

Inhibición de bacterias esporuladas aerobias por frío y sorbato de potasio *

Di Conza, José Alejandro; Vaccari, María Celia; Moragues, Liana; Iacona, Valeria.

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, CC 530, (3000), Santa Fe, Argentina. Tel/Fax: 042-571142. E-mail: viacona@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: En este trabajo se estudia la inhibición de bacterias esporuladas aerobias (contaminantes habituales de alimentos) por acción del sorbato de potasio (SK) en concentración de 0,5% y el frío (8°C). Se ensayaron 8 cepas de *Bacillus* aisladas de canales de pollo. Para evaluar la inhibición, se efectuaron contaminaciones experimentales sobre alas de pollo. Se determinaron los tiempos necesarios para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico en las distintas condiciones de trabajo. Posteriormente, se calcularon los índices de inhibición (I). Se observó una heterogeneidad en la respuesta de las distintas cepas de *Bacillus* frente al SK. El frío presentó una inhibición superior a la producida por el SK, pero los mejores resultados se obtuvieron al evaluar su efecto en forma conjunta. Por lo tanto, para mejorar la calidad y vida útil del alimento, se recomienda la acción combinada de estos conservadores, que permitiría independizarse de la cepa que predomine.

SUMMARY: This work examines inhibition of aerobic sporulated bacteria (which usually contaminated foods) due to 0.5% potassium sorbate (SK) and cold storage (8°C). *Bacillus* strains (8) were isolated from chicken carcasses. Chicken wings were experimentally contaminated in order to evaluate inhibition. The time necessary for the initial microbial population to increase logarithmically under different working conditions was also assessed. Afterwards, Inhibition Indices (I) were calculated. A heterogeneous response to SK was obtained for different *Bacillus* strains. Cold storage produced an inhibitory effect stronger than that produced by SK, but the best results were obtained when both effects were jointly evaluated. As a result, a combination of both preservative methods is recommended in order to improve food quality and self life, regardless of the predominant strain.

Introducción

Existen numerosos trabajos que recomiendan el uso de sorbato de potasio (SK) para prolongar la vida útil de productos cárnicos (vacunos, aves y pescado)(1-4).

Se ha demostrado que el SK además de actuar sobre hongos y levaduras, inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas, especialmente de aquellas que son catalasa positiva, dado que se une covalentemente con los grupos sulfhidrílos de esta enzima (1, 3 - 6).

El uso de este aditivo antimicrobiano no solo mejora la calidad microbiológica de estos alimentos, sino que además reduce el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos (7).

Pocos son los estudios del efecto del SK sobre las bacterias esporuladas que también contaminan las carnes, contribuyen a su alteración y aumentan el riesgo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (8).

En este trabajo se evalúa la conveniencia de

usar SK, además de la acción del frío, para conservar canales de pollo y productos derivados frente al deterioro producido por las bacterias esporuladas aerobias.

Para tal fin se ensayaron cepas potencialmente toxicogénicas del Género *Bacillus* aisladas de canales de pollo, hallando el índice de inhibición por SK y por frío para cada una de ellas.

Materiales y métodos

Procedencia de las cepas

Se ensayaron 8 cepas de *Bacillus*: 2 de *B. cereus*, 3 de *B. licheniformis*, 1 de *B. megaterium* y 2 de *B. subtilis*.

Las mismas se aislaron de canales de pollo, se ubicaron taxonómicamente mediante las claves de identificación (9, 10) y se conservaron por el método de absorción en sílica gel anhidra.

Cosecha de esporos

Las cepas se reactivaron suspendiendo 2 o 3 granallas del conservado en sílica gel en 5 ml de Caldo Soya Tripticasa (CST) o Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Se incubó a 30°C por 24 - 48 hs. (hasta observar desarrollo abundante).

(*) Este trabajo forma parte del Proyecto CAI + D/96 N° 045.

Luego de dos repiques sucesivos de la cepa en estudio, se preparó el inóculo en 5 ml de CST o BHI, incubándolo 24 hs. a 30°C.

Con el mismo se sembró una botella Roux conteniendo Agar para Esporulación (Agar Nutritivo + MnSO₄ 0,05% y MgSO₄ 0,05%) y se incubó a 30°C durante 7 a 10 días. Posteriormente se recuperaron los esporos con buffer fosfato 0,1M pH = 6,8. Se lavaron 3 veces con el mismo buffer centrifugando alternadamente 15 minutos a 3500 rpm. Luego se indujo la lisis de las células vegetativas manteniéndolas en suspensión en el mismo buffer por 48 - 72 hs. a 30°C. Finalmente se lavaron nuevamente 3 veces respetando las condiciones anteriores (11). La concentración de esporos cosechada estuvo comprendida entre 10⁸ y 10¹⁰ UFC/ml.

Los esporos así obtenidos se conservaron en el buffer fosfato a 4°C durante no más de un mes.

Contaminación Experimental

Se realizó sobre presas de pollo (alas) adquiridas en el comercio. Las mismas se lavaron con agua destilada estéril y se sumergieron en una suspensión de esporos de concentración conocida.

Previamente a la contaminación experimental, los esporos se sometieron a un choque térmico (80°C durante 10 minutos) a fin de eliminar las células vegetativas que pudieran haber quedado y activar los esporos para facilitar su crecimiento (12).

Según lo informado por otros investigadores, las canales de pollo sumergidas en SK al 5% durante 5 minutos, presentan un nivel de SK residual menor que el valor máximo permitido por el Código Bromatológico Argentino (0,4%) en alimentos (13).

En base a estos estudios y a ensayos previos, se eligió una concentración de SK diez veces menor, a fin de preservar la mayor inocuidad del alimento.

La elección del pH 4,8 se debió a su cercanía al pKa del ácido sórbico, para así trabajar con la mayor actividad antimicrobiana (forma no disociada) (6, 14, 15).

Tratamiento de las muestras contaminadas

Las mismas se sumergieron durante 5 minutos en una suspensión de 10⁵ esporos/ml de agua destilada estéril (para la muestra control) o por ml de solución de SK 0,5% llevado a pH = 4,8 con ácido acético glacial (para la muestra tratada).

Transcurridos 5 minutos de contacto, las alas

fueron escurridas durante 10 segundos y transferidas a sendos recipientes estériles, almacenándolas a dos temperaturas diferentes: 20°C y 8°C.

Evolución del crecimiento

Se obtuvieron curvas de crecimiento realizando recuentos sucesivos durante períodos de tiempo predeterminados para las diferentes condiciones de trabajo.

Se utilizaron dos presas de pollo para cada tiempo. Se realizaron diluciones decimales en agua de peptona al 0,1%. A su vez cada dilución se plaqueó por duplicado.

Se empleó el método de recuento en placa por vertido utilizando APC más 0,1% de almidón. Se incubó a 30°C durante 24 - 48 hs.

Determinación de la Actividad Inhibitoria

A partir de las curvas de crecimiento se calculó el Índice de Inhibición (I) utilizando la siguiente fórmula (2, 3):

$$I = 1 - (t_c/t_t)$$

Donde t_c y t_t son los tiempos necesarios para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico para la muestra control y la tratada respectivamente.

De acuerdo a las condiciones de trabajo aplicadas, se obtuvieron cuatro curvas de crecimiento para cada microorganismo ensayado. De las mismas se hallaron los siguientes tiempos:

t₁ = tiempo necesario para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico en la muestra control conservada a 20°C.

t₂ = idem a t₁ con la muestra tratada con SK 0,5% pH = 4,8.

t₃ = idem a t₁ con la muestra conservada a 8°C.

t₄ = idem a t₃ con la muestra tratada con SK 0,5% pH = 4,8.

Por último, los Índices de Inhibición (I) estudiados fueron:

I debido al SK: (I_s) = 1 - (t₁/t₂)

I debido a la refrigeración: (I_r) = 1 - (t₁/t₃)

I debido a la acción conjunta del SK y el frío:

(I_c) = 1 - (t₁/t₄)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron estadísti-

camente con el software SPSS VER: 6.1.3/95. Se realizó análisis de regresión lineal y correlación entre cada par de variables; siendo la variable independiente el Tiempo y la variable dependiente el Logaritmo de UFC/ml (16).

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los tiempos necesarios para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico. Para hallar estos tiempos, se linealizó la fase exponencial de las curvas de crecimiento. Dichas rectas se obtuvieron aplicando

análisis estadístico de regresión lineal donde todos los coeficientes de correlación (r) resultaron entre 0,929 y 0,995 y significativos al 5%. Además, los p -value asociados a la estimación de la pendiente y los p -exacto asociados al estadístico F de la tabla de ANOVA resultaron, en todos los casos, menor a 10^{-4} .

Al analizar estos tiempos se observa la tendencia de inhibición, donde los microorganismos tratados solamente con SK (t_2) necesitan tiempos menores para multiplicarse que los tratados con frío (t_3) y estos aún menos que los tratados con SK más frío (t_4).

Tabla 1. Tiempos necesarios para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico.

Cepa	t1 (min)	t2 (min)	t3 (min)	t4 (min)
<i>B. cereus 1</i>	136	227	512	848
<i>B. cereus 2</i>	306	787	1089	1612
<i>B. licheniformis 1</i>	367	477	1018	1858
<i>B. licheniformis 2</i>	210	671	822	2919
<i>B. licheniformis 3</i>	177	576	942	3052
<i>B. megaterium</i>	466	524	705	2038
<i>B. subtilis 1</i>	438	555	1264	2157
<i>B. subtilis 2</i>	245	411	441	850

t = tiempo necesario para incrementar la población microbiana inicial en un ciclo logarítmico.

t1 = muestra control conservada a 20°C, t2 = muestra tratada con SK 0,5% pH 4,8 conservada a 20°C, t3 = muestra conservada a 8°C y t4 = muestra tratada con SK 0,5% pH 4,8 conservada a 8°C.

Los Índices de Inhibición (I) para los distintos parámetros evaluados se muestran en la TABLA 2 y en el GRAFICO 1. El SK como único agente conservador muestra una acción inhibitoria (I_s) muy variable. Este efecto se observa, no solo entre una especie y otra del Género *Bacillus*, sino también entre cepas de la misma especie. Si bien, la refrigeración (I_r) produce una inhibición superior a la del SK en todas las cepas, estos Índices también varían considerablemente. Sin embargo, al analizar la acción conjunta del SK y el frío (I_c), se observa la presencia de I aún mayores y más homogéneos.

Si bien otros investigadores trabajan con células vegetativas de distintos grupos bacterianos y

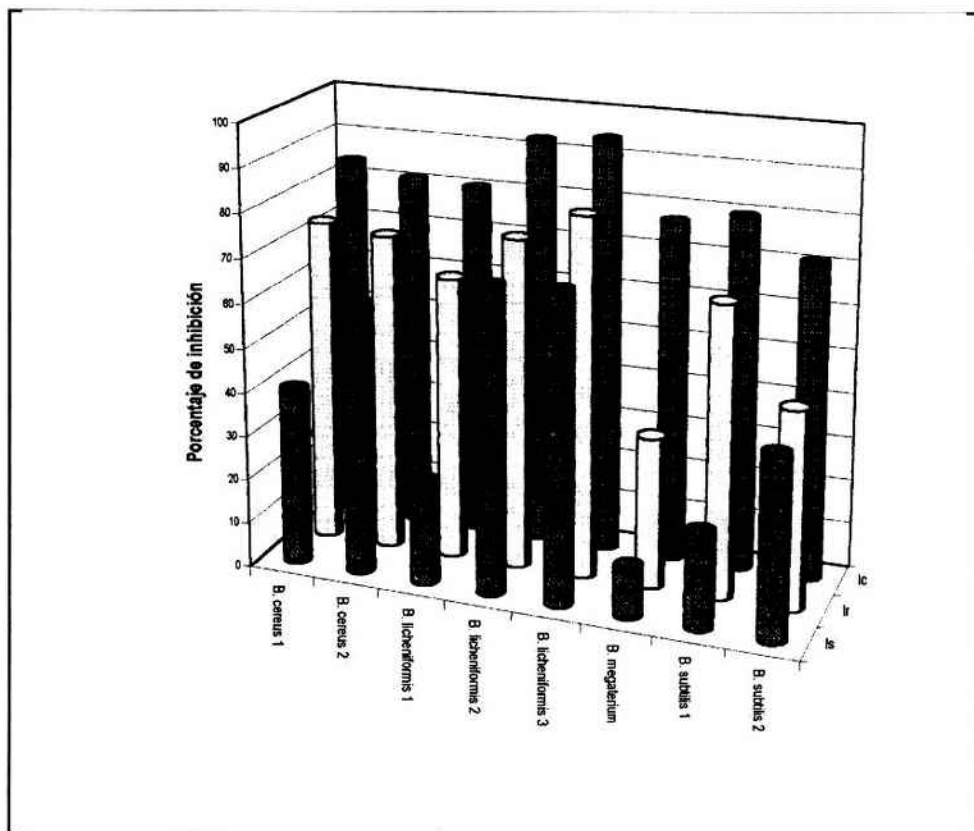
con otros valores de Temperatura de almacenamiento, pH y Concentración de SK, coinciden en el comportamiento heterogéneo de inhibición del SK sobre los microorganismos estudiados (2 - 4). Con respecto a los endosporos bacterianos, esta heterogeneidad en la resistencia al antimicrobiano estaría además afectada por la mayor o menor permeabilidad de las envolturas que rodean al core (17).

Se comparte el hecho de que una ininterrumpida cadena de frío ayuda a mantener al alimento en óptimas condiciones microbiológicas (4, 13), comprobado específicamente en este trabajo para distintas especies contaminantes pertenecientes al Género *Bacillus*.

Tabla 2. Índices de Inhibición para los distintos parámetros analizados.

Cepa	Is (%)	Ir (%)	Ic (%)
<i>B. cereus</i> 1	40.1	73.4	84.0
<i>B. cereus</i> 2	61.2	71.9	81.0
<i>B. licheniformis</i> 1	23.1	63.9	80.3
<i>B. licheniformis</i> 2	68.7	74.4	92.8
<i>B. licheniformis</i> 3	69.3	81.2	94.2
<i>B. megaterium</i>	11.1	33.9	77.1
<i>B. subtilis</i> 1	21.1	65.4	79.7
<i>B. subtilis</i> 2	40.4	44.4	71.2

Is = Índices de Inhibición debido al SK (0,5%), Ir = Índices de Inhibición debido a la refrigeración (8°C), Ic = Índices de Inhibición debido a la acción conjunta del SK y el frío.

Gráfico 1. Índices de Inhibición para los distintos parámetros analizados.

Is: Índice de Inhibición por tratamiento con SK.

Ir: Índice de Inhibición por tratamiento con frío.

Ic: Índice de Inhibición por tratamiento combinado de SK más frío.

Conclusión

El tratamiento de las carnes con SK o con refrigeración produciría una inhibición de esporos de *Bacillus* condicionada a la cepa y a la especie de esporos presente.

Sin embargo, se podría minimizar en gran parte esta dependencia si el efecto del SK se complementa con una adecuada e ininterrumpida cadena de frío.

El resultado de esta acción conjunta no responde a un efecto sumativo ni sinérgico, excepto en el *B. megaterium* donde podría existir una acción sinérgica.

Dado que no debe desestimarse la probable presencia de endosporos particularmente resistentes a la inhibición por este antimicrobiano, es fundamental aplicar durante el procesamiento de los alimentos, Códigos de Buenas Prácticas de Elaboración y el Programa de Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP).

Agradecimientos

A la Lic. VAIRA, Stella Maris (Departamento de Matemática. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. U.N.L.) por su colaboración en el estudio estadístico.

Bibliografía

- 1- Drosinos E. H, Lambropoulou K, Mitre E, Nychas G. J. E. 1997. Attributes of fresh gilt-head Seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at $0 \pm 1^\circ\text{C}$. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 569-575.
- 2- Zamora M. C, Zaritzki N. E. 1987. Antimicrobial activity of undissociated sorbic acid in vacuum packaged beef. *J. Food Science* **52**: 1449-1454.
- 3- Zamora M. C, Zaritzki N. E. 1987. Potassium sorbate inhibition of microorganisms growing on refrigerated packaged beef. *J. Food Science* **52**: 257-262.
- 4- Tessi M. A, Rafaguelli R. C, Tiburzi de Silva M. C, Jimenez de Terenzani S. M, Moguilevsky, M. A. 1993. Calidad microbiológica de canales de pollo decontaminadas por inmersión en ácidos orgánicos al vacío a 4°C . *La alimentación latinoamericana* **194**: 39-48.
- 5- Robach M. C, Sofos J. N. 1982. Use of sorbates in meat products fresh poultry products. A review. *J. Food Prot.* **45**: 374-383.
- 6- Russell A. D, Hugo W. B, Ayliffe G. A.J. 1992. "Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization". 2ª. Ed. Blackwell Scientific Publications. (Londres). 351-397.
- 7- Banks J. G, Morgan S, Strnger M. F. 1988. Inhibition of heated *Bacillus* spores by combinations of potassium sorbate, sodium benzoate, pH, and organic acids. *Lebensmittel - Wissenschaft technology* **21**: 250-255.
- 8- Jay James M. 1994. "Microbiología moderna de los Alimentos". 3 ra. Edición. Ed. Acriba. (España). 590-593.
- 9- Gordon R. 1973. "The Genus *Bacillus*" In: C.R.C. Handbook of microbiology. Edited by A. Y. Laskin and Lechevalier. C.R.C. Press, (Cleveland, Ohio, USA), I. 71-88.
- 10- Deak T, Timar E. 1988. Simplified identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. *Intern. Journal of Food Microbiology* **6**: 115-125.
- 11- Shehata T. E, Collins E. B. 1972. Sporulation and heat resistance of psychrophilic strain of *Bacillus*. *J. Dairy Sci.* **55**: 1405-1409.
- 12- Reinheimer J. A, Bargagna M. L. -1987- Response of psychrotrophic strains of *Bacillus* to different heat treatments. *Microbiologie Aliments - Nutrition* vol 5: 117-122.
- 13- Rafaguelli R. C, Tessi M. A, Tiburzi de Silva M. C, Jimenez de Terenzani S. M, Moguilevsky, M. A. 1990. Efecto del sorbato de potasio en la calidad microbiológica y vida útil de canales de pollo conservadas a 5°C . *La Industria Cárnica Latinoamericana* **19**: 22-29.
- 14- Tessi M. A, Bustos M, Rafaguelli R. C, Moguilevsky, M. A. 1992. Supervivencia y antibiótico resistencia de *Salmonella* aisladas de canales de pollos descontaminados por inmersión en ácidos orgánicos y conservadas al vacío a 4°C . *La Industria Cárnica Latinoamericana* **90**: 19-25.
- 15- Guirguis A.H, Griffiths M.W, Muir D. D. 1983. Sporeforming bacteria milk. Optimisation of heat treatment for activation of spores of *Bacillus* species. *Milchwissenschaft* **38**: 641-644.
- 16- Myers R. H. 1990. "Classical and Modern Regression with Applications". 2ª edición. PWS-Kent Publishing Company. (Boston). 8-80.
- 17- Setlow P. 1994. Mechanisms which contribute to the long term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* **76**: 49-60.