

Medidas de parámetros de resistencia térmica en esporos del Género *Bacillus* aislados de pollo fresco

Iacona, Valeria; Di Conza, José; Benzzo, María T.; Vaccari María C.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas U.N.L.
Ciudad Universitaria, Paraje "El Pozo". CC 242. 3000 Santa Fe – Argentina
Tel-FAX: 54 342 4575221
E-mail: viacona@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: En la actualidad, son cada vez más frecuentes los informes sobre la existencia de cepas de bacilos formadores de endosporos, aislados a partir de alimentos procesados, que resistieron al tratamiento térmico recibido durante su elaboración. Considerando que las bacterias esporuladas presentes en un alimento procesado tienen su origen principalmente en el alimento crudo, en este trabajo se estudió la termorresistencia de 9 cepas de *Bacillus* aisladas de pollo fresco. Las especies estudiadas fueron *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. megaterium*, determinando para cada una de ellas dos parámetros de termorresistencia: el tiempo de reducción decimal (valor D) y el valor z.

Se hallaron 2 cepas que mostraron una alta termorresistencia: *B. cereus* L31 y *B. subtilis* L13.

Las bacterias esporuladas aerobias presentes en un alimento constituyen un riesgo, no sólo desde la perspectiva tecnológica por causar el deterioro del mismo, sino también porque implican un peligro potencial para la salud del consumidor.

Palabras claves: Resistencia térmica-endosporos- valor D- valor z.

SUMMARY: Measurement of heat-resistance parameters on *Bacillus* spores isolated from chicken carcasses. Iacona, Valeria; Di Conza, José; Benzzo, María T.; Vaccari, María C. Reports on the existence of heat-resistant, endospore-forming bacillus strains isolated from processed food are becoming increasingly frequent.

Since sporulated bacteria found in processed food come mainly from raw food, this work focused on heat resistance of 9 *Bacillus* strains isolated from raw chicken. Four species (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. megaterium*) were studied. Two parameters, which are considered to be indicative of heat resistance, were assessed: decimal reduction time (D value) and z value. Two strains (*B. cereus* L31 and *B. subtilis* L13) were shown to be highly resistant to heat.

Not only do sporulated aerobic bacteria found in food pose a risk from a technological viewpoint, since food itself will probably spoil, but they are likely to become a potential hazard for the consumer's health.

Key words: heat resistance – endospores – D value – z value.

Introducción

Las bacterias esporuladas aerobias del Género *Bacillus* son uno de los más importantes microorganismos que causan el deterioro de los alimentos y enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) (1).

La característica distintiva de estos endosporos es su elevada resistencia a los agentes adversos: calor, desecación, agentes químicos, radiaciones ionizantes y su relativamente fácil germinación en condiciones favorables.

Los blancos principales para la muerte de los endosporos por calor son las proteínas y las enzimas de los endosporos intactos, como también el daño a las envolturas (2-4).

Con la finalidad de destruir la viabilidad de los endosporos, los alimentos son sometidos a diferentes tratamientos térmicos, logrando con ello mejorar la calidad microbiológica, aumentar su vida útil y reducir el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos (5).

Muchos son los informes sobre la existencia de cepas de bacilos formadores de endosporos, aislados a partir de alimentos procesados, que resistieron al tratamiento térmico recibido durante su elaboración. Entre otros: Bradshaw y col (6) en sopas enlatadas; Franklin y col (7), Mostert y col (8) y Pettersson y col (9) en leche UHT y productos láct-

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

teos; Pinhatti y col. (10) en jugos de frutas pasteurizados.

Estas bacterias mesófilas, que se diferencian por producir esporos de alta resistencia al calor, se denominan cepas HHRS (Highly heat-resistant endospores) (9, 11).

Considerando que las bacterias esporuladas presentes en un alimento procesado tienen su origen principalmente en el alimento crudo, el propósito de este trabajo es estudiar la termorresistencia de 9 cepas de *Bacillus* aisladas de pollo fresco. Los parámetros estudiados fueron el tiempo de reducción decimal (**valor D**), que indica el tiempo (en minutos) necesarios para destruir el 90% de los esporos a una temperatura dada, y el **valor z**, que refleja el aumento de temperatura (°C) que causa la reducción de 10 veces el valor D.

Materiales y Métodos

Procedencia de las cepas

Las 9 cepas de *Bacillus*: 3 de *B. cereus*, 2 de *B. subtilis*, 2 de *B. licheniformis* y 2 de *B. megaterium*, fueron aisladas de pollo fresco en un trabajo anterior (12). Se ubicaron taxonómicamente mediante claves de identificación (13, 14) y se conservaron por el método de adsorción en sílica gel anhidra (15).

Cosecha de esporos

La cosecha de esporos se realizó según la metodología ya descrita en una publicación previa (16). Luego, la suspensión fue calentada 10 min a 80°C, a fin de destruir las células vegetativas que no se lisaron, lavando 3 veces con buffer fosfato 0.1 M pH 6.8 (17).

La concentración de esporos cosechada estuvo comprendida entre 10^8 - 10^{10} ufc.ml⁻¹.

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

Tratamiento térmico

Se utilizó el método de los capilares calibrados según Stumbo (18). Se usaron capilares de 100 ul (Sigma) y un baño de glicerina termostatzado a 100°C, 106°C y 112°C. La temperatura se controló con un termómetro calibrado respecto de un termómetro estandarizado (Estandar Nacional del

Physikalisch-Technische Bundesanstalt - PTB - de Alemania).

A intervalos de tiempo predeterminados los capilares se sacaron del baño e inmediatamente fueron enfriados en un baño de hielo.

Los esporos sobrevivientes se determinaron por el método de recuento en placa por vertido, efectuándose previamente diluciones decimales en agua de peptona 0,1%. El medio de cultivo usado fue AST + 0,1% de almidón. Se incubó a 30°C durante 24-48 h.

Para cada microorganismo y cada temperatura se realizaron 2 ensayos controlando cada tiempo por triplicado (n=6).

Valor D y valor z

El valor D se calculó matemáticamente como la recíproca de la pendiente de la línea de regresión de las curvas de supervivencia (log ufc.ml⁻¹ vs tiempo).

El valor z se calculó matemáticamente como la recíproca de la pendiente de la curva de muerte térmica (log D vs temp. a la cual fueron obtenidos).

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos y la aproximación a la linealidad de las curvas obtenidas se efectuaron mediante el programa SPSS versión 6.0 para Windows.

El análisis estadístico para hallar el valor D consistió en tres etapas.

En la primera, se construyó un intervalo del 95% de confianza para la media en cada tiempo, con el estadístico "t. Student" como técnica de rechazo de datos.

En la segunda etapa se realizó para cada ensayo la prueba no paramétrica de bondad de ajuste a la normal de Kolmogorov-Smirnov para la variable log ufc.ml⁻¹.

Finalmente, se utilizó el modelo de regresión lineal para obtener la pendiente (b) y su error estándar (SE)_b. Con estos datos se construyeron los intervalos de la forma $D \pm (SE)_D$, donde $D = 1/b$ (19).

Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra los parámetros de resistencia térmica: el valor D a 100°C, 106°C, 112°C y el valor z, en las cepas estudiadas.

En dichas cepas se observa un amplio rango en los valores de reducción decimal ($D_{100^{\circ}\text{C}}$ varía entre 0,63 min y 482,63 min). La mayoría presenta un valor bajo o medio de $D_{100^{\circ}\text{C}}$, lo que concuerda con lo informado por algunos autores; a saber: Ingram (20) halló para *B. cereus* un valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ de 5 min, para *B. subtilis* 11 min, para *B. megaterium* 1 min y para *B. licheniformis* 13 min. Rajkowsky y col. (21) informaron valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ entre 0,9 y 6,9 min para diferentes cepas de *B. cereus*. Mazas y col. (22) informaron $D_{100^{\circ}\text{C}} = 4,79$ min. para *B. cereus*.

Sin embargo, 2 de las cepas estudiadas, *B. cereus* L31 y *B. subtilis* L13, dieron valores de $D_{100^{\circ}\text{C}}$ de 482,63 min y 109,91 min, respectivamente. El hallazgo de una cepa de *B. cereus* con valor D elevado es similar a los resultados obtenidos por otros autores, que si bien no trabajaron a la misma temperatura, comprobaron valores que son lo suficientemente elevados como para que resulten comparables a los obtenidos en este estudio: Burgos y col. (23) hallaron $D_{110^{\circ}\text{C}} = 11,5$ min para *B. cereus* y Bradshaw y col. (6) obtuvieron valores de $D_{95^{\circ}\text{C}}$ entre 256,7 y 5122,3 min para *B. cereus*.

No se halló en la bibliografía consultada valores D altos para *B. subtilis* (24). Sin embargo, es

importante destacar la mayor termorresistencia en esta especie, dado que es reconocida como un agente deteriorante de alimentos.

Los valores z obtenidos en 5 de las cepas estudiadas oscilaron entre $z = 7,71^{\circ}\text{C}$ y $z = 35,71^{\circ}\text{C}$, en el rango de las temperaturas ensayadas.

Estos valores no son comparables a los obtenidos por otros investigadores, ya que el valor z es diferente en diferentes rangos de temperatura (20). Por lo tanto, no se puede extrapolar la curva de muerte térmica obtenida en el rango de temperatura de este trabajo, que considera temperaturas de cocción de alimentos, al rango de temperaturas utilizadas para el cálculo de procesos térmicos en la industria.

Las diferentes especies de *Bacillus* muestran distintos valores z para un mismo rango de temperatura; pero este parámetro varía entre márgenes más estrechos que el valor D. Por otro lado, se observa que altos valores de D no están necesariamente asociados con un alto valor de z.

Estas observaciones también fueron halladas por otros autores, luego de estudiar la termorresistencia de endosporos pertenecientes a diferentes especies de *Bacillus*, tanto mesófilos como termófilos, aislados de otros alimentos (25).

Tabla 1. Parámetros de resistencia térmica

Cepa	D^{a} (min) \pm SE			Z^{b} ($^{\circ}\text{C}$)
	100 $^{\circ}\text{C}$	106 $^{\circ}\text{C}$	112 $^{\circ}\text{C}$	
<i>B. cereus</i> L31	482.63 \pm 63.03	49.02 \pm 6.54	13.23 \pm 1.89	7,71
<i>B. cereus</i> L22	8.93 \pm 1.12	7.09 \pm 0.20	4.16 \pm 0.54	35,71
<i>B. cereus</i> D	9.43 \pm 0.53	6.21 \pm 0.50	1.71 \pm 0.11	16.13
<i>B. subtilis</i> L13	109.91 \pm 12.08	40.85 \pm 5.01	14.47 \pm 0.84	13.62
<i>B. subtilis</i> L12	5.46 \pm 0.45	3.24 \pm 0.22	1.92 \pm 0.20	26,32
<i>B. licheniformis</i> F37	1.52 \pm 0.10	0.42 \pm 0.04	ND	—
<i>B. licheniformis</i> L2	4.66 \pm 0.36	2.05 \pm 0.13	0.31 \pm 0.03	10.28
<i>B. megaterium</i> L5	31.25 \pm 2.39	16.50 \pm 3.54	12.99 \pm 0.84	31.54
<i>B. megaterium</i> L32	7.20 \pm 0.60	5.86 \pm 0.92	0.30 \pm 0.09	8.70

^a Valor D: representa el tiempo de reducción decimal calculado a partir de las curvas de supervivencia.

SE: Desviación standar del parámetro D. ND: No detectable

^b Valor z: representa la temperatura necesaria para disminuir en 1 ciclo logarítmico (10 veces) el valor D, en las curvas de muerte térmica.

Conclusiones

Las especies de *Bacillus* estudiadas, si bien crecen en el rango de temperaturas correspondientes a microorganismos mesófilos, presentan endosporos que pueden llegar a tener, en forma aleatoria, una notable termoresistencia.

Como no es posible definir un comportamiento homogéneo en estos valores, sólo se puede afirmar que la resistencia térmica varía no solamente con las especies, sino también entre diferentes cepas de la misma especie.

La presencia de esporos altamente resistentes al calor es un hecho importante a tener en cuenta a la hora de aplicar tratamientos térmicos como método de conservación de los alimentos, considerando además que los lípidos, proteínas e hidratos de carbono presentes en ellos suman una acción protectora.

La incidencia en los alimentos crudos, entre ellos el pollo fresco, de bacterias esporuladas con estas características, constituye un riesgo debido a la posibilidad de que éstas sobrevivan en el producto terminado, germinen y posteriormente desarrollen durante el almacenamiento, originando el deterioro del alimento.

Teniendo en cuenta que *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* son reconocidos como agentes alteradores y/o causantes de ETA, la presencia de ellos en los alimentos constituye un problema, no sólo desde la perspectiva tecnológica relacionada con el deterioro del alimento, sino también porque implica un peligro potencial para la salud del consumidor.

Por ello, es necesario destacar la importancia de procesar alimentos con baja carga de endosporos bacterianos, a fin de disminuir la posibilidad de la presencia de algunos inusualmente resistentes al calor que puedan sobrevivir a los métodos de conservación por altas temperaturas.

Agradecimiento

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- Jay J. M., 1994. "Microbiología moderna de los alimentos". 3^{ra} Edición. Editorial Acribia. 590-593.
- 2- Marquis R. E., Sim J., Shin S. Y., 1994. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. J. Appl. Bacteriology. Symposium Supplement, **76**, 40-48.
- 3- Mallidis C. G., Scholefield J., 1987. Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition and structure. I. Relation to core components. J. of Applied Bacteriology, **62**, 65-69.
- 4- Mallidis C. G., Scholefield J., 1987. Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition and structure. II. Relation to cortex and structure. J. of Applied Bacteriology, **63**, 207-215.
- 5- ICMSF, 1990. "Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos". Editorial Acribia, 19-25.
- 6- Bradshaw J.G., Peeler J.T., Twedt R.M., 1975. Heat resistance of Ileal Loop Reactive *B. cereus* strains isolated from commercially canned food. Applied Microbiology, **30**, 6: 943-945.
- 7- Franklin J.G., 1970. Spores in milk: problems associated with UHT processing. J. Appl. Bacteriol, **33**, 180-191.
- 8- Mostert J.F., Luck H., Husmann R.A., 1979. Isolation, identification and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. South African Journal of Dairy Technology, **11**, 3: 125-131.
- 9- Petterson B., Lembke F., Hammer P., Stackbrandt E., Priest F., 1996. *Bacillus sporothermodurans*, a new specie producing Highly Heat Resistant endospores. Int. J. Syst. Bacteriol, **46**, 3: 759-764.
- 10- Pinhatti M. E. M. C., Variane S., Eguchi S. Y., Manfio G. P., 1997. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. Fruit Processing **7**, 9: 350-353.
- 11- Hammer P., Lembke F., Suhren G., Heeschen W., 1995. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT milk - a preliminary report. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber, **47**, 303-311.
- 12- Iacona V., Simonetta A. C., Renzulli P. M., 1995. Bacterias del Género *Bacillus* en canales y hamburguesas de pollo. Rev. Argentina de Microbiología, **27**, 21-27.
- 13- R. Gordon, 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), **1**, 71-88.
- 14- Deak T., Timar E., 1998. Simplified identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. Intern. Journal of Food Microbiology **6**, 115-125.
- 15- Trollope D. R., 1975. The preservation of bacteria and fungi on anhydrous silicagel; assesment of survival over four

- years. *J. Appl. Bacteriol.* **38**, 115-120.
- 16- Di Conza J., Vaccari M.C., Moragues L., Iacona V. 1998. Inhibición de bacterias esporuladas aerobias por frío y sorbato de potasio. *Rev. FABICIB*, **2**, 9-13.
- 17- Shehata T. E., Collins E. B., 1972. Sporulation and heat resistance of psychrophilic strain of *Bacillus*. *J. Dairy Sci*, **55**, 1405-1409.
- 18- C. R. Stumbo, 1973. Thermal resistance of bacteria. In: C.R. Stumbo (ed), "Thermobacteriology in food processing 2nd". Ed. Academic Press Inc. (New York), 93- 120.
- 19- R. E. Walpole, R.H. Myers, 1992. "Probabilidad y estadística". 4ª ed.(3ª ed. en español) Ed. Mac Ground Graw-Hill
- 20- M. Ingram, 1969.- Sporeformers as food spoilage organisms. In: G.W.Gould and A. Hurst (ed), "The bacterial spore". Academic Press Inc. (New York), 549-610.
- 21- Rajkowsky K., Mikolajcik E.M., 1987. Characteristic of selected strains of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, **50**, 3: 199-205.
- 22 - Mazas M., Lopez M., Gonzalez I., Bernardo A., Martin R., 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Appl. Microbiology*, **25**, 331-334.
- 23- Burgos J., Ordoñez J.A., Sala F., 1972. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *B. licheniformis* spores. *Appl. Microbiology*, **24**, 497-498.
- 24- Holdsworth, S.D., 1997, "Thermal processing of packaged" foods. Ed. Blackie Academic Professional, London, 254-259.
- 25- Roberts T.A., Hitchins A.D., 1969. Resistance of spores In: G.W. Gould and A. Hurst (ed), "The bacterial spore". Academic Press Inc. New York, 611-670.