

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO POR ULTRASONIDOS  
SOBRE LA TERMORRESISTENCIA DE LOS  
ESPOROS DE *BACILLUS CEREUS* Y *BACILLUS  
LICHENIFORMIS***

Por J. A. Ordóñez  
J. Burgos  
F. Sala Trepal

INTRODUCCION

El tratamiento con ultrasonidos es uno de los métodos más frecuentemente utilizados para la desintegración de las células vegetativas microbianas. Las formas esporuladas de las bacterias son mucho más resistentes a las ondas sónicas y ultrasónicas y el tratamiento con ultrasonidos se ha usado, en algunos casos, como procedimiento de liberar las suspensiones de esporos de células vegetativas.<sup>1</sup>

Sin embargo, el tratamiento de los esporos por ultrasonidos produce en ellos, considerable impacto: los tumefacta, erosiona su superficie<sup>2</sup> y estimula su crecimiento.<sup>3</sup>

Algunas experiencias publicadas en la bibliografía microbiológica demuestran además que, si el tratamiento es suficientemente drástico, también puede destruir las formas esporuladas<sup>4,5,6</sup> y que los efectos esporicidas de los ultrasonidos son sinérgicos con los de algunos productos químicos.<sup>7</sup>

En el presente trabajo se demuestra que la sonicación sensibiliza muy considerablemente los esporos de *B. cereus* y *B. licheniformis* al tratamiento térmico.

## MATERIAL Y METODOS

*Microorganismos:* Los dos gérmenes utilizados fueron aislados en este laboratorio; el *B. cereus* a partir de una conserva de paella adquirida en el mercado; el *B. licheniformis* a partir de mejillones frescos.

*Producción y preparación de esporos:* Los gérmenes aislados se sembraron en placas de Petri preparadas con el medio descrito por WILLIAMS *et al.*,<sup>8</sup> que contiene manganeso como estimulante de la esporulación según recomienda CHARNEY *et al.*<sup>9</sup> Al cabo de 48-72 horas de incubación a 32°C. se observó una abundante producción de esporos que se recogieron rascando la superficie de las placas con espátula flameada y se traspasaron a tubos de centrífuga provistos de agua destilada estéril. Se lavaron 5 veces con agua destilada estéril por centrifugación a 4.000 rpm, durante 5 minutos en una centrífuga «Martin Christ Junior» y finalmente se recogieron en solución Ringer 1/4 y se pasaron a frascos de McCartney, se eliminaron las formas vegetativas por calentamiento a 80° C. durante 30 minutos y se conservaron a 4° C. hasta su empleo.

*Tratamiento ultrasónico:* Para el tratamiento con ultrasonidos se utilizó un desintegrador ultrasónico M.S.E. de 60 w con una frecuencia de 20 Kc.

*Determinación de la termorresistencia:* La resistencia térmica se determinó en tubos capilares de punto de fusión bajo de 100 mm × 1,0 — 1,5 mm. La suspensión de esporos, de una concentración aproximada de 10<sup>9</sup> esporos/ml., se introdujo en ellos con ayuda de una microjeringa «Agla». El calentamiento se verificó en baño de aceite termostataado y los capilares fueron tratados tras el calentamiento siguiendo la técnica descrita por FRANKLIN *et al.*<sup>10</sup>

El recuento de supervivientes se llevó a cabo en placas de Petri con agar almidón leche (GRINSTED y CLEGG<sup>11</sup>).

## RESULTADOS

*Efectos de la sonicación sobre la supervivencia de los esporos:*

Lotes de 5 ml. de una suspensión de esporos conteniendo 7,8 × 10<sup>6</sup> esporos de *B. cereus* por ml. fueron sonicados a 1,2 A. durante períodos de tiempo que oscilaron entre 5 y 80 seg. y a continuación sembrados en placas de agar dextrosa triptona púrpura de bromocresol. El efecto producido por los ultrasonidos sobre los esporos en uno de estos experimentos aparece en la fig. 1.

En la fig. 2 se representa los efectos de un tratamiento entre 1,5 min. y 12 min. sobre una suspensión de esporos de la misma cepa a una concentración de 9,3 × 10<sup>6</sup> esp/ml. y otra de *B. licheniformis* a una concentración de 3,4 × 10<sup>7</sup> esp/ml.

El tratamiento con ultrasonidos durante períodos de hasta 12 min. apenas afecta, en las condiciones aquí utilizadas, a la supervivencia de los esporos de los dos microorganismos sobre los que se ha probado. En algún caso puede incluso presentarse un incremento del número de colonias observables tras una sonicación muy breve (fig. 1) que debe interpretarse como el resultado de una activación acorde con las observaciones de KNAYSI *et al.*<sup>3</sup> en *Bacillus subtilis* o de una posible ruptura de agregados de esporos.

La resistencia a los ultrasonidos de las dos cepas es considerablemente distinta, requiriéndose 23 min. de tratamiento en el *B. cereus* y 60 en el *B. licheniformis* para lograr una reducción decimal.

*Influencia sobre la termorresistencia:* Para la obtención de cada gráfica de supervivientes se utilizaron 5 lotes de 5 capilares cada uno, rellenos con 20 μl. de las suspensiones de esporos que se calentaron a una temperatura definida. A distintos tiempos a lo largo del calentamiento se fueron retirando los componentes de cada lote y efectuando el recuento de supervivientes.

*Bacillus cereus:*

Se efectuaron 5 tipos de experimentos; en dos de ellos se obtuvieron las gráficas de termorresistencia a 105° y 110° C. de la cepa utilizada. En el tercero se determinó la resistencia térmica a 110° C. tras una sonicación durante 1,5 min. a una concentración de 1,03 × 10<sup>8</sup> esp/ml y un volumen de 4 ml. En los dos restantes se determinó la termorresistencia previa sonicación durante 1,5 y 12 min., con un volumen de 4 ml y a concentraciones de 6 × 10<sup>8</sup> y 7 × 10<sup>8</sup> esp/ml respectivamente.

Los resultados de estos experimentos se reflejan en las figuras 3 y 4.

*Bacillus licheniformis:*

Se llevaron a cabo dos experimentos; en uno de ellos se determinó la termorresistencia de la cepa a 99° C. y en el otro se obtuvo la gráfica de supervivencia a la misma temperatura tras una sonicación de 10 min. a una concentración de 4,4 × 10<sup>9</sup> esp/ml y un volumen de 4 ml. Los resultados obtenidos se representan en la fig. 5.



Los ultrasonidos disminuyen dramáticamente la termorresistencia de ambas especies esporuladas; el descenso es, sin embargo, más acusado también en el *B. cereus*. El valor  $D_{99^{\circ}\text{C}}$  para el *B. licheniformis* pasa de 5,5 a 3 min. al ser ultrasonificado durante 10 min. y el valor  $D_{110^{\circ}\text{C}}$  del *B. cereus* pasa de 11,5 min. a 1,5 tras el tratamiento con ultrasonidos durante 1,5 min. Dada la característica de la gráfica de termorresistencia a  $105^{\circ}\text{C}$  es más difícil comparar los valores  $D_{105^{\circ}\text{C}}$  pero la figura 3 demuestra que cualitativamente los efectos son iguales a los descritos para el tratamiento a  $110^{\circ}\text{C}$ .

#### DISCUSION

De los resultados descritos se deduce la imposibilidad de utilizar un tratamiento ultrasónico, por suave que sea, para liberar de células vegetativas, o dispersar agregados en las suspensiones de esporos a utilizar en las determinaciones de termorresistencia.

La resistencia al calor de los esporos se atribuye a la acción conjunta de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y el ácido dipicolínico (DPA)<sup>12, 13, 14, y 15</sup> interaccionando probablemente con los muropéptidos corticales. La capa cortical del esporo contribuye, sin duda, de una manera marcada a la retención de iones  $\text{Ca}^{++}$  y DPA, pues es bien sabido que algunos tratamientos (penicilina por ejemplo) que impiden su formación, determinan la rápida liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de los esporangios, que pueden terminar su esporogénesis pero producen esporos más lábiles.

Parece presumible, por tanto, que la sensibilización al calor de los esporos tratados con ultrasonidos se deba a una desorganización parcial de la capa cortical que acarrea un descenso en el contenido de la misma en DPA e iones  $\text{Ca}^{++}$  o más probablemente a una alteración del cociente Ca:DPA que tan fundamental papel parece jugar en su termorresistencia.

Desconocemos todavía en qué medida las observaciones efectuadas sobre estas dos cepas de esporos son de validez general y hasta qué punto la intensidad de los efectos descritos puedan verse afectados por la naturaleza física y la composición química del medio en que se efectúe la ultrasonificación y el calentamiento; es, sin embargo, a todas luces evidente que pueden tener aplicaciones tecnológicas de gran importancia cuyas posibilidades estamos explorando.

#### RESUMEN

La termorresistencia de los esporos de *B. cereus* y *B. licheniformis* en solución de Ringer 1/4 decrece intensamente tras tratamientos ultrasónicos incapaces de destruir una proporción significativa de gérmenes en una suspensión de esporos. Los esporos de *B. cereus* son más fácilmente sensibilizados por los ultrasonidos a los tratamientos térmicos que los del *B. licheniformis*. El valor  $D_{110^{\circ}\text{C}}$  del *B. cereus* se reduce de 11,5 a 1,5 min. después de una ultrasonificación durante 1,5 min. a una frecuencia de 20 Kc. El valor  $D_{99^{\circ}\text{C}}$  del *B. licheniformis* disminuye de 5,5 a 3 min. tras una sonicación de 10 min.

Estos resultados pueden tener interesantes aplicaciones prácticas en la esterilización de los alimentos y descartan el uso de los ultrasonidos para disgregar los agregados y destruir las formas vegetativas en las suspensiones de esporos utilizadas en los experimentos de termorresistencia.

#### RESUME

La thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* et *Bacillus licheniformis* en solution de Ringer 1/4 décroît intensément après des traitements ultrasoniques incapables de détruire une proportion significative de germes dans une suspension de spores. Les spores de *B. cereus* sont plus facilement sensibilisées par les ultrasons traitements thermiques que celles du *B. licheniformis*. La valeur  $D_{110^{\circ}\text{C}}$  du *B. cereus* se réduit de 11,5 à 1,5 min après un traitement ultrasonique pendant 1,5 min à une fréquence de 20 Kc. La valeur  $D_{99^{\circ}\text{C}}$  du *B. licheniformis* diminue de 5,5 à 3 min. après une sonication de 10 min.

Ces résultats peuvent avoir d'intéressantes applications pratiques dans la stérilisation des aliments et écartent l'utilisation des ultrasons pour désagréger les agrégats et détruire les formes végétatives dans les suspensions de spores utilisées dans les expériences de thermorésistances.

#### SUMMARY

Heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores in Ringer solution 1/4 greatly decreases after ultrasonic treatments unable to kill a significant proportion of the spore population. Spores of *B. cereus* are more easily heat sensitized by ultrasonics than *B. licheniformis*.  $D_{110^{\circ}\text{C}}$  of *B. cereus* can be reduced from 11,5 to 1,5 min. by 1,5 min. of ultrasonica-

tion at a frequency of 20 Kc.  $D_{99}^{\circ}\text{C.}$  of *B. licheniformis* decreases from 5,5 to 3 min. after 10 min. of ultrasonication. These findings may have very interesting practical applications in food sterilization and rules out the use of ultrasonics to free of vegetative cells or to break aggregates in spore suspensions to be used in heat resistance experiments.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—HEILIGMAN, F., DESROSIER, N. W. and BROUMAND, H. (1956). *Food Res.* **21**, 63
- 2.—SEHGAL, L. R. and GREZC, N. (1967). *Bact. Proc.* p. 5.
- 3.—KNAYSI, G. and CURRAN, H. R. (1961). *J. Bact.* **82**, 691.
- 4.—ADLER, H. I. and ENGEL, M. S. (1961). *J. cell. comp. Physiol.* **58**, Suppl. 1, 95.
- 5.—DAVIES, R. (1959). *Biochem. biophys. Acta.* **33**, 481.
- 6.—PISANO, M. A., BOUCHER, R. M. G. and ALCAMO, I. E. (1966). *Appl. Microbiol.* **14**, 732.
- 7.—BOUCHER, R. M. G., PISANO, M. A., TORTORA, G. and SAWICK, E. (1967). *Ultrasonics*, **5**, 168.
- 8.—WILLIAMS, D. J., FRANKLIN, J. G., CHAPMAN, H. R. and CLEGG, L. F. L. (1957). *J. appl. Bact.* **20**, (1), 43.
- 9.—CHARNEY, J., FISHER, W. P. and HEGARTY, C. P. (1951). *J. Bact.* **62**, 145.
- 10.—FRANKLIN, J. G., WILLIAMS, D. J. and CLEGG, L. F. L. (1958). *J. appl. Bact.* **21** (1), 51.
- 11.—GRINSTED, E. and CLEGG, L. F. L. (1955). *J. Dairy Res.* **22**, 178.
- 12.—LECHOWICH, R. V. and ORDAL, Z. J. (1962). *Can. J. Microbiol.* **8**, 287.
- 13.—VINTER, V. and VECHET, B. (1964). *Folia microbiol., Praha* **9**, 238.
- 14.—VINTER, V. and VECHET, B. (1964). *Folia microbiol., Praha* **9**, 352.
- 15.—VINTER, V. (1965). Conference of IAEA, Publ. No. 653207, F.A.O. Vienna.
- 16.—LEVINSON, H. S., HYATT, M. T. and MOORE, F. E. (1961). *Biochem. biophys. Res. Commun.* **5**, 417.

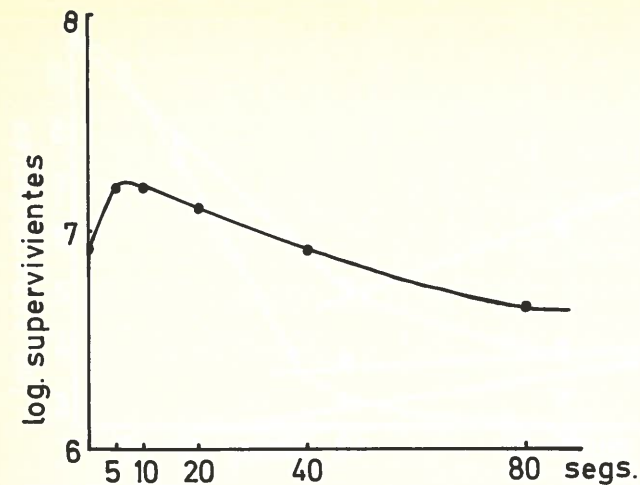


Fig. 1

Fig. 1.—Efecto de la ultrasonificación sobre esporos de *B. cereus*. Frecuencia: 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen: 5 ml. Concentración de esporos:  $7,8 \times 10^6$  esp/ml.

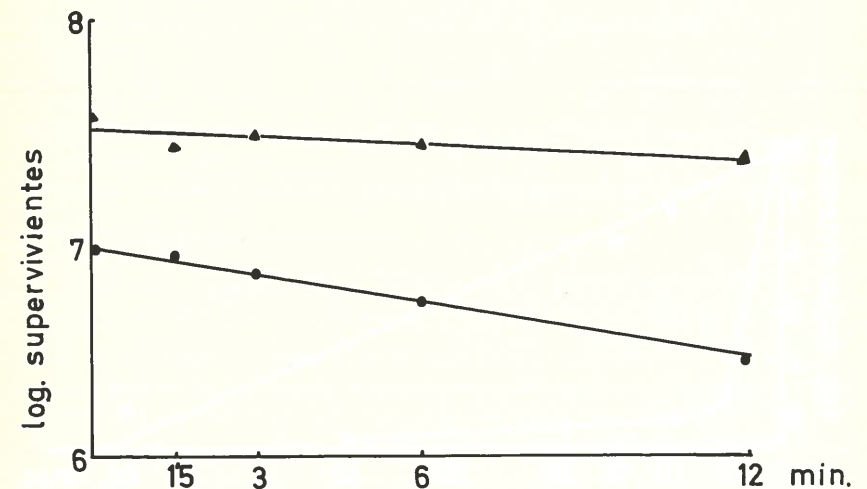


Fig. 2

Fig. 2.—Efecto de la ultrasonificación sobre esporos de *B. cereus* y *B. licheniformis*. Frecuencia: 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen: 5 ml. Círculos: *B. cereus*. Concentración:  $9,3 \times 10^6$  esp/ml. Triángulos: *B. licheniformis*. Concentración:  $3,4 \times 10^7$  esp/ml.

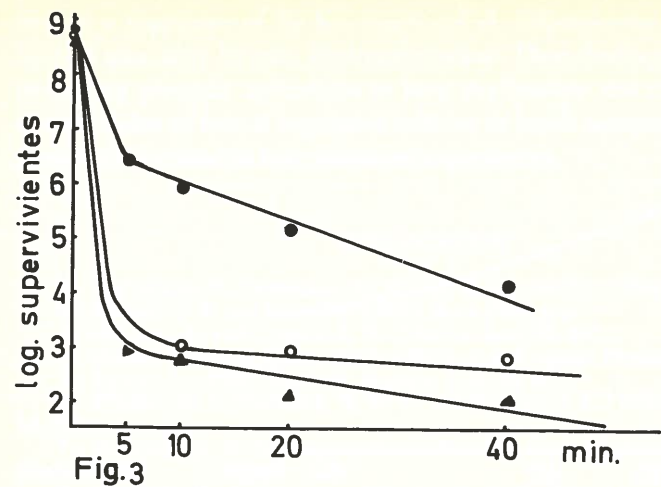


Fig. 3.—Curvas de termorresistencia de esporos de *B. cereus* a 105° C. Círculos negros: sin tratamiento ultrasónico. Círculos blancos: Esporos ultrasonificados. Frecuencia: 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen: 4 ml. Tiempo: 1,5 min. Concentración de esporos  $6 \times 10^8$  esp/ml. Triángulos: Esporos ultrasonificados. Frecuencia: 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen: 4 ml. Tiempo: 12 min. Concentración de esporos:  $7 \times 10^8$  esp/ml.

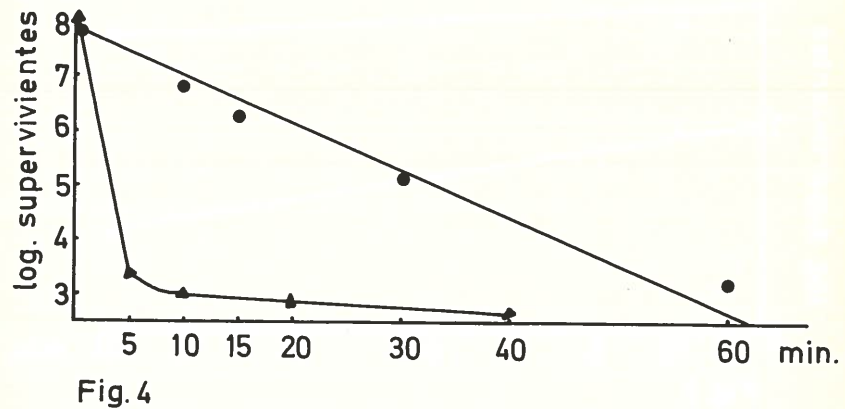


Fig. 4.—Curvas de termorresistencia de esporos de *B. cereus* a 110° C. Círculos: sin tratamiento ultrasónico. Triángulos: Esporos ultrasonificados. Frecuencia: 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen: 4 ml. Tiempo: 1,5 min. Concentración de esporos:  $1,03 \times 10^8$  esp/ml.

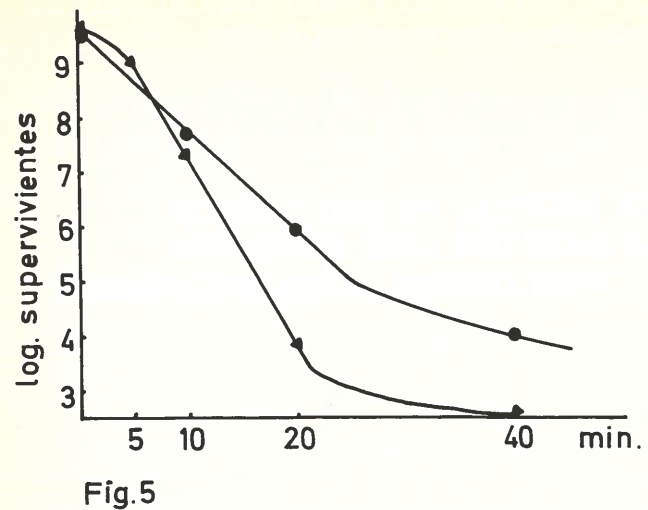


Fig. 5.—Curvas de termorresistencia de *B. licheniformis* a 99° C. Círculos: sin tratamiento ultrasónico. Triángulos: Esporos ultrasonificados. Frecuencia 20 Kc. Intensidad: 1,2 A. Volumen 4 ml. Tiempo: 10 min. Concentración de esporos:  $4,4 \times 10^9$  esp/ml.