

Fig. 3.- Influencia de la adición de diversos cationes a NA procedente de un lote con el que se habían obtenido bajos recuentos. Temperatura de tratamiento: 125° C. (●) sin cationes, (⊙) 100 ppm de Ca<sup>++</sup>, (○) 100 ppm de Mn<sup>++</sup>, (\*) 100 ppm de Mg<sup>++</sup>, (⊗) 20 ppm de Co<sup>++</sup>, (⊛) 20 ppm de Fe<sup>++</sup> (todos ellos adicionados en forma de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), (☆) 100 ppm de Ca<sup>++</sup> en forma de Cl<sub>2</sub>Ca.

## INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE SUBCULTIVO SOBRE EL COMPORTAMIENTO FRENTE AL CALOR DE LOS ESPOROS DE *Bacillus stearothermophilus*

### (INFLUENCE OF RECOVERY TEMPERATURE ON HEAT RESISTANCE OF *Bacillus stearothermophilus* SPORES)

M. López Fernández,\*  
I. González Martínez,\*  
J. González Prieto,\*  
R. Martín Sarmiento,\*  
y A. Bernardo Alvarez\*

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, heat resistance.  
Palabras clave: *Bacillus stearothermophilus*, termorresistencia.

#### SUMMARY

The effects of recovery temperature (40-65° C) on the apparent behaviour of heat-treated spores of *Bacillus stearothermophilus* were studied using as plating media nutrient agar (NA), dextrose triptone agar (DTA) and antibiotic assay medium (AAM). Colony counts increased with temperature from 45 to 60° C.

D<sub>T</sub> values obtained at 50-60° C were slightly higher than those at 65° C and 40-45° C. z values were not modified by incubation temperatures.

#### RESUMEN

Se ha estudiado la influencia de la temperatura de incubación post-tratamiento sobre la respuesta al calor de *B. stearothermophilus* en el rango de 40 a 65° C utilizando como medios de recuperación agar nutritivo (NA), agar dextrosa triptona (DTA) y medio de ensayo de antibiótico (AAM). Los recuentos aumentaron, en todos los casos, con la temperatura de incubación hasta 60° C. Los valores D obtenidos incubando a 40-45° C y 65° C fueron ligeramente inferiores a los correspondientes al rango 50-60° C. El valor z no se vio modificado significativamente.

\* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.



## INTRODUCCION

Existe una gran controversia respecto a la influencia de la temperatura de incubación post-tratamiento sobre la tasa de recuperación de los esporos dañados por el calor. Para algunos autores tiene escasa importancia <sup>6</sup> y, en cambio, otros la consideran un factor limitante en la recuperación <sup>12</sup>. En líneas generales suele aceptarse que la temperatura más adecuada para el recuento de células dañadas por el calor es inferior a la óptima de crecimiento <sup>5,7,10</sup>, aunque no faltan autores que opinan lo contrario <sup>4,6,9</sup>.

En el caso de *B. stearothermophilus* hay pocos datos y, además, contradictorios. Así Cook y Gilbert <sup>3</sup> encontraron que la óptima está entre 45-50° C y, por el contrario, Mallidis y Scholefield <sup>8</sup> obtuvieron un mejor nivel de recuperación a 60° C que a 50° C.

La información existente sobre el efecto de la temperatura de incubación sobre los valores  $D_T$  es aún más escasa. Estos últimos autores <sup>8</sup>, al comparar los datos obtenidos a 50 y 60° C encontraron  $D_T$  algo más altos a esta última, si bien las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas. Respecto a la influencia de este factor sobre el valor  $z$  para los esporos de *B. stearothermophilus* no hemos hallado referencias en la bibliografía.

## MATERIAL Y METODOS

**Microorganismos.** Se utilizó la cepa ATCC 12980 de *Bacillus stearothermophilus* esporulada en agar nutritivo (NA) con 1 ppm de manganeso. Se partió de un cultivo en caldo nutritivo de 24 horas de incubación, a 60° C, procedente de una colonia aislada por estría en agar nutritivo e incubada a 60° C durante 24 horas.

Los esporos se recogieron al cabo de 19-22 horas por arrastre con perlas de vidrio y tampón Mc Ilvaine de pH 7,0. Los restos de agar y grandes agregados se eliminaron por centrifugación a 600 x g durante 5 minutos. Seguidamente se resuspendieron en el mismo tampón, y se centrifugaron a 2500 x g durante 15 minutos, proceso que se repitió cuatro veces. Posteriormente, se ajustó la concentración a 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> esporos/ml, por recuento en cámara de Thoma, y se almacenaron a refrigeración (0-4° C) hasta su uso. El grado de esporulación se determinó por recuento directo al microscopio, resultando en torno a un 60-65%.

**Medios de recuperación.** Se utilizaron los siguientes medios:

AGAR NUTRITIVO (NA) (BIOLIFE): extracto de carne, 3 g; peptona de carne, 5 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro.

AGAR DEXTROSA TRIPTONA (DTA): triptona, 10 g (DIFCO); dextrosa, 5 g (OXOID); agar, 12 g (MERCK); agua destilada, 1 litro.

MEDIO DE ENSAYO DE ANTIBIOTICOS (AAM): peptona, 6 g (DIFCO); triptona, 4 g (DIFCO); extracto de levadura, 3 g (OXOID); lab lemco, 1,5 g (OXOID); dextrosa, 1 g (OXOID); agar, 15 g (MERCK); agua destilada, 1 litro.

En todos los casos, las placas sembradas fueron sometidas a una ligera desecación superficial a 50° C durante 30 minutos en una estufa de aire forzado.

**Determinaciones de termorresistencia y recuperación de supervivientes.** El tratamiento térmico se realizó en un termorresistómetro TR-SC <sup>2</sup>, a las temperaturas de: 118, 120, 122, 125, 128 y 131° C. En todos los casos se utilizó como medio de calentamiento tampón Mc Ilvaine pH 7,0. Los recuentos se efectuaron por el método descrito por Condón y Sala <sup>1</sup>, tras 24 horas de incubación, salvo a 40 y 45° C donde fue necesario para obtener los máximos recuentos alargar el tiempo hasta 72 y 48 horas, respectivamente.

Los valores  $D$  se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de la recta de regresión de las gráficas de supervivencia tras eliminar los hombros y las colas como es usual en los experimentos en que éstos aparecieron. El cálculo del valor  $z$  se realizó a partir de la inversa de la pendiente de las líneas de termodestrucción obtenidas al representar en el eje de ordenadas el log de los valores  $D_T$  y en el de abscisas las temperaturas de tratamiento correspondientes. Para la comparación entre los valores  $z$  se aplicó un test de paralelismo <sup>11</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Al utilizar agar nutritivo como medio de subcultivo, se obtuvieron para las diferentes temperaturas de incubación los valores  $D_T$  que recoge la Tabla I. Puede comprobarse a partir de estos datos que la influencia de la temperatura de incubación sobre estos parámetros es escasa, salvo para la temperatura de 65° C a la cual se obtuvieron en todos los experimentos cifras inferiores a la media. La fig. 1 corresponde a las gráficas de supervivencia obtenidas a la temperatura de tratamiento de 118° C. De la comparación entre las líneas a las distintas temperaturas de incubación, se deduce que los recuentos más altos se obtienen en el rango de temperatura entre 50 y 60° C siendo ligeramente menores los correspondientes a 40, 45 y 65° C; resultados similares se obtuvieron a todas las demás temperaturas de tratamiento. En la Tabla II se comparan los valores  $z$  observados al incubar las placas a 40, 45, 50, 55, 60 y 65° C. La aplicación del test de paralelismo a estos datos revela que las diferencias observadas se deben al error experimental y carecen de significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Con AAM como medio de recuento los resultados fueron similares. Parece existir cierta tendencia a la obtención de valores  $D$  más altos en el rango de temperatura 50-60° C (Tabla III), pero, las diferencias son muy pequeñas y nuestros datos no nos han permitido detectar diferencias significativas. En cambio, el examen de las gráficas de supervivencia a 118° C (Fig. 2) confirma de nuevo que las temperaturas en el rango 50-60° C dan tasas de recuperación más altas que las demás. La Tabla IV muestra los valores  $z$  para este medio que oscilan entre 7,51 y 8,07° C, diferencias éstas muy pequeñas y no significativas ( $p < 0,01$ ) según el test de paralelismo.

Cuando se utilizó como medio de recuperación DTA se obtuvieron los resultados que figuran en la tabla V. Estos datos confirman las observaciones de los experimentos con NA y AAM, si bien en este caso se aprecia más claramente una tendencia a aparecer valores  $D_T$  más altos en el rango de 50-60° C (Fig. 3). Las diferencias entre valores  $z$  (Tabla VI), si bien un poco más amplias que con AAM, tampoco fueron estadísticamente significativas.

De la consideración de todos estos datos en conjunto cabe deducir que las mejores tasas de recuperación de los esporos de *B. stearothermophilus* tratados por el calor se obtienen en el rango de temperaturas de incubación de 50-60° C y que los valores  $z$  no se modifican sensiblemente a temperaturas de subcultivo entre 40 y 65° C.

Suele aceptarse que la temperatura más adecuada para efectuar los recuentos tras el tratamiento térmico es unos 5-10° C inferior a la óptima de crecimiento del microorganismo antes de ser sometido a la acción del calor <sup>10</sup>, lo que en nuestro caso correspondería a 45-50° C, el rango que Cook y Gilbert <sup>3</sup> encontraron que era el óptimo en sus estudios sobre la recuperación de esporos de *B. stearothermophilus* NCIB 8919. Sin embargo, nuestros resultados discrepan claramente de los de estos autores y están en la línea de los aportados más recientemente por Mallidis y Scholefield <sup>8</sup> que, al comparar las temperaturas de incubación de 50 y 60° C, observaron recuentos más altos y valores  $D_T$  ligeramente superiores a 60° C que a 50° C, no teniendo estas diferencias significación estadística.



Según nuestros datos, la temperatura más adecuada para efectuar los recuentos de los esporos de *Bacillus stearothermophilus* tratados por el calor es  $55 \pm 5^\circ \text{C}$ , particularmente por su influencia positiva sobre las tasas de recuperación y, en menor grado, por su efecto sobre el valor D que tiende a ser más bajo a temperaturas más extremas. Siendo  $55^\circ \text{C}$  la temperatura óptima para el crecimiento de los esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 12980 (la cepa utilizada en este estudio) no sometidos a calentamiento, se deduce que los tratamientos térmicos aplicados por nosotros no modifican su respuesta a la temperatura de subcultivo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) 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.
- 2) CONDON, S., LOPEZ, P., ORIA, R. y SALA, F.J. (1989). "Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer". *J. Food Sci.*, 54, (2), 451-457.
- 3) COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1968). "Factors affecting the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on colony count of unheated and heated spores". *J. Food Technol.*, 3, 285-293.
- 4) JARVIS, B., LACH, V.H. y WOOD, J.M. (1977). "Evaluation on the spiral plate maker for the enumeration of microorganisms in foods". *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 149.
- 5) KATSUI, N., TSUCHIDO, T., TAKANO, H. y SHIBASAKI, I. (1982). "Viability of heat stressed cells of microorganisms as influenced by preincubation and postincubation temperatures". *J. Appl. Bacteriol.*, 53, (1), 103-108.
- 6) KUKULINSKY-FULLER, J. y NELSON, F.E. (1977). "Enumeration of temperature-stressed *Pseudomonas aeruginosa* utilizing selective procedures". *J. Food Sci.*, 42, 415-420.
- 7) LABBE, R.G. y NORRIS, K.E. (1982). "Evaluation of plating media for recovery of heated *Clostridium perfringens* spores". *J. Food Protec.*, 45, (8), 686-688.
- 8) MALLIDIS, C.G. y SCHOLEFIELD, J. (1986). "Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*". *J. Appl. Bacteriol.*, 61, 517-523.
- 9) PRENTICE, C.A. y CLEGG, L.K.L. (1974). "The effect of incubation temperature on the recovery of spores of *Bacillus subtilis* 8057". *J. Appl. Bacteriol.*, 37, 501.
- 10) RUSSELL, A.D. (1982). "The destruction of bacterial spores". Academic. Press. Inc. London.
- 11) STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. (1960). "Principles and procedures of statistics". McGraw-Hill Company Inc. New York.
- 12) TSUCHIDO, T. (1983). En "Heat sterilization of food". T.Motohiro y K.Hayakawa. Koseisha-Koseikaku Co. Ltd. Tokio.

TABLA I  
Influencia de la temperatura de incubación sobre los valores  $D_T$  obtenidos para los esporos de *B. stearothermophilus*, al utilizar NA como medio de subcultivo.

T.T. (° C)	T.I. (° C)	$D_T$ (min)	$r_0$
118	40	4,57	- 0,993
118	45	3,99	- 0,994
118	50	4,27	- 0,995
118	55	3,84	- 0,995
118	60	3,94	- 0,998
118	65	3,57	- 0,993
120	40	2,44	- 0,997
120	45	2,18	- 0,998
120	50	2,30	- 0,996
120	55	1,94	- 0,992
120	60	2,38	- 0,995
120	65	1,67	- 0,996
122	40	1,25	- 0,997
122	45	1,17	- 0,993
122	50	1,25	- 0,998
122	55	1,09	- 0,997
122	60	1,27	- 0,997
122	65	1,09	- 0,998
125	40	0,39	- 0,996
125	45	0,50	- 0,997
125	50	0,50	- 0,998
125	55	0,40	- 0,990
125	60	0,46	- 0,997
125	65	0,40	- 0,990
128	40	0,21	- 0,992
128	45	0,14	- 0,995
128	50	0,19	- 0,994
128	55	0,16	- 0,996
128	60	0,16	- 0,992
128	65	0,15	- 0,994
131	40	0,079	- 0,995
131	45	0,075	- 0,996
131	50	0,089	- 0,995
131	55	0,082	- 0,982
131	60	0,069	- 0,994
131	65	0,068	- 0,995

T.T.= Temperatura de tratamiento  
T.I.= Temperatura de incubación

**TABLA II**

Efecto de la temperatura de incubación sobre los valores z obtenidos para los esporos de *B. stearotherophilus*. Medio de recuperación: agar nutritivo.

T.I. (° C)	Valor Z (° C)	r <sub>o</sub>
40	7,37	- 0,997
45	7,31	- 0,997
50	7,64	- 0,999
55	7,66	- 0,998
60	7,20	- 0,999
65	7,51	- 0,998

T.I.= Temperatura de incubación

**TABLA IV**

Influencia de la temperatura de incubación sobre los valores z obtenidos. Medio de recuperación: medio de ensayo de antibióticos.

T.I. (° C)	Valor z (° C)	r <sub>o</sub>
40	7,83	- 0,998
45	8,07	- 0,994
50	7,76	- 0,997
55	8,06	- 0,991
60	7,75	- 0,999
65	7,51	- 0,996

T.I.= Temperatura de incubación

**TABLA VI**

Influencia de la temperatura de incubación sobre los valores z. Medio de recuperación: agar dextrosa triptona.

T.I. (° C)	Valores z (° C)	r <sub>o</sub>
40	7,33	- 0,998
45	8,05	- 0,992
50	7,28	- 0,998
55	7,48	- 0,997
60	7,18	- 0,997
65	7,62	- 0,999

T.I.= Temperatura de incubación

**TABLA III**

Influencia de la temperatura de incubación sobre los valores D<sub>T</sub> obtenidos. Medio de recuperación: medio de ensayo de antibióticos.

T.T. (° C)	T.I. (° C)	D <sub>T</sub> (min)	r <sub>o</sub>
118	40	3,11	- 0,996
118	45	2,74	- 0,988
118	50	3,86	- 0,997
118	55	3,40	- 0,994
118	60	3,77	- 0,996
118	65	3,66	- 0,998
120	40	2,44	- 0,999
120	45	1,91	- 0,996
120	50	1,83	- 0,996
120	55	2,35	- 0,998
120	60	2,25	- 0,998
120	65	1,85	- 0,996
122	40	0,88	- 0,995
122	45	1,09	- 0,998
122	50	1,20	- 0,997
122	55	0,92	- 0,994
122	60	1,33	- 0,998
122	65	1,03	- 0,998
125	40	0,39	- 0,996
125	45	0,32	- 0,987
125	50	0,46	- 0,992
125	55	0,36	- 0,996
125	60	0,53	- 0,992
125	65	0,51	- 0,996
128	40	0,14	- 0,995
128	45	0,16	- 0,988
128	50	0,17	- 0,992
128	55	0,17	- 0,990
128	60	0,20	- 0,998
128	65	0,14	- 0,991
131	40	0,072	- 0,990
131	45	0,082	- 0,990
131	50	0,083	- 0,987
131	55	0,109	- 0,992
131	60	0,084	- 0,997
131	65	0,071	- 0,996

T.T.= Temperatura de tratamiento

T.I.= Temperatura de incubación



TABLA V

Influencia de la temperatura de incubación sobre los valores  $D_T$  obtenidos al utilizar agar dextrosa triptona como medio de recuperación.

T.T. (° C)	T.I. (° C)	$D_T$ (min)	$r_o$
118	40	3,93	- 0,998
118	45	3,20	- 0,995
118	50	4,52	- 0,996
118	55	4,70	- 0,994
118	60	4,09	- 0,997
118	65	3,21	- 0,994
120	40	2,17	- 0,996
120	45	2,26	- 0,985
120	50	2,40	- 0,996
120	55	2,56	- 0,991
120	60	2,38	- 0,997
120	65	2,17	- 0,994
122	40	1,20	- 0,997
122	45	1,14	- 0,992
122	50	1,47	- 0,998
122	55	1,38	- 0,995
122	60	1,53	- 0,982
122	65	1,02	- 0,996
125	40	0,48	- 0,996
125	45	0,52	- 0,993
125	50	0,52	- 0,997
125	55	0,52	- 0,995
125	60	0,45	- 0,992
125	65	0,35	- 0,995
128	40	0,15	- 0,993
128	45	0,15	- 0,993
128	50	0,19	- 0,990
128	55	0,18	- 0,990
128	60	0,17	- 0,980
128	65	0,15	- 0,995
131	40	0,073	- 0,980
131	45	0,100	- 0,978
131	50	0,066	- 0,991
131	55	0,097	- 0,983
131	60	0,072	- 0,996
131	65	0,065	- 0,991

T.T.= Temperatura de tratamiento

T.I.= Temperatura de incubación

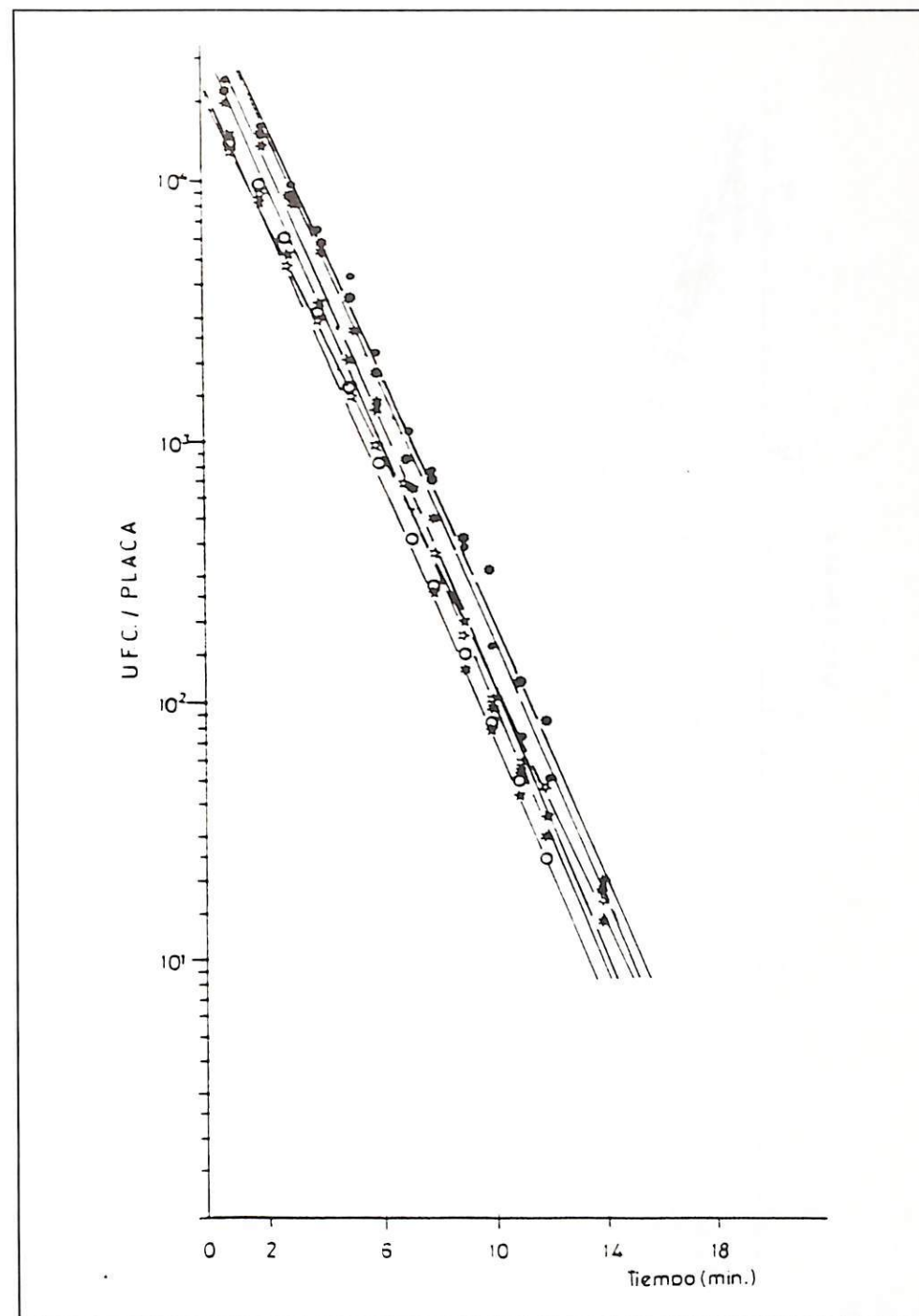


Fig. 1.- Influencia de la temperatura de incubación sobre la recuperación de *B. steurotherophilus* en agar nutritivo (NA). Temperatura de tratamiento: 118° C. (\* ) 40° C, (▲ ) 45° C, (● ) 50° C, (◐ ) 55° C, (● ) 60° C, (○ ) 65° C.

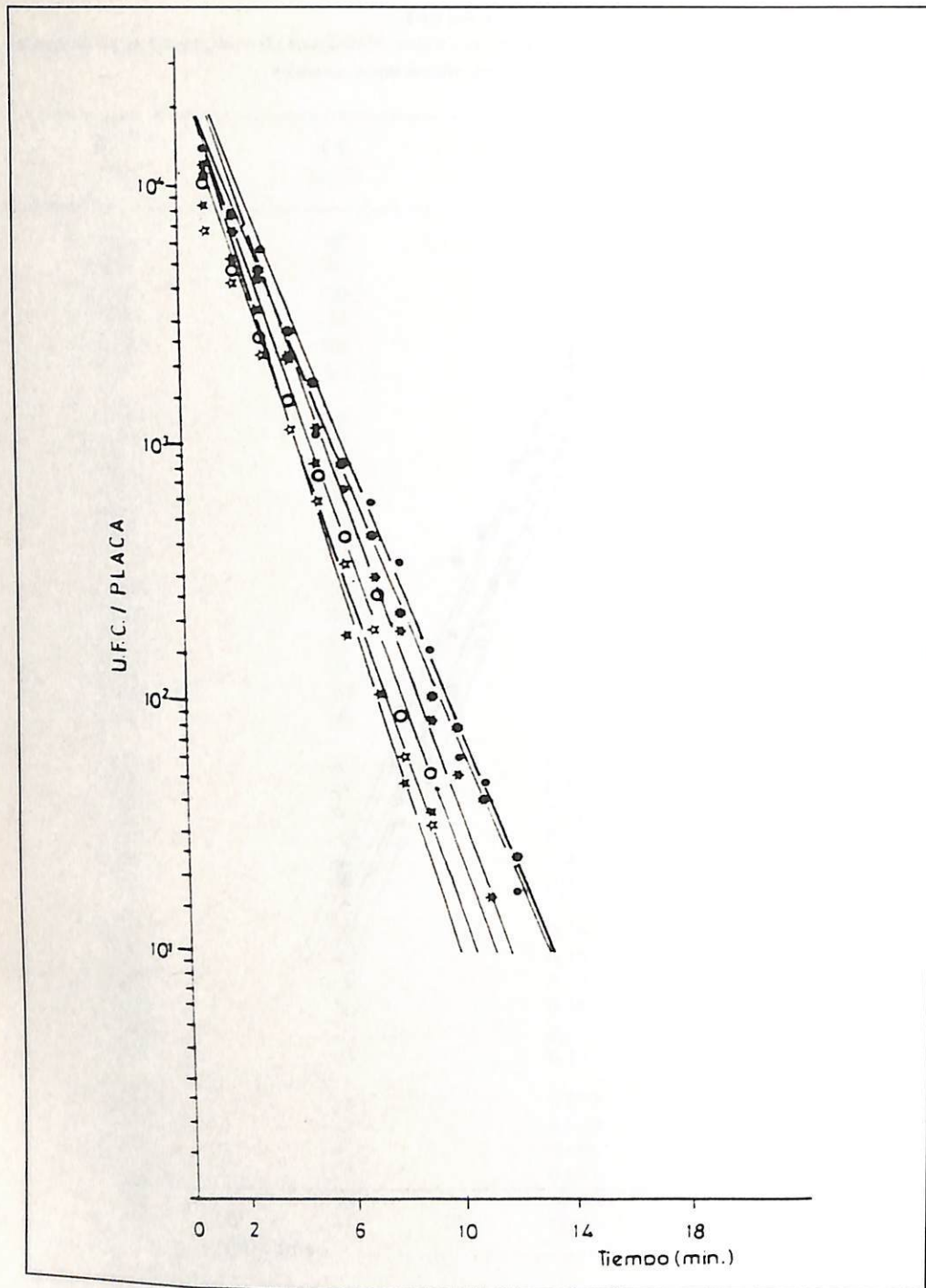


Fig. 2.- Influencia de la temperatura de incubación sobre la recuperación de *B. stearotherophilus* en medio de ensayo de antibióticos (AAM). Temperatura de tratamiento:  $118^{\circ}\text{C}$ . (\*  $40^{\circ}\text{C}$ , (★)  $45^{\circ}\text{C}$ , (●)  $50^{\circ}\text{C}$ , (◐)  $55^{\circ}\text{C}$ , (◑)  $60^{\circ}\text{C}$ , (○)  $65^{\circ}\text{C}$ .

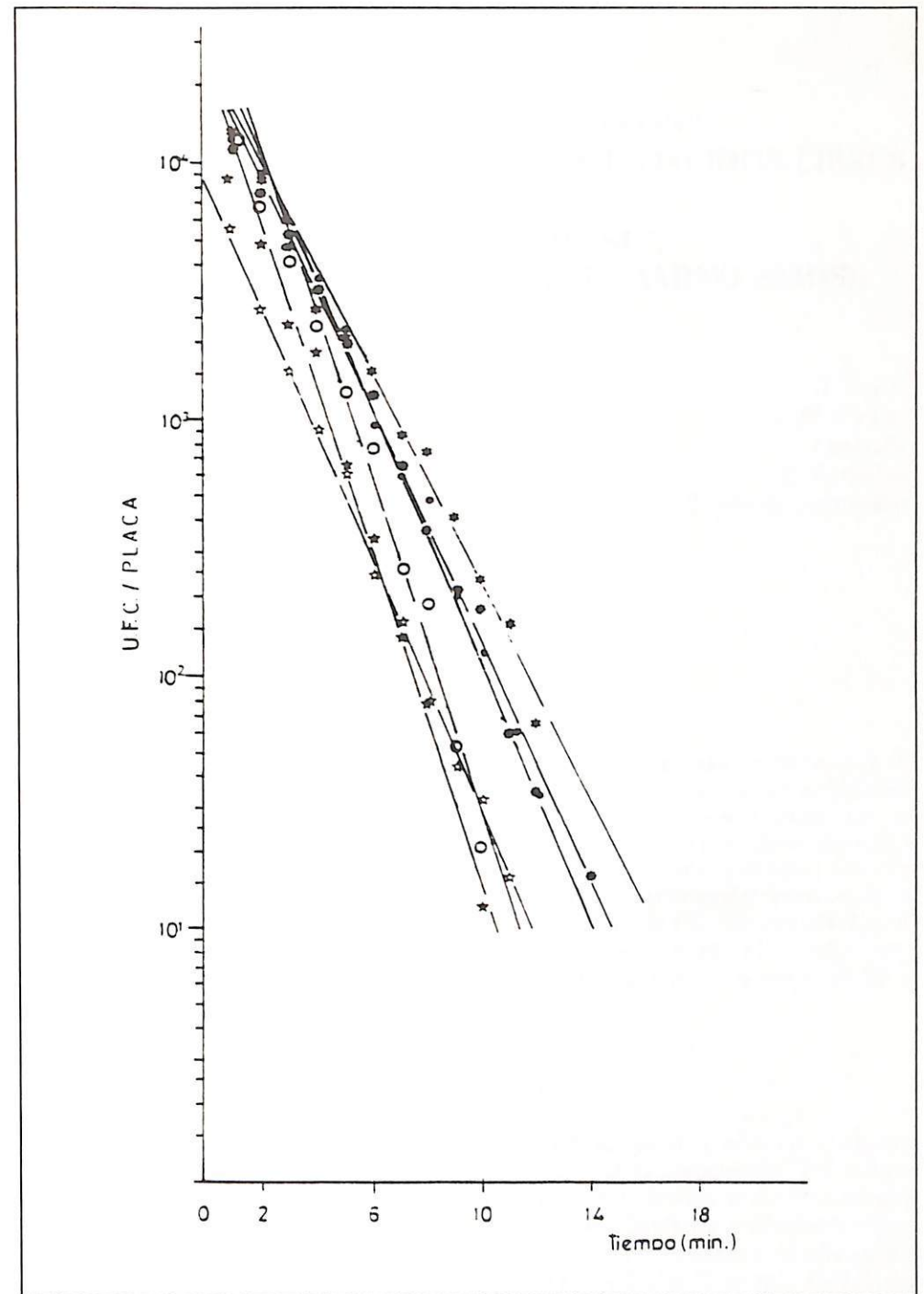


Fig. 3.- Influencia de la temperatura de incubación sobre la recuperación de *B. stearotherophilus* en agar dextrosa triptona (DTA). Temperatura de tratamiento:  $118^{\circ}\text{C}$ . (\*  $40^{\circ}\text{C}$ , (★)  $45^{\circ}\text{C}$ , (●)  $50^{\circ}\text{C}$ , (◐)  $55^{\circ}\text{C}$ , (◑)  $60^{\circ}\text{C}$ , (○)  $65^{\circ}\text{C}$ .