

**MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA AL CALOR DE
Bacillus cereus INDUCIDAS POR LA UTILIZACIÓN DE
DIFERENTES LOTES DEL MEDIO DE RECUPERACIÓN**

**(APPARENT HEAT RESISTANCE OF *Bacillus cereus*
SPORES INDUCED BY LOTS OF
DIFFERENT RECOVERY MEDIA)**

Isaac
I. González Martínez*
M. Mazas Alberdi*
M. López Fernández**
J. González Prieto*
A. Bernardo Alvarez*

Palabras clave: *B. cereus*, resistencia al calor, seguridad de los alimentos
Key words: *B. cereus*, heat resistance, food safety

SUMMARY

The influence of several batches of Nutrient Agar and Plate Count Agar on the heat resistance of *Bacillus cereus* (ATCC 4342 y 9818) was investigated. The recovery counts were considerably modified by the use of different batches of these media. However, apparent D-values were never affected. Addition of 50 and 100 ppm of calcium to the recovery media improved the effectiveness, except the strain 9818 which when Nutrient Agar was supplemented with 100 ppm of calcium showed a decrease in apparent D-values.

RESUMEN

Se investigó la influencia de varios lotes de Agar Nutritivo y de Medio de Recuento en Placa sobre la termorresistencia de dos cepas de *Bacillus cereus* (ATCC 4342 y 9818). La utilización de diferentes lotes de estos medios modificó considera-

* Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Vigo.

An. Fac. Vet. 1992-1994, 38, 89-98

blemente las tasas de recuperación, sin embargo los valores D aparentes no se vieron afectados en ningún caso. La adición de 50 y 100 ppm de calcio a los medios de subcultivo mejoró su efectividad, excepto en el caso de la cepa 9818 al suplementar el Agar Nutritivo con 100 ppm de calcio, que se tradujo en un descenso de los valores D aparentes.

INTRODUCCIÓN

Aunque en sentido estricto las condiciones utilizadas en la recuperación de los esporos tratados por el calor no afectan a su termorresistencia, al determinarse ésta mediante el recuento del número de supervivientes a un cierto tratamiento, cualquier factor que influya en la recuperación de las estructuras dañadas puede modificar la forma de las gráficas de supervivencia y, en consecuencia a los tiempos de reducción decimal obtenidos. La influencia del medio de subcultivo sobre la aparente respuesta al calor de los microorganismos ha sido demostrada en numerosas ocasiones^{1, 5, 9, 12, 14, 15}, habiéndose puesto también de manifiesto al menos para *Bacillus stearothermophilus* que la efectividad de un determinado medio era dependiente del lote usado^{2, 10, 11, 16} o incluso que ésta variaba cuando se modificaba la concentración de alguno sus componentes²¹ o al emplear agar de distintas casas comerciales²⁰.

También en algún caso se ha podido comprobar la influencia que ejerce el contenido en minerales de los medios sobre la recuperación de los esporos como por ejemplo el calcio, que se sabe que resulta necesario al menos para *Bacillus stearothermophilus*^{6, 14, 18}.

En el caso particular de *Bacillus cereus*, el efecto que el medio de subcultivo ejerce sobre la recuperación ha sido escasamente estudiado. Únicamente Rajkowski y Mikolacijk¹⁷ y González y col.,⁸ comprobaron la eficacia de varios medios y sólo estos últimos autores pudieron demostrar que la utilización de diferentes medios además de afectar a las tasas de recuperación llegaba incluso a modificar los tiempos de reducción decimal obtenidos.

Este trabajo se ha planteado con el fin de comprobar si al usar diversos lotes de los dos medios que resultaron más eficaces en la recuperación de *Bacillus cereus*⁸, el Agar Nutritivo y el Medio de Recuento en Placa, se modificaba la respuesta al calor de este microorganismo. Asimismo, se investigó si la deficiencia de calcio era responsable de la baja eficacia de alguno de los lotes empleados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos:

Se utilizaron dos cepas de *B. cereus* de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC 4342 y 9818). Antes de proceder a su esporulación, fueron sometidas a varios pases en caldo nutritivo a 32°C durante 24 horas.

Medios

Para la esporulación se utilizó Agar Nutritivo (DIFCO) suplementado con 1 ppm de manganeso (MnSO₄·H₂O) de la siguiente composición: extracto de carne, 3 g; peptona de carne, 5 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro.

Para la recuperación de los esporos se usaron varios lotes de Agar Nutritivo (NA) y Medio de Recuento en Placa (PCA) de la casa DIFCO.

El Medio de Recuento en Placa contenía: bacto-triptona, 5 g; extracto de levadura, 2,5 g; dextrosa, 1 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro.

El calcio, en forma de Cl:Ca (PANREAC) se adicionó a los medios a las concentraciones de 50 y 100 ppm.

Preparación de las suspensiones de esporos

Se partió de un cultivo en caldo nutritivo de 24 horas de incubación a 32°C, que procedía de una única colonia aislada por estría en Agar Nutritivo e incubada a 32°C durante 24 horas. Los frascos de Roux se incubaron a 32°C durante aproximadamente 72 horas, tiempo en el que se alcanzó una tasa de esporulación del 95%, que se determinó por recuento directo al microscopio de contraste de fase.

Los esporos se recogieron por arrastre con perlas de vidrio y tampón McIlvaine pH 7,0¹³, eliminándose los restos de agar y grandes agregados por centrifugación a 600x g durante 5 minutos. La suspensión fue lavada y centrifugada a 2500x g 15 minutos, al menos cuatro veces. Posteriormente, se ajustó la concentración a 10⁸-10⁹ esporos/ml, por recuento en cámara de Thoma, y se almacenaron en el citado tampón a refrigeración hasta su uso.

Determinaciones de la termorresistencia

Se llevaron a cabo en un termorresitómetro TR-SC³, utilizando como medio de calentamiento tampón McIlvaine pH 7,0. Se utilizaron temperaturas de tratamiento de 100°C para la cepa 4342 y de 104°C para la cepa 9818.

Incubación y recuento de supervivientes

Se extrajeron alícuotas de 0,1-0,5 ml a los diferentes tiempos de tratamiento que se sembraron directamente sobre placas de petri que contenían los distintos medios de subcultivo y se incubaron durante 22 horas a 30°C.

Los recuentos se efectuaron por el método descrito por Condón y col.,⁴. Para la cepa 9818 fue necesario utilizar el sistema de diluciones, debido al crecimiento ramificado que presentaban las colonias.

Determinación de la tasa de supervivientes

La capacidad de recuperación de los esporos se comprobó en las diferentes condiciones de subcultivo, sometiendo un inóculo de cada una de las suspensiones a un tratamiento térmico, extrayendo alícuotas de 2,0-3,0 ml para el recuento de los supervivientes. Las muestras se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo antes de

proceder a sembrarlas en las diferentes condiciones ensayadas. Estos experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de recuperación de los esporos se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de esporos recuperados} = \frac{\text{ufc por placa en las diferentes condiciones}}{\text{ufc por placa en las condiciones óptimas}} \times 100$$

Determinación de los valores D

Los valores D se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de la recta de regresión obtenida al representar en ordenadas el logaritmo del número de supervivientes frente al tiempo de tratamiento a una temperatura determinada. La mayor parte de las gráficas de supervivencia obtenidas en la realización de este trabajo presentaban hombros al comienzo del tratamiento y algunas de ellas, pequeñas colas al final del mismo, que no fueron tenidas en cuenta para el cálculo de los correspondientes valores D. El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo aplicando la "t" de Student¹⁹.

RESULTADOS

La efectividad en la tasa de recuperación de tres lotes de Agar Nutritivo y dos del Medio de Recuento en Placa resultó prácticamente idéntica, sin embargo, en ambos casos encontramos con otro de los lotes empleados que el número de esporos

Tabla I

Valores D (min)* obtenidos para los esporos de *Bacillus cereus* recuperados utilizando dos lotes de Agar Nutritivo y Medio de Recuento en Placa.

CEPA		MEDIOS			
		NA (lote A)	NA (lote B)	PCA (lote A)	PCA (lote B)
4342	D ₁₀₀	0,99±0,11 ^a	0,96±0,10 ^a	0,87±0,11 ^a	0,90±0,09 ^a
9818	D ₁₀₄	1,37±0,17 ^a	1,30±0,12 ^a	1,42±0,11 ^a	1,37±0,14 ^a

NA: Agar Nutritivo; PCA: Medio de Recuento en Placa.

Lote A y B: lotes con los que se obtuvieron las mayores y menores tasas de recuperación respectivamente.

* Valores medios de tres experimentos ± desviación estándar.

^a Valores con el mismo superíndice para una misma cepa no fueron diferentes significativamente al 5%.

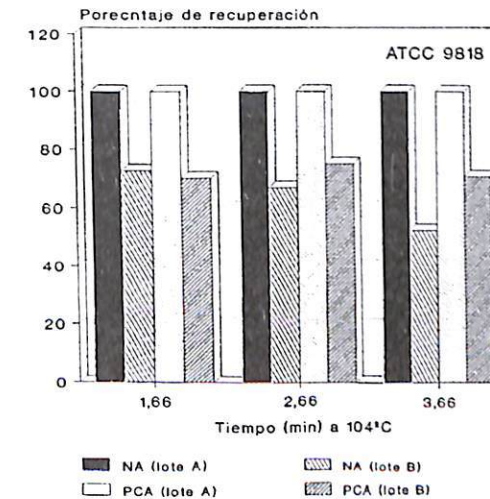
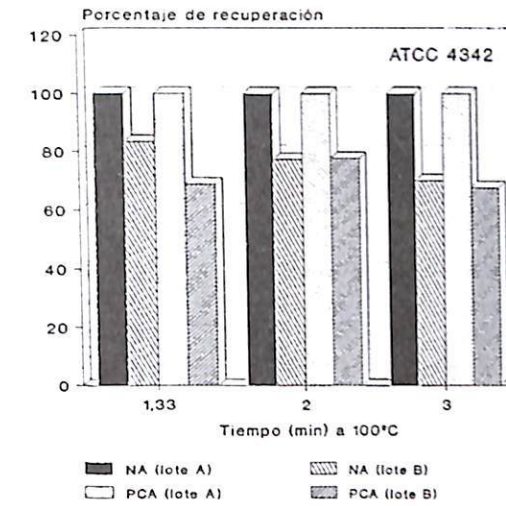


Fig. 1.- Porcentaje de recuperación de los esporos de *Bacillus cereus* en diferentes lotes de Agar Nutritivo (NA) y del Medio de Recuento en Placa (PCA).

$$\% \text{ de esporos recuperados} = \frac{\text{ufc por placa (lote B)}}{\text{ufc por placa (lote A)}} \times 100$$

Lote A y B: lotes con los que se obtuvieron las mayores y menores tasas de recuperación respectivamente.

Tabla II
Porcentajes de recuperación* obtenidos al utilizar un lote de baja eficacia de Agar Nutritivo y el Medio de Recuento en Placa tras la adición de calcio para los esporos de *Bacillus cereus*.

Cepa 4342	Tiempo de Tratamiento (min) a 100°C		
	1,33	2	3
NA	100,0 ± 8,6 ^a	100,0 ± 6,7 ^a	100,0 ± 17,9 ^a
NA+50 ppm Ca	102,0 ± 13,6 ^a	106,7 ± 8,9 ^a	136,7 ± 18,6 ^a
NA+100 ppm Ca	101,5 ± 10,0 ^a	114,2 ± 12,2 ^a	139,5 ± 18,5 ^b
PCA	100,0 ± 14,6 ^a	100,0 ± 9,8 ^a	100,0 ± 13,2 ^a
PCA+50 ppm Ca	92,1 ± 10,8 ^a	104,7 ± 13,6 ^a	91,9 ± 7,8 ^a
PCA+100 ppm Ca	100,6 ± 7,7 ^a	93,9 ± 12,6 ^a	86,0 ± 12,0 ^a
Cepa 9818	Tiempo de Tratamiento (min) a 104°C		
	1,66	2,66	3,66
NA	100,0 ± 9,5 ^a	100,0 ± 10,2 ^a	100,0 ± 13,9 ^a
NA+50 ppm Ca	150,9 ± 20,6 ^b	162,7 ± 23,0 ^b	136,9 ± 15,2 ^b
NA+100 ppm Ca	14,0 ± 1,8 ^c	11,3 ± 1,1 ^c	3,6 ± 0,3 ^c
PCA	100,0 ± 13,6 ^a	100,0 ± 15,0 ^a	100,0 ± 9,8 ^a
PCA+50 ppm Ca	122,0 ± 10,2 ^a	170,0 ± 10,3 ^b	220,0 ± 26,8 ^b
PCA+100 ppm Ca	107,7 ± 14,6 ^a	141,1 ± 17,3 ^c	200,1 ± 0,13 ^b

NA: Agar Nutritivo; PCA; Medio de Recuento en Placa.

Valores medios de tres experimentos ± coeficiente de variación.

^{a-c} Valores con distinto superíndice en la misma columna, para el mismo medio, fueron diferentes significativamente al 5%.

* Los porcentajes de recuperación se calcularon según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de esporos recuperados} = \frac{\text{ufc por placa en cada condición}}{\text{ufc por placa en el medio base}} \times 100$$

recuperados disminuía considerablemente, alcanzando porcentajes de recuperación en torno al 70% en el Medio de Recuento en Placa (PCA) con las dos cepas estudiadas y hasta del 50% en Agar Nutritivo con la cepa 9818. En la figura 1 se comparan los resultados obtenidos al utilizar el lote que resultó menos eficaz (Lote B) con los que daban lugar a una mayor efectividad (Lotes A).

En la tabla I se muestran los valores D obtenidos en las condiciones anteriormente señaladas. El análisis estadístico reveló que los tiempos de reducción decimal calculados no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) en ninguno de los casos. El

efecto de la adición de calcio se comprobó adicionando 50 y 100 ppm a aquellas partidas de Agar Nutritivo y Medio de Recuento en Placa que dieron lugar a recuentos inferiores a los normales. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en la tabla II. Puede apreciarse que la adición de 50 ppm de este mineral produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) de los mismos, excepto con la cepa 4342 al utilizar Medio de Recuento en Placa (PCA) como medio de recuperación.

La suplementación del medio con 100 ppm de calcio no produjo modificaciones en la recuperación con ninguno de los medios para la cepa 4342, sin embargo con la cepa 9818, la suplementación dio lugar en Agar Nutritivo a descensos significativos ($p < 0,05$), mientras que al emplear Medio de Recuento en Placa se tradujo en un incremento significativo de los porcentajes de recuperación.

Tabla III

Valores D (min)* obtenidos para los esporos de *Bacillus cereus* recuperados utilizando un lote de baja eficacia de Agar Nutritivo y Medio de Recuento en Placa suplementado con 50 y 100 ppm de calcio.

CEPAS		MEDIOS		
4342	D ₁₀₀	NA	NA+50 Ca	NA+100 Ca
		1,13 ± 0,16 ^a	1,25 ± 0,22 ^a	1,24 ± 0,18 ^a
	D ₁₀₀	PCA	PCA+50Ca	PCA+100 Ca
		1,2 ± 0,14 ^a	1,18 ± 0,21 ^a	1,21 ± 0,13 ^a
9818	D ₁₀₄	NA	NA+50 Ca	NA+100 Ca
		1,33 ± 0,19 ^a	1,28 ± 0,16 ^a	0,81 ± 0,07 ^b
	D ₁₀₄	PCA	PCA+50 Ca	PCA+100 Ca
		1,20 ± 0,13 ^a	1,24 ± 0,16 ^a	1,25 ± 0,13 ^a

NA: Agar Nutritivo; PCA: Medio de Recuento en Placa.

* Valores medios de tres experimentos ± desviación estándar.

^{a-b} Valores con el mismo superíndice para una misma cepa no fueron diferentes significativamente al 5%

En la tabla III se muestran los valores D obtenidos tras la adición de calcio a las distintas concentraciones. La suplementación del medio con 50 ppm de calcio no dio lugar a modificaciones en los tiempos de reducción decimal ($p > 0,05$). Cuando se añadieron 100 ppm de este mineral solamente se obtuvieron valores D más bajos con la cepa 9818 al utilizar como medio de subcultivo Agar Nutritivo, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados que hemos obtenido indican que la utilización de diferentes partidas de dos medios da lugar a modificaciones considerables en los porcentajes de recuperación de los esporos tratados de *B. cereus*. Un efecto similar ha sido descrito para *B. stearothermophilus*^{2, 10, 11, 16}. Ello pone de manifiesto que además de resultar importante la elección del medio de subcultivo sería conveniente probar varios lotes con el fin de asegurar la calidad de los mismos y obtener los máximos recuentos de supervivientes. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en los valores D obtenidos en ningún caso. Estos resultados se encuentran en la línea de los descritos por López¹⁰ para *B. stearothermophilus*.

Aunque resulta difícil determinar que tipo de componente y/o concentración del mismo es responsable de la diferente eficacia de los medios, dada su complejidad y la dificultad de realizar un control de calidad que permita asegurar la homogeneidad entre ellos o incluso entre diferentes partidas de un mismo medio, en alguna ocasión las diferencias encontradas se han achacado a una deficiencia en determinados cationes, como por ejemplo el calcio. Evancho y col.⁶, López¹⁰, Sikes y col.¹⁸, obtuvieron tasas de recuperación y valores D más bajos al utilizar medios con bajo contenido en este mineral. En nuestro caso, cuando se suplementaron los medios con 50 y 100 ppm de este catión, los porcentajes de recuperación se incrementaron notablemente. La adición de 100 ppm a uno de los medios, el Agar Nutritivo dio lugar con una de las cepas ensayadas (9818) a un descenso significativo en las tasas de recuperación y en los tiempos de reducción decimal. Esta disminución podría ser debida al pH más bajo que presentaba este medio tras la adición de calcio, 0,3-0,4 unidades inferior en relación al Medio de Recuento en Placa (pH 6,8), y hemos podido comprobar que la recuperación de esta cepa disminuye progresivamente con la acidificación del medio y el grado de calentamiento⁷.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT, proyecto ALI 90-0555 y una Beca del Gobierno Vasco.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) BARACH, J.T.; ADAMS, D.M. y SPECK, M.L. (1974). Recovery of heated *Clostridium perfringens* type A on selective media. *Appl. Microbiol.* **28**, 793-797.
- 2) BORIS, C. y GRAHAM, G.S. (1985). The effect of recovery medium and methodology on biological indicators. *Med. Dev. Diag. Ind.* **7**, 43.
- 3) CONDON, S., LÓPEZ, P., ORIA, R. y SALA, F.J. (1989). Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer. *J. Food Sci.*, **54**, 451-457.

- 4) CONDON, S., ORIA, R. y SALA, F.J. (1987). Heat resistance of microorganisms: an improved method for survival counting. *J. Microbiol. Methods*, **7**, 37-44.
- 5) COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1968). Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on colony count of unheated and heated spores. *J. Food Technol.*, **3**, 285-293.
- 6) EVANCHO, G.M., ASHTON, D.H. y CORSON, L.M. (1974). Effect of calcium supplementation of brom cresol purple broth on recovery counts of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Food Sci.*, **39**, 1161-1162.
- 7) GONZÁLEZ, I. (1995). Influencia de las condiciones de esporulación y de recuperación sobre la respuesta al calor de *Bacillus cereus*. Tesis Doctoral. Dpto de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.
- 8) GONZÁLEZ, I., LÓPEZ, M., MAZAS, M., GONZÁLEZ, J. y BERNARDO, A. (1995). The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 548-554.
- 9) LABBE, R.G. y NORRIS, K.E. (1982). Evaluation of plating media for recovery of heated *Clostridium perfringens* spores. *J. Food Prot.* **45**, 686-688.
- 10) LÓPEZ, M. (1994). Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la respuesta al calor de *Bacillus stearothermophilus*. Tesis Doctoral. Dpto de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.
- 11) LYNCH, J.E., OXBORROW, G.S. y PFLUG, I.J. (1983). The use of D-values in performance specifications for commercial biological indicators for steam sterilization. Presented at 97th Annual Meeting of Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, Oct. 4.
- 12) MALLIDIS, C.G. y SCHOLEFIELD, J. (1986). Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 517-523.
- 13) MCKENZIE, H.A. y DAWSON, R.M.C. (1969). pH, Buffers and Physiological Media. En: Data for biochemical research. pp. 484-485. Ed. R.M.C. Dawson, D.C. Elliot y K.M. Jones. Oxford. Oxford at the Clarendon Press.
- 14) MIKOLAJCIK, E.M. y RAJKOWSKI, K.J. (1980). Simple technique to determine heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in fluid systems. *J. Food Prot.* **43**, 799-804.
- 15) ODLAUG, T.E. y PFLUG, I. (1977). Recovery of spores of *Clostridium botulinum* in yeast extract agar and pork infusion agar after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 337-381.
- 16) PFLUG, I.J., SMITH, G.M. y CHRISTENSEN, R. (1981). Effect of soybean casein digest agar lot on number of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered. *Appl. Environ. Microbiol.* 226-230.
- 17) RAJKOWSKI, K.T. y MIKOLAJCIK, E.M. (1987). Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. *J. Food Protec.*, **50**, 199-205.
- 18) SIKES, A., WHITFIELD, S. y ROSANO, D.J. (1993). Recovery of heat-stressed spores of *Bacillus stearothermophilus* on solid media containing calcium and magnesium deficient agar. *J. Food Protec.*, **56**, 706-709.

- 19) STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. (1960). *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- 20) WILLIAMS, M.L.B. (1970). The effect of the agar in solid media used for enumerating heated spores. *Can. Inst. Food Technol. J.* **3**, 118-119.
- 21) ZECHMAN, L.G. y PFLUG, I.J. (1991) *Bacillus stearothermophilus* spore recovery altered by media concentration and formulation. *J. Food Sci.* **56**, 1408-1414.

INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO DE ESPORULACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS DE RESISTENCIA AL CALOR PARA *Bacillus cereus*.

(THE INFLUENCE OF THE pH OF SPORULATION MEDIUM ON THE HEAT RESISTANCE PARAMETERS FOR *Bacillus cereus*).

M. Mazas Alberdi*
I. González Martínez*
M. López Fernández**
J. González Prieto*
R. Martín Sarmiento*

Palabras claves: Valores D, valores z, termorresistencia, *Bacillus cereus*.
Key words: D-values, z-values, thermal resistance, *Bacillus cereus*.

SUMMARY

Heat resistance of *Bacillus cereus* ATCC 4342 spores produced at different pHs of sporulation was investigated. D-values were very influenced by the pH of the medium, showing differences of about six-fold. The pH of sporulation medium which yielded the most thermoresistant spores depended on the type of medium used, 7,5 with nutrient agar and 6,2 with Angelotti medium. z-Values were not significantly affected.

RESUMEN

Se investigó la resistencia al calor de los esporos de la cepa ATCC 4342 de *Bacillus cereus* a diferentes pHs de esporulación. El pH del medio afectó notablemente a los valores D, con diferencias en los casos más extremos de hasta unas seis veces. El pH de esporulación al que se obtuvieron los esporos más termorresistentes fue muy dependiente del medio utilizado, 7,5 en agar nutritivo y 6,2 en el medio de Angelotti. Los valores z no resultaron afectados.

* Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Vigo.

An. Fac. Vet. 1992-1994, 38, 99-103