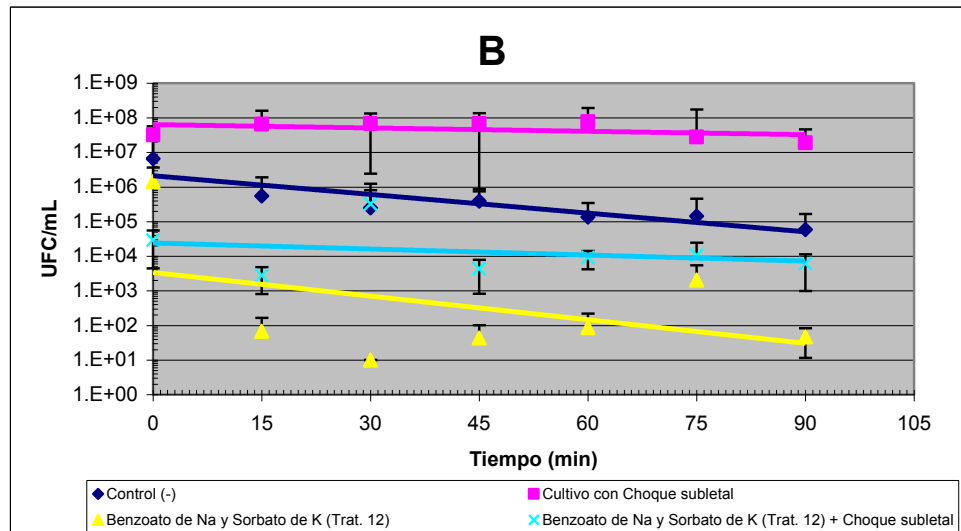
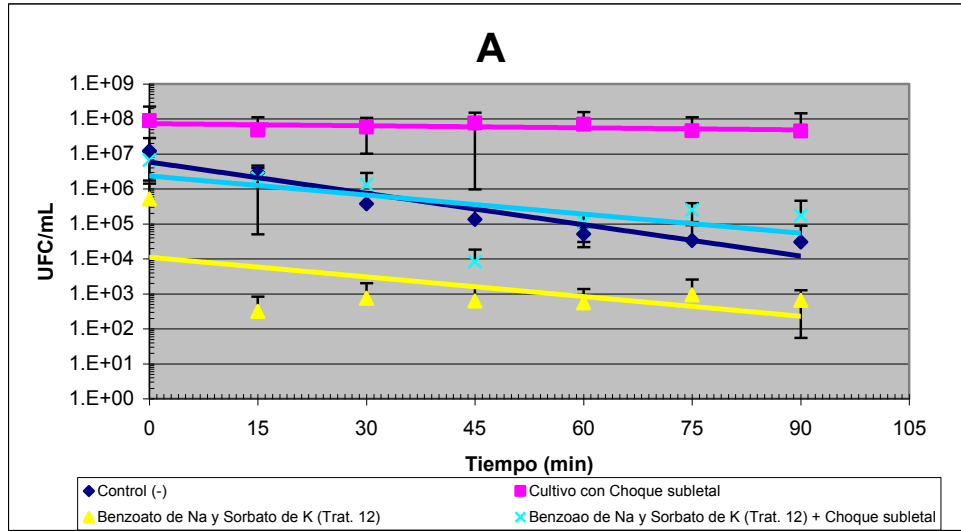


FIGURA 16. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375% y Sorbato de potasio 0.15%.

**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

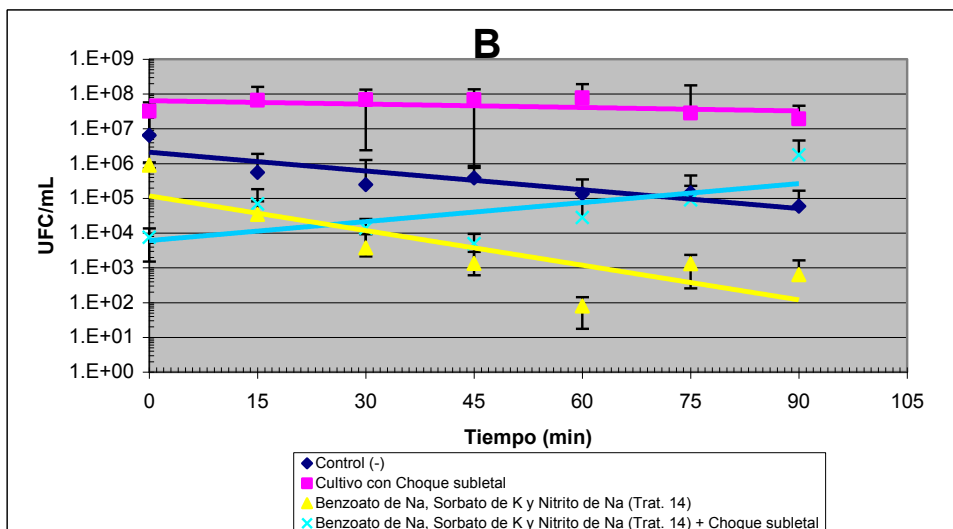
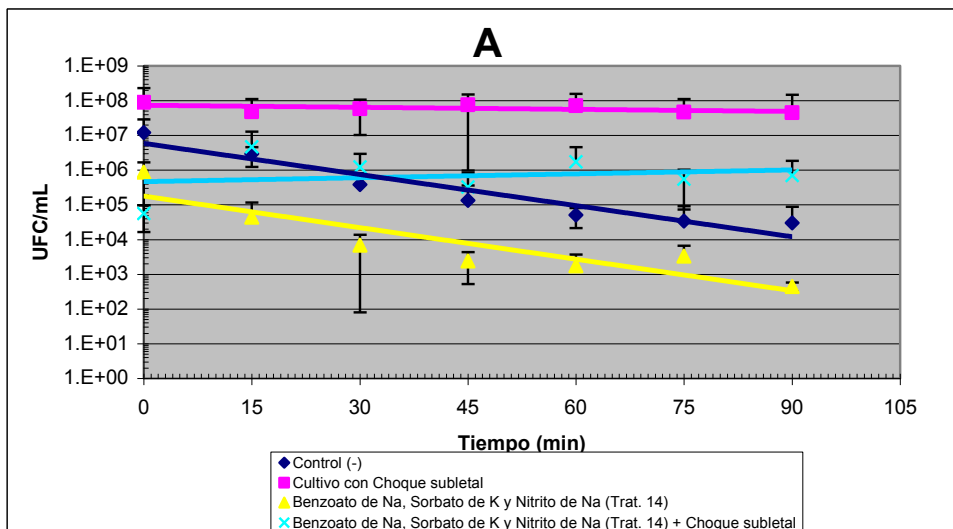


FIGURA 17. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1% y Nitrito de sodio 180 ppm.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

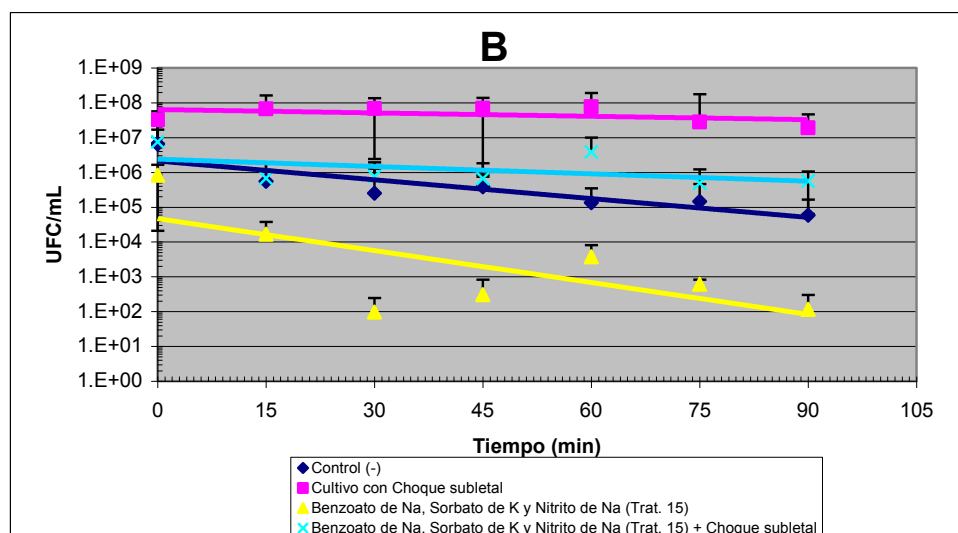
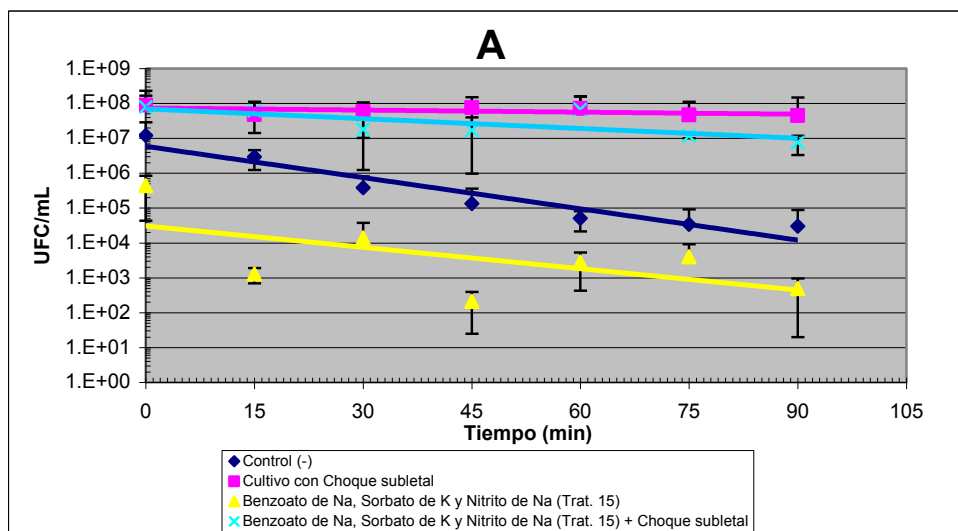


FIGURA 18. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15% y Nitrito de sodio 180 ppm.

A: *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) B: *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

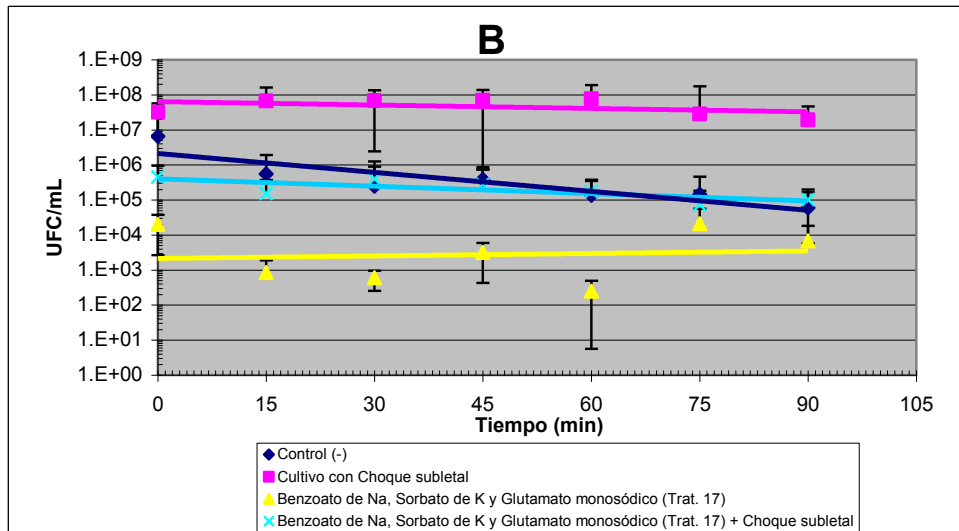
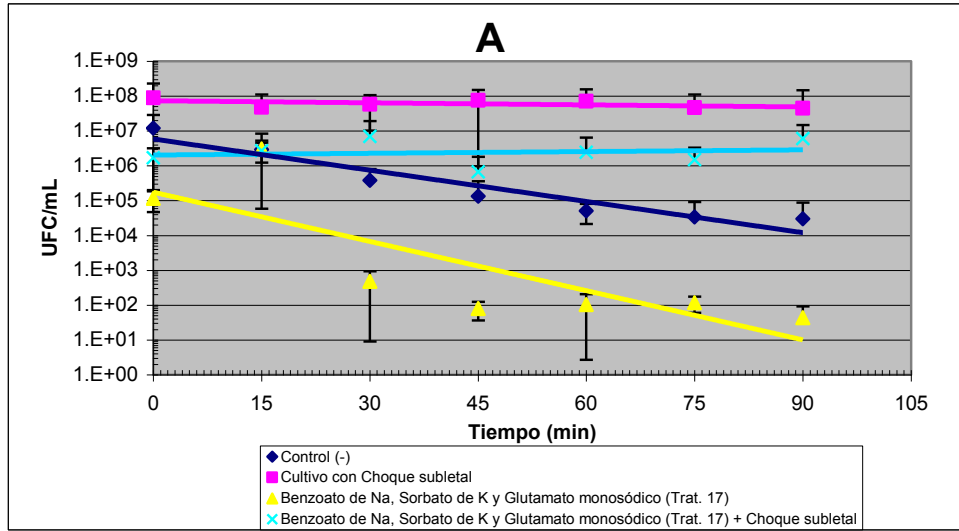


FIGURA 19. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1% y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

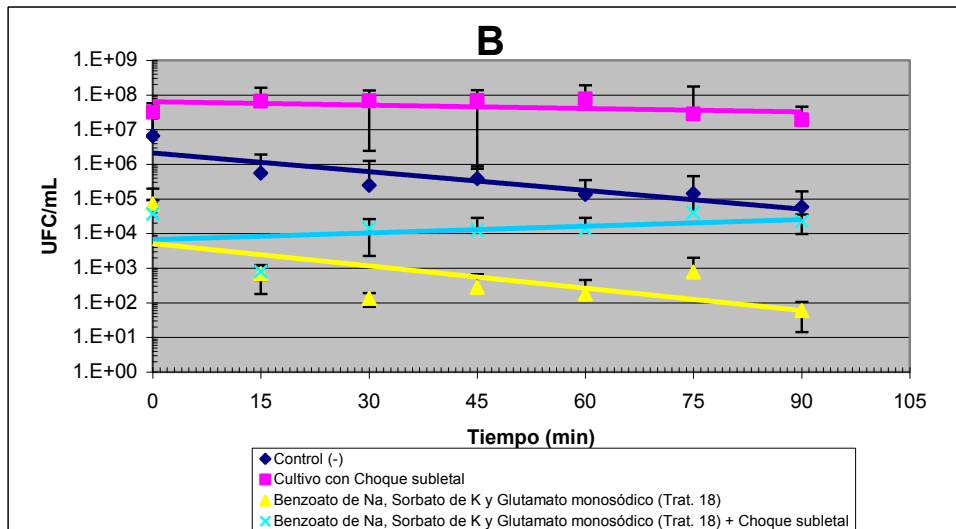
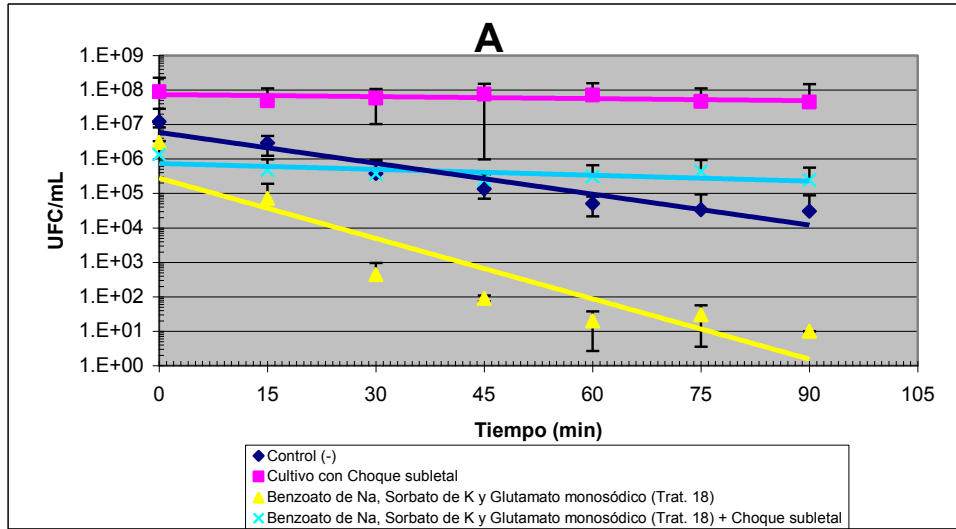


FIGURA 20. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15% y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

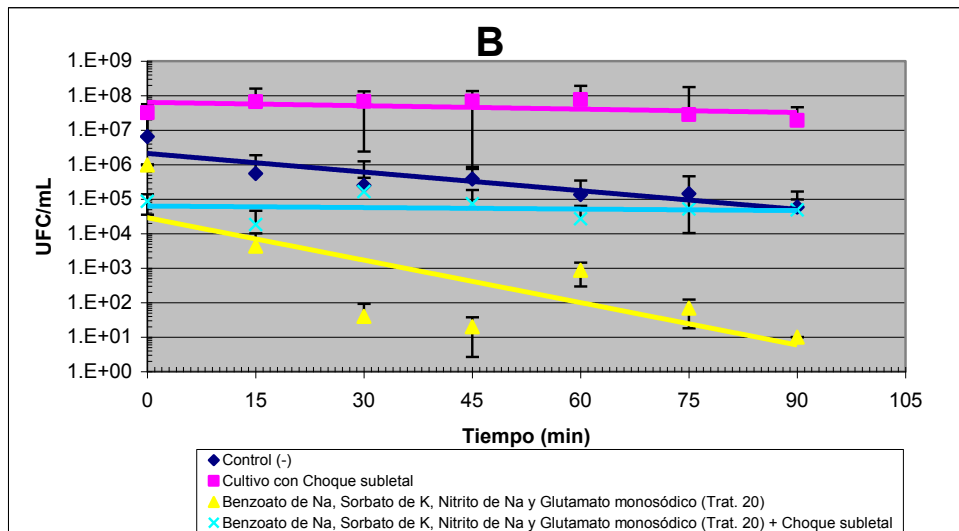
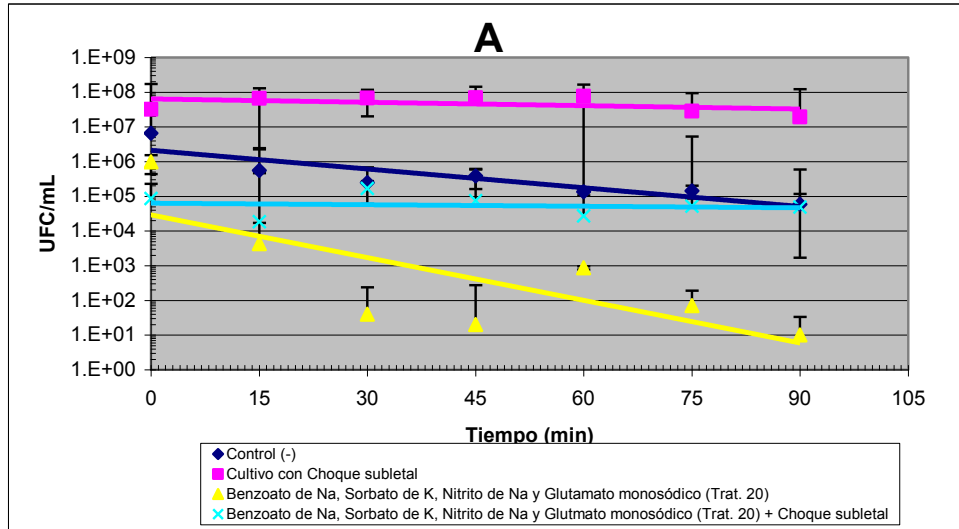


FIGURA 21. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.075%, Sorbato de potasio 0.1%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

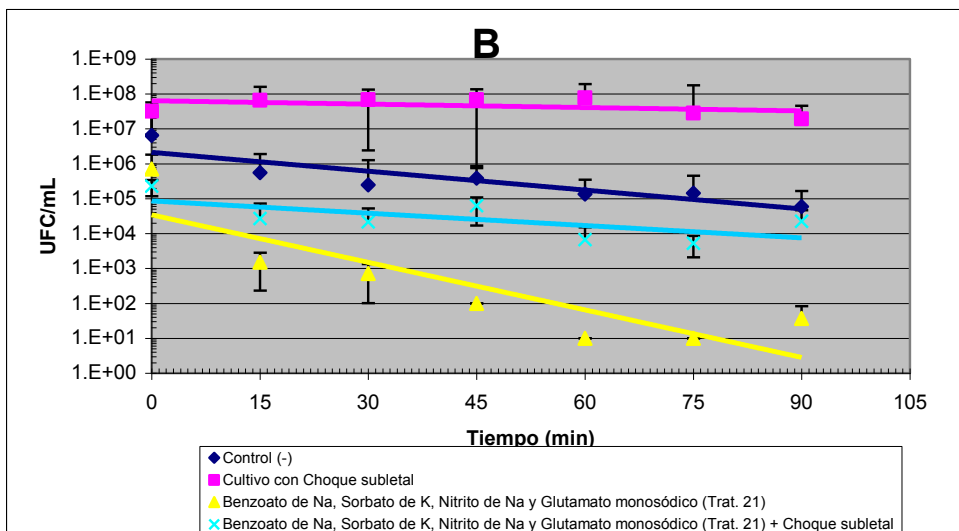
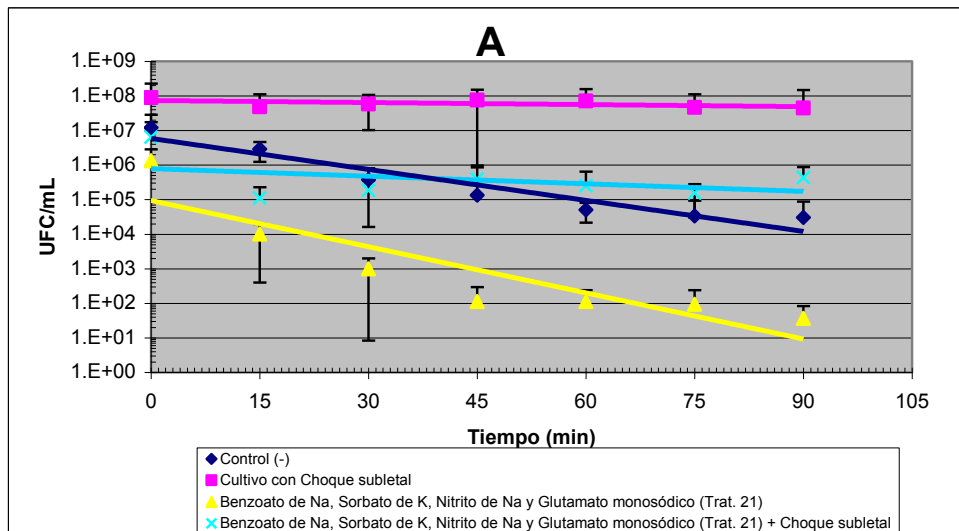


FIGURA 22. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Benzoato de sodio 0.0375%, Sorbato de potasio 0.15%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.  
**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)

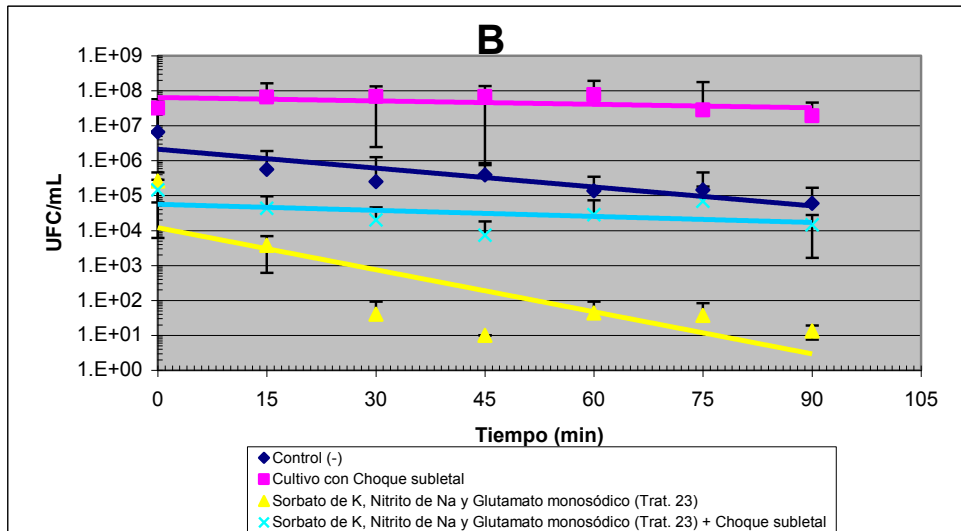
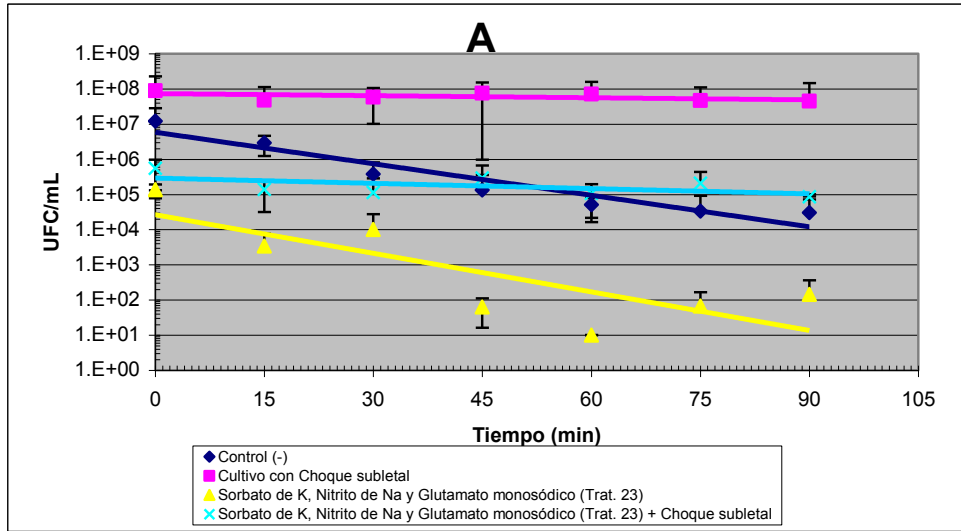


FIGURA 23. Curvas de sobrevivencia de *Clostridium perfringens* al ser expuesto a una temperatura letal de 10°C, con o sin exposición previa a un prechoque subletal de 28°C por 60 minutos y en presencia o ausencia de una mezcla de Sorbato de potasio 0.2%, Nitrito de sodio 180 ppm y Glutamato monosódico 0.15%.

**A:** *C. perfringens* FD1041 (Enterotoxigénica) **B:** *C. perfringens* FD1 (No enterotoxigénica)



## LITERATURA CITADA

1. Allwood, M.C., and A.D. Russell. 1967. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 15 (6):1266-1269.
2. Allwood, M.C., and A.D. Russell. 1969. Growth and metabolic activities of heat treated *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bact.* 32:79-85.
3. Alvarez, M.G. 2002. Respuesta de *Vibrio cholerae* a condiciones subletales de acidez y jugo biliar humano. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, México.
4. Arnosti, D.N., V.L. Singer, and M.J. Chamberlin. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 168: 1243-1249.
5. Banerjee, M., and P.K. Sarkar. 2004. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. *Food Microbiol.* 21: 335-342.
6. Bayles, D.O., B.A. Annous, and B.J. Wilkinson. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *App. Environ. Microbiol.* 62:1116-1119.
7. Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 3:1-20.

8. Berg, G.R., W.E. Inniss, and J.J. Heikkila. 1987. Stress proteins and thermotolerance in psychrotrophic yeasts from arctic environments. *Can. J. Microbiol.* 33: 383-389.
9. Blocher J.C. and F.F. Busta. 1985. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *J. Appl. Bacteriol.* 59:469-478.
10. Boutibonnes, P., J.C. Giard, A. Hartke, B. Thammavongs, and Y. Auffray. 1993. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 47-55.
11. Buchanan R.L., S.G. Edlson-Mammel, G. Boyd, and B.S. Marmer. 2004. Influence of acidulant identity on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 21:51-57.
12. Burdock, G.A. and I.G. Carabin. 2004. Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicology Letters* 150 (1):3-18.
13. Cheng L., and P.W. Piper. 1994. Weak acid preservatives block the heat shock response and heat-shock-element-directed lacZ expression of low pH *Saccaromyces cerevisiae* cultures, an inhibitory action partially relieved by respiratory deficiency. *Microbiol.* 140:1085-1096.
14. Davidson, P.M. and M.A. Harrison. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology.* 56:69-78
15. Dock L.L., J.D. Floros and R.H. Linton. 2000. Heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider containing malic acid, sodium benzoate, and potassium sorbate. *J. Food Prot.* 63:1026-1031.

16. Doyle E. 2002. Survival and growth of *Clostridium perfringens* during the cooling step of thermal processing of meat products. FRI Briefings. Food Research Institute. University of Wisconsin-Madison.
17. Drummond, L.J., D.G.E. Smith, and I.R. Poxton. 2003. Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. J. of Medical Microbiology. 52: 1033-1038.
18. Elhanafi, D., B. Leenanon, W. Bang, and M.A. Drake. 2004. Impacto of cold and cold-acid stress on poststress tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot. 67:19-26.
19. FDA. Code of Federal Regulation 21 Part 170 Sec 30. Food and Drug Administration, U.S. Government. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
20. Flowers R.S., Scott E. Martin, Dennis G. Brewer and Z. John Ordal. 1977. Catalase and enumeration of stressed *Staphylococcus aureus* cells. Appl. Envir. Microbiol. 33:1112-1117.
21. Friedman, M., P.R. Henika, and R.E. Mandrell. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Prot. 66:1811-1821.
22. García, M.G.A. 1996. Efecto de un choque térmico subletal sobre la termotolerancia de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, México.
23. Garcia S., J.C. Limon and N.L. Heredia. 2001. Cross protection by heat and cold shocks to lethal temperatures in *Clostridium perfringens*. Brazilian J. Microbiol. 32:110-112.

24. Goldstein, W.A., N.S. Pollit and M. Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:283-287.
25. Haight, R.D. and Z.J. Ordal. 1968. Thermally induced degradation of staphylococcal ribosomes. Can. J. of Microbiol. 15:15-19.
26. Humprey, T.J., N.P. Richardson, A.H.L. Gawler and M.J. Allen. 1991. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. Lett. Appl. Microbiol. 12:258-260.
27. Hurst A., Ashton Hughes and David L. Collins-Thompson. 1974. The effect of sublethal heating on *Staphylococcus aureus* at different physiological ages. Can. J. Microbiol. 20:765-768.
28. Hurst A., A. Hughes and R. Pontefract. 1980. Mechanism of the temperature protective effect of salts on *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol. 26:511-517.
29. Islam M., J. Chen, M.P. Doyle and M. Chinnan. 2002. Effect of selected generally recognized as safe preservative sprays on growth of *Listeria monocytogenes* on chicken luncheon meat. J. Food Prot. 65:794-798.
30. Islam M., J. Chen, M.P. Doyle and M. Chinnan. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally-recognized-as-safe preservatives. J. Food Prot. 65:1411-1416.
31. Jaatela, M. And D. Wissing. 1992. Emerging role of heat shock proteins in Biology and Medicine. Ann. Med. 24:249-258.

32. Jaatela, M. and D. Wissing. 1993. Heat Shock Proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J. exp. Med.* 177:231-236.
33. Jackson H. 1974. Loss of viability and metabolic injury of *Staphylococcus aureus* resulting from storage at 5°C. *J. appl. Bact.* 37:59-64.
34. Jones, P.G., R.A. VanBolegen and F.C. Neidhert. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:2092-2095.
35. Jong, A.E., F.M. Rombouts, and R.R. Beumer. 2004. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 97:71-80.
36. Juneja, V.K. and B.S. Marmer. 1998. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* vegetative cells in ground beef and turkey as affected by sodium pyrophosphate. *Food Microbiology.* 15:281-287.
37. Kalinowski, R.M., R.B. Tompkin, P.W. Bodnaruk, and W. Payton Pruett, Jr. 2003. Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. *J. Food Prot.*, 66(7):1227-1232.
38. Kolsarici N. and K Candogan. 1995. The effects of potassium sorbate and lactic acid on the shelf-life of vacuum-packed chicken meats. *Poult. Sci.* 74:1884-1893.
39. Kouassi Y. and L.A. Shelef. 1995. Listeriolysin O secretion by *Listeria monocytogenes* in the presence of cysteine and sorbate. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:295-299.
40. Labbé R.G., and S. García. 2001. Guide to foodborne pathogens. John Wiley & Sons, Inc., U.S.A. 373 pp.

41. Lin, J., M.P. Smith, K.C. Chapin, H.S. Baik, G.K. Bennet and J.W. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 62:3094-3100.
42. Love, B.C. and D.C. Hirsh. 1994. *Pasteurella multocida* produces heat shock proteins in turkeys. Infect. Immun. 62:1128-1130.
43. Luck E. 1990. Food Applications of sorbic acid and its salts. Food Addit. Contam. 7:711-715.
44. Luevanos, R.R. 1995. Efecto de un choque térmico subletal sobre la termorresistencia de esporas de *Clostridium perfringens* tipo A. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L.
45. Mackey, B.M. and D.C. Derrick. 1986. Elevation of heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. J. Appl. Microbiol. 61: 389-393.
46. Mackey, B.M. and C.M. Derrick. 1987. The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. Lett. Appl. Microbiol. 5:115-118.
47. Mantis, N.J. and S.C. Winans. 1992. Characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* heat shock response: Evidence for a sigma 32-like sigma factor. J. Bacteriol. 174:991-997.
48. McClane, B.A. 1997. *Clostridium perfringens*, p. 305-326. In Doyle, M.P., L.R. Beuchat and T.J. Montville. Food (ed), Microbiology Fundamentals and frontiers. ASM Press.

49. McDade, J.J., L.B. Hall and A.R. Street. 1964. Survival of *Staphylococcus aureus* in the environment. *Am. J. Hyg.* 80 (2):184-191.
50. McDonnell G., and A. Denver Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147-179.
51. Morimoto, R.I., A. Tissieres and C. Gerogopoulos. 1990. The stress response, function of proteins and perspectives. In Morimoto, R.I., A. Tissieres and C. Gerogopoulos (ed). *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A., p.p. 1-59.
52. Patel, B.K., D.K. Banerjee and P.D. Butcher. 1991. Characterization of the heat shock response in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 173:7982-7987.
53. Roberts, M.E. and W.E. Inniss. 1992. The synthesis of cold shock proteins and cold acclimation proteins in the psychrophilic bacterium *Aquaspirillum arcticum*. *Curr. Microbiol.* 25:275-278.
54. Ronning I.E. and H.A. Frank. 1989. Morphological changes in putrefactive anaerobe 3679 (*Clostridium sporogenes*) induced by sorbate, hydrochloric acid, and nitrite. *Can. J. Microbiol.* 35:388-398.
55. Roy, R.J., F.F. Busta and D.R. Thompson. 1981. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. *J. Food Sci.* 46:1586-1591.
56. Samelis J., J.N. Sofos, M.L. Kain, J.A. Scanga, K.E. Belk and G.C. Smith. 2001. Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inoculated following processing of sliced pork bologna stored at 4 degrees C in vacuum packages. *J. Food Prot.* 64:1722-1729.

57. Schlesinger, M.J. 1988. Function of heat shock proteins. ISI Atlas of Science: Biochemistry. 161-164.
58. Sharkey, F.H., S.I. Markos, and R.W. Haylock. 2004. Quantification of toxin-encoding mRNA from *Clostridium botulinum* type E in media containing sorbic acid or sodium nitrite by competitive RT-PCR. FEMS Microbiology Letters. 232:139-144.
59. Steel, Robert G.D. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2a. ed. McGraw Hill. Pp. 231-262.
60. Thomas L.V., J.W. Winpenny and J.G. Davis. 1993. Effect of three preservatives on the growth of *Bacillus cereus*, Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, on plates with gradients of pH and sodium chloride concentration. Int. J. Food Microbiol. 17:289-301.
61. Verrips C.T. and Renee van Rhee. 1981. Heat inactivation of *Staphylococcus epidermidis* at various water activities. Appl. Envir. Microbiol. 41:1128-1131.
62. Villarreal L, N.L. Heredia and S. Garcia. 2000. Changes in protein synthesis and acid tolerance in *Clostridium perfringens* type A in response to acid shock. Internatl. Microbiol. 3:113-116.
63. Villarreal L, N.L. Heredia and S. Garcia. 2002. Cold tolerance and changes in rates of synthesis of individual proteins of *Clostridium perfringens* as a result of cold pre-treatment. Acta Alimentaria 31:179-184.
64. Völker, U., H. Mach, R. Schmid and M. Hecker. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. 138:2125-2135.



65. White, L.G. and W.E. Inniss. 1992 Cold Shock proteins and cold acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 38:1281-1285.
66. Willimsky, G., H. Bang, G. Fisher and M.A. Marahiel. 1992. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* 174:6326-6335.
67. Wouters, J.A., F.M. Rombouts, W.M. de Vos, O.P. Kuipers, and T. Abee. 1999. Cold shock proteins and low temperatures response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *App. Environ. Microbiol.* 65:4436-4442.
68. Zhao T., M.P. Doyle and R.E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Envir. Microbiol.* 59:2526-2530.

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Julio César Limón Gutiérrez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología

Tesis: EFECTO DE SUSTANCIAS GENERALMENTE RECONOCIDAS COMO SEGURAS (G.R.A.S.) Y MEZCLAS DE ELLAS SOBRE LA ADQUISICION DE TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS EN *Clostridium perfringens*.

Campo de Estudio: Fisiología de Microorganismos.

Biografía:

Datos personales: Nacido en Monclova, Coahuila el 9 de diciembre de 1972, hijo de Luis Limón Rivas y Catalina Gutiérrez Palos.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1996.

Experiencia Profesional: Industria de Alimentos, Investigación y Desarrollo de Nuevos Productos, Control de Calidad, Ventas y Asesoría Técnica.