

## EFFECTO DEL TRATAMIENTO POR ULTRASONIDOS SOBRE LA TERMORRESISTENCIA DE DIVERSAS CEPAS DE *Bacillus Cereus* y *Bacillus Subtilis*<sup>1</sup>

Por J. A. Ordóñez,  
J. Burgos y  
B. Moreno

Los efectos de los ultrasonidos sobre los microorganismos son muy variados. Es bien conocido su efecto bactericida sobre los gérmenes no formadores de esporos y sobre las formas vegetativas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*; *Escherichia coli*, por ejemplo, es totalmente destruido durante 3-5 minutos de tratamiento (HUGHES, 1962), liberándose al medio de sonicación proteína, en una cantidad que depende del tiempo de oscilación y de la frecuencia empleada (HUGHES y NIBORG, 1962). El tratamiento ultrasónico se ha usado, a veces, para liberar las suspensiones de esporos de células vegetativas (HEILIGMAN y col., 1956).

La aplicación de ultrasonidos a las suspensiones de esporos durante períodos breves puede originar un incremento en los recuentos (BERGER y MARR, 1960; ORDÓÑEZ y col., 1971) por activación de los esporos o por ruptura de agregados.

Si los tratamientos son suficientemente drásticos, también pueden destruir las formas esporuladas. El efecto esporicida parece ser muy variable en su eficacia; tratamientos de 20 Kc. durante 30 minutos logran una reducción decimal en los esporos de *B. cereus*; para conseguir el mismo efecto sobre esporos de *B. licheniformis* se necesitan, en cambio, tratamientos de una hora (ORDÓÑEZ y col., 1971; BURGOS y col., 1972). BERGER y MARR (1960) logran el mismo efecto sobre esporos de *B. cereus* 2005 con tratamientos de 10 Kc. durante 180 minutos. PISANO y col. (1966) han necesitado, sin embargo, 8 horas de tratamiento para que el número de esporos supervivientes de *B. subtilis* var. *niger* sufra una reducción decimal, con una frecuencia de 30,4 Kc.

En previas publicaciones (ORDÓÑEZ y col., 1971 y BURGOS y col., 1972) se ha demostrado que los ultrasonidos sensibilizan acusadamente los esporos de *B. cereus* y *B. licheniformis* a los tratamientos térmicos.

Dada la importancia industrial que este efecto pudiera tener, de ser general el

<sup>1</sup> Este trabajo es parte de los estudios a realizar con una Beca de la Fundación Juan March.

fenómeno, en el presente trabajo se extienden estos estudios a otras cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*.

## MATERIAL Y METODOS

**Microorganismos:** se utilizaron las cepas siguientes de *Bacillus cereus*: *B. cereus* X-89-F, T-13-F, T-35-F y T-27-S, suministradas, todas ellas, por el profesor doctor Suárez Fernández (Facultad de Veterinaria de Zaragoza).

Las cepas empleadas de *Bacillus subtilis* fueron: *B. subtilis*-189, suministrada por el Institut de Bactériologie D'Hygiène et Virologie de la Facultad de Medicina de Lausanne, *B. subtilis* ATCC-5633 y *B. subtilis* Shenley (procedentes de Antibióticos, S. A.) y *B. subtilis* (Difco).

Los gérmenes se sembraron en frascos de Roux, preparados con el medio de cultivo descrito por WILLIAMS y col. (1957) y se incubaron a 32°C durante una semana. Los esporos se recogieron, lavaron y activaron según se ha descrito en un trabajo previo (ORDÓÑEZ y col., 1971).

El tratamiento ultrasónico se efectuó a 0°C. en un desintegrador ultrasónico M. S. E. de 60 watios, con una frecuencia de 20 Kc.

La termorresistencia se determinó en tubos capilares de punto de fusión bajo de 100 mm × 1,0-1,5 mm. según ha sido descrito también en un trabajo previo (ORDÓÑEZ y col., 1971).

El recuento de supervivientes se llevó a cabo en placas de Petri de Agar almidón leche (GRINSTED y CLEGG, 1965).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para la obtención de cada gráfica de supervivientes se utilizaron 5 lotes de capilares cada uno relleno con 20  $\mu$  l. 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.

La figura 1 muestra la termorresistencia a 97°C de la cepa *B. cereus* X-89-F sin tratamiento ultrasónico y tras la aplicación de ultrasonidos durante 30 minutos. No hay cambios significativos de la misma. Dada la naturaleza de las gráficas de termorresistencia obtenidas es difícil calcular los valores de las reducciones decimales, pero se observa la práctica superposición de ambas curvas que revela la falta de un efecto sensibilizante a los tratamientos térmicos.

En las cepas *B. cereus* T-27-S y *B. cereus* T-35-F (figuras 2 y 3, respectivamente) el efecto producido por los ultrasonidos es similar: se da una clara sensibilización a los efectos del calor, especialmente manifiesto en los recuentos de supervivientes a los cinco primeros minutos de tratamiento térmico.

El efecto de los ultrasonidos sobre la cepa *B. cereus* T-13-F (figura 4) es parecido al ejercido sobre las anteriores.

La figura 5 muestra el descenso de la termorresistencia del *B. subtilis*-189 tras la aplicación de ultrasonidos. El valor D<sub>110°C</sub> pasa de 4,95 a 4,3 minutos al ser ultrasonificados durante 40 minutos.

En la figura 6 puede verse los efectos de 10 minutos de sonicación sobre la termorresistencia de *B. subtilis* ATCC 5633 a 107°C. En este caso, el efecto producido por los ultrasonidos es mucho más manifiesto sobre los esporos que mueren durante los primeros 5 minutos (al igual que ocurría en *B. cereus* T-27-S y *B. cereus* T-35-F). En los esporos sonicados han ocurrido 4 reducciones decimales en los primeros 5 minutos, mientras que en los no tratados con ultrasonidos sólo ocurren 2,4 reducciones decimales.

El efecto de los ultrasonidos sobre los esporos de *B. subtilis* Shenley (figura 7) y *B. subtilis* (Difco) (figura 8), a los que se aplicaron un tratamiento ultrasónico de 10 minutos y se sometieron a una temperatura de 107°C. es muy escaso y reducido a la supervivencia tras 5 minutos de calentamiento; luego las gráficas de termorresistencia son, prácticamente, paralelas.

En general, en las gráficas de supervivencia al calentamiento de las cepas sensibilizadas por el tratamiento ultrasónico se observan dos zonas: la inicial de 5-10 minutos de duración en los que el descenso del número de supervivientes es mucho más acusado en las muestras sonicadas, y otra final en la que los esporos resistentes a este calentamiento inicial muestran tiempos de reducción decimal prácticamente idénticos al de los no tratados que han resistido el mismo tratamiento térmico.

Los esporos de *B. cereus* parecen, en términos generales, más afectados en su termorresistencia por la ultrasonificación que los de *B. subtilis* pero la respuesta de las distintas cepas es muy variable. Parece, en cualquier caso, indudable que el tratamiento ultrasónico de los líquidos antes de su esterilización por el calor puede resultar una considerable potenciación del efecto de éste.

La termorresistencia de los esporos de *B. cereus* se ha relacionado estrechamente con su contenido en ácido dipicolínico (CHURCH y HALVORSON, 1959) y es generalmente admitido que este ácido y el Ca<sup>++</sup> juegan un importante papel en la protección de los esporos frente al calor (LECHOWICZ y ORDAL, 1962; VINTER y VECHET, 1964; VINTER, 1965).

Los tratamientos ultrasónicos por nosotros aplicados liberan, sin embargo, cantidades mínimas de estos dos compuestos (ORDÓÑEZ y BURGOS, datos no publicados), lo que no es extraño si se tiene en cuenta de un lado que el ácido dipicolínico se encuentra localizado en el protoplasto (LEANZ y GILVARG, 1973) y de otro que, a la luz de las observaciones de microscopía electrónica, nuestros tratamientos ultrasónicos sólo afectan estructuralmente al exosporium (SILVA, ORDÓÑEZ y BURGOS, datos no publicados). Parece pues probable que el tratamiento ultrasónico afecte

a la termorresistencia de los esporos a través de sus efectos sobre algún componente de las capas externas del espora que pudiera hallarse relacionado con la termorresistencia, como el ácido  $\alpha$   $\epsilon$  -diaminopimélico (WARTH y col., 1962; MURREL y WARTH, 1965).

## RESUMEN

Se han estudiado los efectos sensibilizantes al calor del tratamiento con ultrasonidos sobre los esporos de cuatro cepas de *Bacillus subtilis* y otras cuatro de *Bacillus cereus*. La cuantía de la sensibilización varía muy considerablemente con las cepas; en general, la ultrasonificación afecta sobre todo a la supervivencia tras los primeros 5-10 minutos de tratamiento térmico; los que resisten este calentamiento parecen igualmente sensibles al tratamiento térmico, hayan sido o no sometidos a la acción de los ultrasonidos.

## RESUME

On a étudié les effets sensibles à la chaleur du traitement avec des ultra-sons sur les spores de quatre souches de *Bacillus subtilis* et quatre autres de *Bacillus cereus*. La quantité de sensibilisation varie beaucoup selon les souches; en général, l'ultra-sonication affecte surtout la survivance après les premières 5-10 minutes de traitement thermique; ceux qui résistent cet échauffement semblent être également sensibles au traitement thermique, qu'ils aient été soumis ou non à l'action des ultra-sons.

## SUMMARY

A study has been made on the effects sensitive to ultrasonic treatment heating on the spores of four strains of *Bacillus subtilis* and four other strains of *Bacillus cereus*. The amount of sensitization varies greatly according to the strains; in general, ultrasonication affects specially the survival after the first 5-10 minutes of thermic treatment; those which resist said heating are equally sensitive to thermic treatment after having been or not subjected to ultra-sonic action.

## BIBLIOGRAFIA

- BERGER, J. A. y MARR, A. G. (1960): *J. Gen. Microbiol.* **22**, 147.  
BURGOS, J., ORDÓÑEZ, J. A. y SALA, F. J. (1972): *Appl. Microbiol.* **24**, 497.  
CHURCH, B. D. y HALVORSON, H. O. (1959): *Nature*, **183**, 124.  
GRINSTEAD, E. y CLEGG, L. F. L. (1955): *J. Dairy Sci.* **22**, 178.  
HEILIGMAN, F., DESROSIER, N. W. y BROUMAND, H. (1956): *Food. Res.* **21**, 63.  
HUGHES, D. E. (1962): *J. Microbiol. Biochem. Eng. and Technol.* **4**, 405.  
HUGHES, D. E. y NYBORG, W. L. (1962): *Science* **138**, 108.  
LEANZ, G. y GILVARG, Ch. (1973): *J. Bacteriol.* **114**, 455.  
LECHOWICH, R. V. y ORDAL, Z. J. (1962): *Can. J. Microbiol.* **8**, 287.

- MURREL, W. G. y WARTH, A. D. (1965): *En Spores III*. pág. 1. Edit. Campbell, L. L. y Halvorson, H. O. Amer. Soc. Microbiol. Michigan.  
ORDÓÑEZ, J. A., BURGOS, J. y SALA, F. J. (1971): *Anal. Fac. Vet. León*. Año XVII, núm. 17, pág. 91.  
PISANO, M. A., BOUCHER, R. M. G. y ALCAMO, I. E. (1966): *Appl. Microbiol.* **14**, 732.  
VINTER, V. (1965): *Conference of IAEA*. Publ. N.º 653207. F.A.O. Viena.  
VINTER, V. y VECHET, B. (1964): *Folia Microbiol. Praha*. **9**, 352.  
WARTH, A. D., OHYE, D. F. y MURRELL, W. G. (1962): *VIII Intern. Congr. Microbiol.* Montreal. Pág. 16.  
WILLIAMS, D. J., FRANKLIN, J. G., CHAPMAN, H. R. y CLEGG, L. F. L. (1957): *J. Appl. Bacteriol.* **20**, 43.

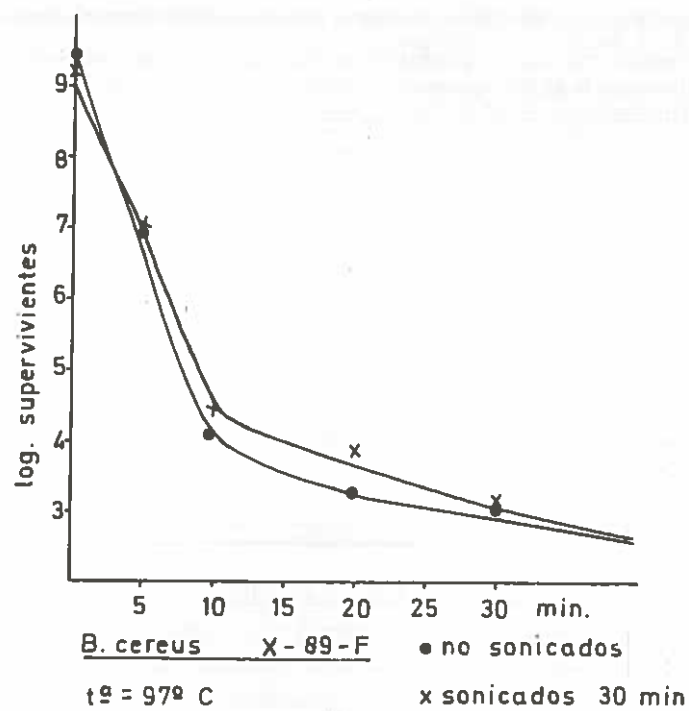


FIGURA 1

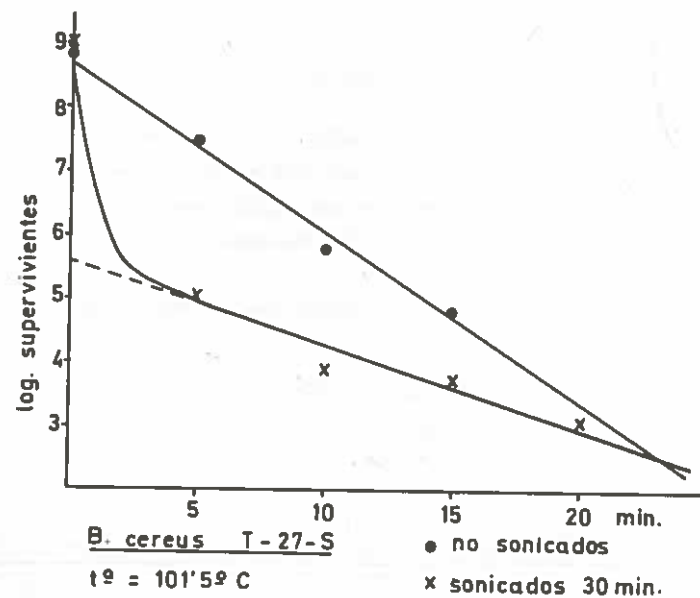


FIGURA 2

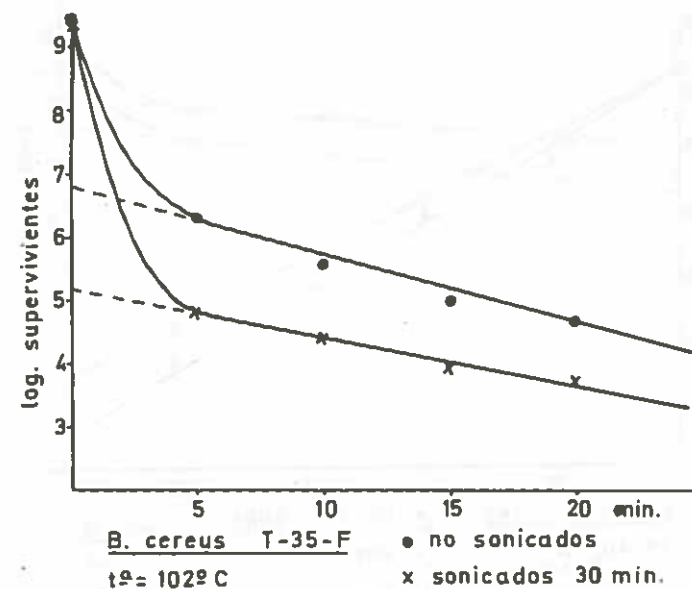


FIGURA 3

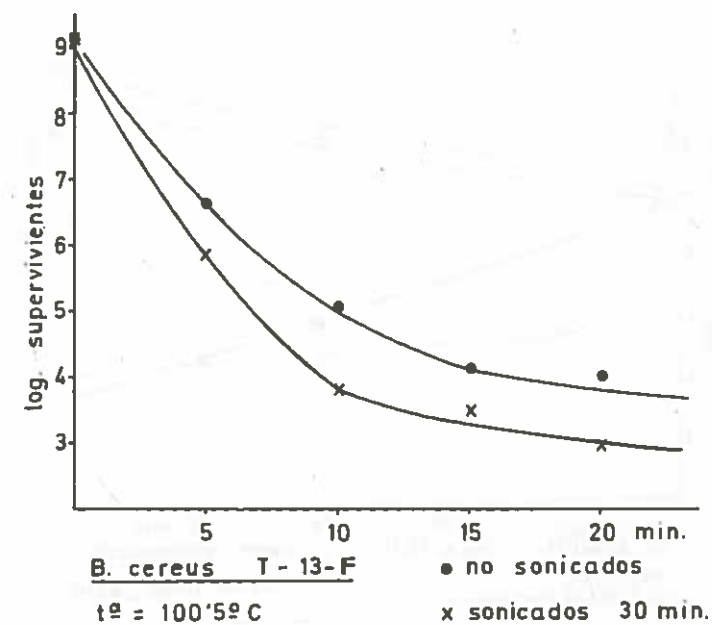


FIGURA 4

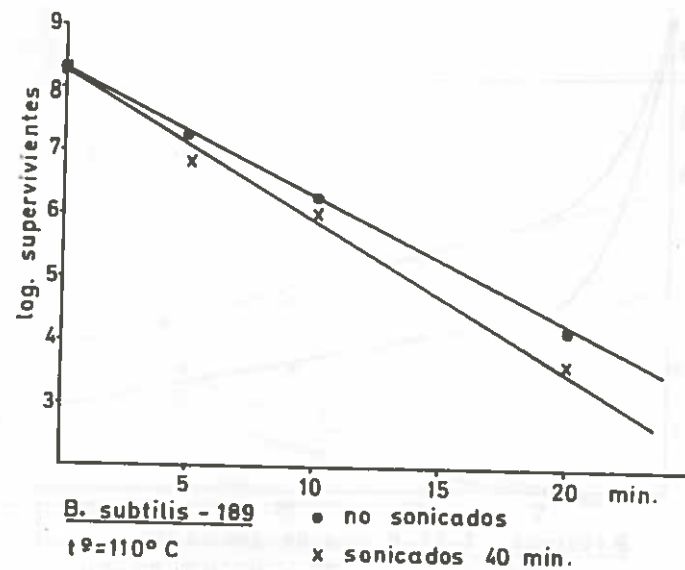


FIGURA 5

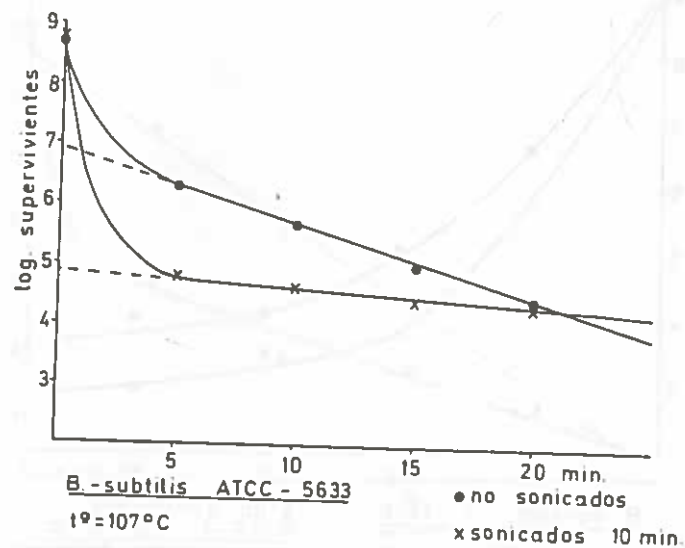


FIGURA 6

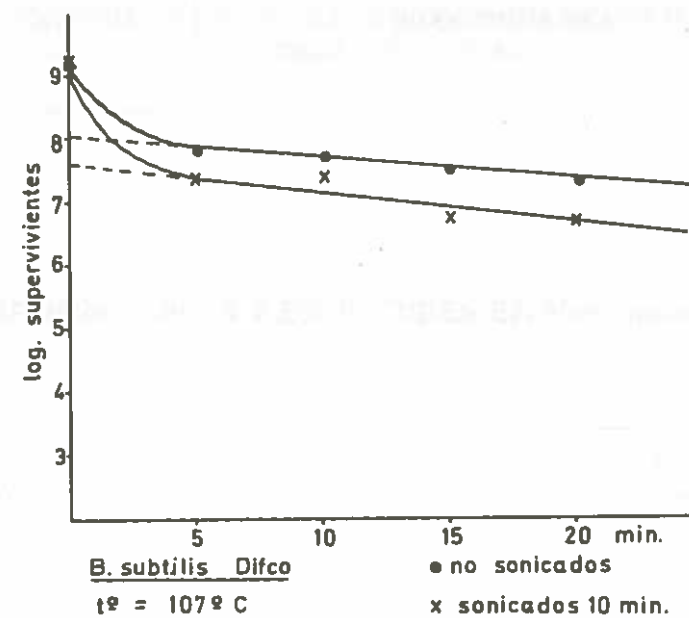


FIGURA 7

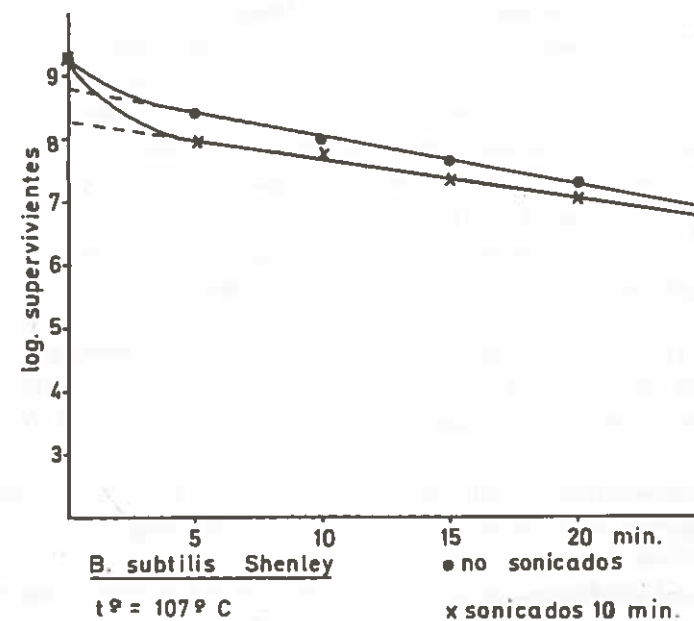


FIGURA 8