

- 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

## INTRODUCCIÓN

Los escasos estudios realizados para determinar la influencia del pH del medio de esporulación sobre la resistencia al calor de los esporos bacterianos han dado resultados contradictorios. En ciertos casos no se detectó ninguna influencia<sup>1, 8, 11, 17</sup>, pero en otros se señaló un importante efecto del pH sobre los valores D<sup>7, 9, 14</sup>. Entre estos últimos autores existen también divergencias relativas al pH al que los esporos adquieren la mayor tolerancia térmica, cercano a la neutralidad<sup>9, 14</sup> o a pHs más alcalinos<sup>7</sup>.

*Bacillus cereus* es un germen con gran interés sanitario -provoca toxiinfecciones alimentarias que cursan con un síndrome emético o diarreico, según la cepa causante- y tecnológico -aparece implicado en alteraciones de leches y productos lácteos tratados a temperaturas ultraelevadas<sup>10, 13</sup> y otros alimentos<sup>4</sup>-. Sin embargo, los autores del presente artículo no han podido encontrar ningún estudio de esta naturaleza realizado con él, por lo que los datos que aquí se aportan son, aparentemente, los únicos existentes sobre la influencia del pH de esporulación sobre los valores D y z para los esporos de este microorganismo.

## MATERIAL Y METODOS

### Microorganismos

Se utilizó la cepa ATCC 4342 de *Bacillus cereus*. Los microorganismos se mantuvieron liofilizados en ampollas de vidrio bajo refrigeración hasta su uso.

### Suspensiones de esporos

Las suspensiones de esporos se obtuvieron en frascos de Roux que contenían cada uno 250 ml de dos medios de esporulación: agar nutritivo suplementado con 1 ppm Mn<sup>++</sup> a 40°C y medio de Angelotti<sup>2</sup> a 35°C. Las temperaturas se seleccionaron así debido a que en un estudio previo resultaron ser las más adecuadas para la obtención de la mayor termorresistencia.

Los pHs estudiados fueron 5,4; 6,2 (natural del medio de Angelotti); 6,4; 6,8 (natural del agar nutritivo); 7,6 y 8,2. El ajuste de pH se realizó con HCl u OHNa 1 N.

Los medios se sembraron con un cultivo crecido en caldo nutritivo, a las temperaturas de 35 o 40°C, que procedía de una única colonia de 24 h aislada en agar nutritivo.

Cuando la esporulación alcanzó el máximo porcentaje, los esporos se extrajeron con tampón McIlvaine pH 7,0 ayudándonos con perlas de vidrio, centrifugando una vez a 600 x g durante 5 min y otras tres veces a 2500 x g 15 min. Los esporos se diluyeron finalmente en tampón McIlvaine pH 7,0 para dar una concentración final de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>.

### Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en un termorresistómetro TR-SC<sup>5</sup>, en un rango de temperaturas comprendido entre 95 y 114°C. El medio de calentamiento fue tampón McIlvaine pH 7,0.

### Incubación y recuento de supervivientes

Los esporos que sobrevivieron al calentamiento se incubaron en agar nutritivo a 30°C. Las colonias se contaron por retroproyección de las placas<sup>6</sup>.

### Determinación de los valores D y z

Los valores D (tiempo necesario para que una población de microorganismos disminuya a una décima parte) se determinaron a partir de la inversa de la pendiente de las gráficas de supervivencia. En ocasiones las gráficas presentaron fenómenos de colas, que no se tuvieron en cuenta a la hora de calcular los valores D.

Los valores z (aumento de temperatura necesario para que el logaritmo del valor D disminuya a la décima parte) se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de las rectas de termodestrucción. Las pendientes de las mismas se compararon estadísticamente por el test de paralelismo.

## RESULTADOS

En las tablas 1 y 2 aparecen reflejados los valores D obtenidos para los dos medios ensayados a los diferentes pHs de esporulación y temperaturas de tratamiento. Puede apreciarse en ellas que se produjeron cambios importantes en los tiempos de reducción decimal con el pH de esporulación y que el efecto fue algo diferente según el medio utilizado.

**Tabla I**  
**Efecto del pH del medio de esporulación sobre los valores D<sub>T</sub> obtenidos para los esporos de la cepa ATCC 4342 de *Bacillus cereus* producidos en Agar Nutritivo suplementado con 1 ppm Mn<sup>++</sup>.**

pH	D <sub>98</sub>	D <sub>100</sub>	D <sub>102</sub>	D <sub>106</sub>	D <sub>110</sub>	D <sub>114</sub>
5,4	4,42	1,77	—	0,25	0,10	—
6,2	—	2,72	1,58	0,51	0,16	0,041
6,8	—	4,79	2,11	0,55	0,20	0,075
7,6	—	6,32	3,66	1,15	0,23	0,072
8,3	2,29	1,13	0,49	0,15	0,056	—

Tabla II

Efecto del pH del medio de esporulación sobre los valores  $D_T$  obtenidos para los esporos de la cepa ATCC 4342 de *Bacillus cereus* producidos en medio de Angelotti.

pH	D <sub>95</sub>	D <sub>98</sub>	D <sub>100</sub>	D <sub>102</sub>	D <sub>106</sub>	D <sub>110</sub>	D <sub>114</sub>
5,4	11,00	4,02	2,43	1,40	0,39	0,13	0,045
6,2	—	12,83	6,69	3,65	1,09	0,28	0,090
6,4	—	6,43	3,22	2,30	0,61	0,19	0,048
6,8	9,86	2,94	1,64	1,01	0,31	0,10	0,039
7,6	9,07	3,10	1,90	1,04	0,31	0,11	0,039

En agar nutritivo, el incremento de la concentración de hidrogeniones entre 5,4 y 7,5 implicó la obtención de valores D progresivamente mayores, llegando a ser casi 6 veces más altos en el caso más extremo. Sin embargo, la alcalinización del medio por encima de 7,5 resultó en un descenso de los mismos a valores cercanos a los que poseían los esporos procedentes del medio más ácido.

En el medio de Angelotti, se observó un efecto similar, pero el pH al que se produjeron los esporos más tolerantes al calor fue 6,2. En condiciones más básicas hubo un descenso de los tiempos de reducción decimal hasta pH 6,8.

Los valores  $z$  oscilaron entre 7,4°C y 8,1°C en el medio de Angelotti y entre 7,0°C y 7,8°C en agar nutritivo. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas, como puso de manifiesto la comparación entre las pendientes de las distintas rectas de termodestrucción (figura 1) por el test de paralelismo.

## DISCUSIÓN

Los resultados anteriores están claramente en la línea de los publicados por los autores que han encontrado modificaciones importantes en la termoresistencia de los esporos en función del pH a que fueron obtenidos<sup>7,9,14</sup>. El mecanismo por el que ocurre este fenómeno se ha discutido mucho, pero aun no se conoce. Craven<sup>7</sup> ha sugerido dos posibilidades, aumento del grado de mineralización de los esporos con el del pH o formación de determinadas proteínas protectoras, las denominadas proteínas del shock térmico<sup>12,14</sup>, cuya producción, al menos en *Escherichia coli*, es inducida por el aumento del pH<sup>15</sup>. La primera de estas hipótesis explicaría bien el descenso en la resistencia al calor a los pHs ácidos, pero no el que se observa al alcalinizar el medio por encima del valor óptimo, pues en estas circunstancias el grado de mineralización no disminuye sino que aumenta. En cuanto a la segunda, en nuestro caso los esporos no fueron sometidos en ninguna fase de su manipulación a una alcalinización brusca del entorno, que es requisito necesario para que las proteínas del shock térmico sean sintetizadas.

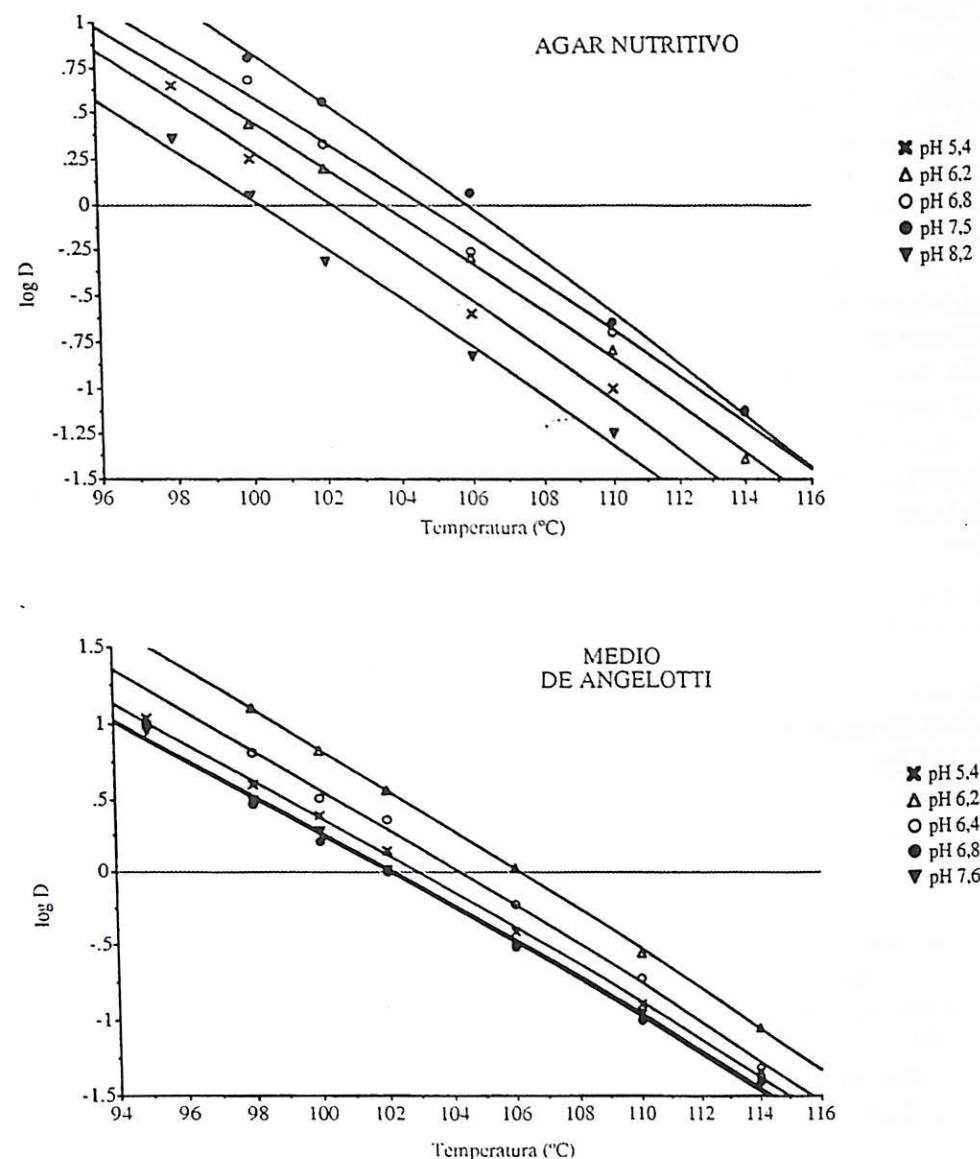


Fig 1.- Rectas de termodestrucción determinadas para los esporos de la cepa ATCC 4342 de *Bacillus cereus* producidos en agar nutritivo y en medio de Angelotti a diferentes pHs.

La mayor parte de los autores relacionan la muerte térmica de los esporos con la desnaturalización de enzimas y proteínas celulares. Esta hipótesis se ha visto últimamente muy reforzada por los estudios de calorimetría diferencial de Belliveau y col.<sup>3</sup> Los efectos del pH de esporulación sobre la resistencia al calor podrían ser resultado de los ejercicios sobre la estabilidad proteica, que habitualmente presenta un óptimo

definido para un proteína, descendiendo a los lados ácido y alcalino del mismo. Para ello se han de cumplir dos requisitos: que el pH interno del esporo refleje el del medio en el que ha tenido lugar la esporulación y que aquel no se modifique durante el tratamiento térmico, que en nuestras experiencias se llevó a cabo siempre a pH 7,0. Hay algunas evidencias de que esta segunda condición podría cumplirse, puesto que se ha comprobado que el pH interno de las células adultas varía poco con el del entorno <sup>15, 18</sup>. Respecto a la primera, no hemos hallado en la bibliografía datos al respecto.

En nuestro estudio hemos observado también que el pH de máxima tolerancia al calor es claramente diferente en los dos medios ensayados, aproximadamente 7,5 en agar nutritivo y 6,2 en el medio de Angelotti. Esto podría contribuir a explicar las diferencias apreciadas por los distintos autores respecto a la influencia del pH de esporulación sobre la resistencia al calor.

Acerca del efecto del pH sobre los valores z existen muy pocas referencias. Únicamente hemos encontrado las de Pang y col. <sup>14</sup> que no detectaron variaciones en los mismos debidas al pH del medio. Nuestro trabajo viene a confirmar sus observaciones.

#### AGRADECIMIENTOS

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

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1) ALCOCK, S.J. y BROWN, K.L. (1985). Heat resistance of PA 3679 (NCIB 8053) and others isolates of *Clostridium sporogenes*. En *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial spores*, Dring, G.J., Gould, G.W. y Ellar, D.J., pp. 261-273. Academic Press INC. (London) LTD.
- 2) ANGELOTTI, R., MARYANSKI, J.M., BUTLER, J.F., PEELER, J.T. y CAMPBELL, J.E. (1968). Influence of spore moisture content on the dry-heat resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Appl. Microbiol.*, 16(5), 735-745.
- 3) BELLIVEAU, B.H., BEAMAN, T.C., PANKRATZ, S. y GERHARDT, P. (1992). Heat killing of bacterial spores analyzed by differential scanning calorimetry. *J. Bact.* 174, 4463-4474.
- 4) BRADSHAW, J.G., PEELER, J.T. y TWEDT, R.M. (1975). Thermal inactivation of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned foods. *Appl. Microbiol.*, 30(6), 943-945.
- 5) EL-BISI, H.M. y ORDAL, Z.J. (1956). The effect of certain sporulation conditions on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. *J. Bact.* 71, 1-10.

- 6) CONDON, S., LÓPEZ, P., ORIA, R. y SALA F.J. (1989). Thermal death determination: Design and evaluation of a thermoresistometer. *J. Fd Sci.* 54, 451-457.
- 7) CONDON, S., ORIA, R. y SALA F.J. (1987). Heat resistance of microorganisms: An improved method for survival counting. *J. Microbiol. Methods* 7, 37-41.
- 8) CRAVEN, S.E. (1990). The effect of the pH of the sporulation environment on the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores. *Curr. Microbiol.* 22, 233-237.
- 9) FERNÁNDEZ-COLL, F. y RODRÍGUEZ-TORO, W. (1986). Thermal resistance of spores of two species of the genus *Bacillus*. *J. Agr. Univ. Puerto Rico* 70, 189-196.
- 10) FRANKLIN, J.C. (1970). Spores in milk: Problems associated with UHT processing. *J. Appl. Bact.* 33, 188-191.
- 11) FRIESEN, W.T. y ANDERSON, R.A. (1974). Effects of sporulation conditions and cation-exchange treatment on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Can. J. Pharm. Sci.* 9, 50-53.
- 12) KHOURY, P.H., LOMBARDI, S.J. y SLEPECKY, R.A. (1987). Perturbation of the heat resistance of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol. *Curr. Microbiol.* 15, 15-19.
- 13) MOSTERT, J.F., LÜCK, H. y HUSMANN, R.A. (1979). Isolation, identification and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. *S. Afr. J. Dairy Techn.*, 11(3), 125-131.
- 14) PANG, K.A., CARROAD, P.A. y WILSON, A.W. (1983). Effect of culture pH on D value, cell growth and sporulation rates of P.A. 3679 spores produced in an anaerobic fermentor. *J. Fd Sci.* 48, 467-470.
- 15) TAGLICHT, D., PADAN, E., OPPENHEIM, A.B. y SCHULDINER, S. (1987). An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 169, 885-887.
- 16) TODD, J.A., HUBBARD, T.J.P., TRAVERS, A.A. y ELLAR, D.J. (1985). Heat shock proteins during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 188, 209-214.
- 17) WILLIAMS, O.B. (1929). The heat resistance of bacterial spores. *J. Inf. Dis.* 44, 421-465.
- 18) ZILBERSTEIN, D., AGMON, V., SCHULDINER, S. y PADAN E. (1984). *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J. Bact.* 158, 246-252.