



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Caracterización termobacteriológica de *Bacillus cereus*.

Thermobacteriological characterization of *Bacillus cereus*.

Autor/es

Raúl Alonso Aldana

Director/es

Dr. Santiago Condón Usón

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

Páginas

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Antecedentes.	3
2.2. Cinética de termodestrucción.	3
2.3. Factores que afectan a la termorresistencia.	5
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES	9
4.1. Equipos.	9
4.2. Productos químicos y medios de cultivo.	10
4.3. Microorganismos.	10
5. MÉTODOS	11
5.1. Preparación de las suspensiones de esporos.	11
5.2. Tratamientos térmicos.	12
5.3. Incubación y recuento de supervivientes.	13
5.4. Parámetros de termorresistencia.	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1. Elección del medio de esporulación.	14
6.2. Termorresistencia de <i>B. cereus</i> en condiciones isotérmicas.	16
6.2.1. Influencia de la temperatura de esporulación.	21
6.2.2. Influencia del pH del medio de tratamiento.	26
6.2.3. Influencia combinada de la temperatura y el pH.	30
6.3. Termorresistencia de <i>B. cereus</i> en condiciones anisotérmicas.	32
7. CONCLUSIONES	36
8. VALORACIÓN PERSONAL	38
9. BIBLIOGRAFÍA	

1. RESUMEN

Las recientes tendencias de consumo han inducido cambios importantes en los parámetros del procesado térmico industrial. Estos cambios han sido el origen de nuevos retos. Uno de ellos es la presencia en alimentos pasteurizados de *B. cereus*. Esta especie escasamente estudiada en el pasado por su moderada termorresistencia.

Este trabajo se ha planteado para completar el conocimiento acerca del comportamiento de esta especie frente al calor. En concreto, se pretende cuantificar el efecto de la temperatura de esporulación y del pH del medio de tratamiento en su termorresistencia, así como sus posibles interacciones. Finalmente, pretendemos averiguar si los datos de termorresistencia obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas permiten predecir con certeza el comportamiento de esta especie en las condiciones anisotérmicas usuales en las empresas agroalimentarias.

La máxima termorresistencia de *B. cereus* se alcanzaba cuando la esporulación se producía a 35 °C, disminuyendo tanto por encima como por debajo de este valor. Además la termorresistencia era mayor en medios neutros que en ácidos. Existe una interacción entre los efectos de la temperatura de esporulación y el pH del medio de tratamiento, de manera que el efecto de la temperatura de esporulación era mayor cuando se comparaba la termorresistencia en medios neutros. Por otra parte, cabe destacar que los esporos de *B. cereus* mostraban en los tratamientos anisotérmicos una termorresistencia mayor que la deducida de los tratamientos isotérmicos, siendo la discrepancia tanto mayor cuanto más alta era la temperatura de régimen del tratamiento.

1. ABSTRACT

Recent changes in consumer trends have induced important changes in industrial thermal processing parameters. These changes have been the source of new challenges. One of them is the presence of *B. cereus* in pasteurized foods. This species has been scarcely studied in the past due to its moderate heat resistance.

This research was initiated to address this gap in knowledge. In particular, it aims to quantify the effect of sporulation temperature and treatment media's pH in its heat resistance as well as their possible interactions. Finally, we aim to investigate if the heat resistance data obtained in isothermal conditions allows predicting the behavior of this species in nonisothermal heating processes such as they are applied in food industries.

The maximum heat resistance of *B. cereus* was reached when the sporulation occurs at 35°C, decreasing both above and below this value. Furthermore the heat resistance was higher in neutral than in acid media. There was an interaction between the effects of the sporulation temperature and treatment media's pH, so that the effect of the sporulation temperature was higher when the heat resistance was compared in neutral media. On the other hand, it is noteworthy that the spores of *B. cereus* showed in nonisothermal treatments higher heat resistance than predicted from data obtained in isothermal conditions, being the discrepancy bigger the higher the operating temperature was.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. ANTECEDENTES.

En los últimos años se están empezando a aplicar tratamientos no térmicos para la conservación de gran variedad de productos. Ejemplo de ello es el empleo de las altas presiones hidrostáticas para la inactivación de *Listeria monocytogenes* en alimentos loncheados o el uso de radiaciones ionizantes para la descontaminación de especias. No obstante, estas nuevas tecnologías presentan algunas limitaciones por lo que su uso en la industria alimentaria todavía está muy restringido a situaciones especiales; en definitiva, el calor sigue siendo la tecnología más utilizada para la conservación de los alimentos y previsiblemente lo seguirá siendo durante los próximos años.

Louis Pasteur y posteriormente Nicolas Appert, demostraron la eficacia del calor para la conservación de alimentos y la influencia de los microorganismos en su alteración, estableciendo las bases de la por aquel entonces nueva tecnología de conservación. El proceso de pasteurización se aplicó primero en Francia con el fin de conservar vinos y cervezas; posteriormente se consolidó en Estados Unidos al instaurarse la obligatoriedad del proceso para la higienización de la leche. Estos tratamientos, de escasa intensidad, solo garantizaban la inactivación de células vegetativas por lo que los productos pasteurizados de origen animal debían conservarse en refrigeración y su vida útil era corta. Nicolas Appert diseñó un proceso térmico a temperaturas de ebullición, capaz de inactivar esporos, lo que permitía obtener productos de mucha más estabilidad, incluso almacenados a temperatura ambiente. Este proceso fue el origen de la industria conservera cuyos tratamientos están encaminados a la inactivación de esporos bacterianos, tanto patógenos como alterantes, lo que garantiza la obtención de un producto estable y sanitariamente seguro.

2.2. CINÉTICA DE TERMODESTRUCCIÓN.

La importancia económica y social de las industrias conserveras aumentó, tras su nacimiento, rápidamente lo que indujo a los empresarios a asociarse (Asociación Nacional de Conserveros, NCA) y montar un centro de investigación que les permitiese ajustar los tratamientos térmicos siguiendo criterios científicos. Estas primeras investigaciones son consideradas por muchos como el origen de la actual Tecnología de

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

los Alimentos. El primer trabajo acometido en los laboratorios de la NCA fue el estudio de la cinética de inactivación microbiana por el calor.

A partir de estos primeros estudios y desde entonces se ha asumido que cuando a los esporos bacterianos se les somete a la acción del calor, a temperatura constante, la tasa de supervivientes sigue una relación exponencial con el tiempo de calentamiento. Debido a este comportamiento, si se representa el logaritmo de la población microbiana superviviente frente al tiempo de tratamiento se obtiene una línea recta denominada línea de supervivencia térmica. De esta gráfica se puede obtener fácilmente el valor D, o tiempo de reducción decimal, a partir de la inversa negativa de la pendiente. Este valor D es usado como referencia para el cálculo de tratamientos térmicos capaces de garantizar, con un riesgo predeterminado, la seguridad de gran cantidad de alimentos. Por ejemplo, la cocción botulínica está diseñada para la eliminación de 12 ciclos logarítmicos de *Clostridium botulinum*.

Al aumentar la temperatura de tratamiento la velocidad de inactivación también aumenta de manera exponencial. De manera semejante a la descrita, representando los logaritmos del valor D frente a la temperatura obtenemos de nuevo una línea recta, que llamamos línea de termodestrucción. El parámetro que describe esta relación se denomina valor z que, matemáticamente, es la inversa negativa de su pendiente.

Para determinar estos dos valores podemos usar dos métodos distintos. Uno de ellos se basa en realizar un recuento inicial de la suspensión de esporos y uno final trascurrido un tiempo prefijado a una temperatura constante; es el que denominamos método del punto final. El segundo método consiste en realizar varios recuentos a diferentes tiempos de tratamiento a temperatura constante; es el denominado método de las gráficas de supervivencia. El método de las gráficas de supervivencia es más exacto que el del punto final al permitirnos interpretar la línea de supervivencia en el caso de que no siga un curso estrictamente exponencial.

Al usar el segundo método de trabajo es usual la aparición de desviaciones de la linealidad de las gráficas de supervivencia. Los dos fenómenos más destacados son los hombros y las colas. Los hombros suelen achacarse a que en la célula bacteriana hay más de una “estructura crítica” que es necesario destruir para poder inactivar la bacteria. Otras hipótesis lo achacan a fenómenos de inactivación/activación de los esporos o a fenómenos de agregación y desagregación. Las colas en las curvas de supervivencia se

suelen atribuir a diferencias de resistencia entre las células de una población o a la adaptación de las células al estrés térmico impuesto durante la exposición (Klotz et al., 2007).

2.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA TERMORRESISTENCIA.

Como ya se ha mencionado anteriormente la termorresistencia de las bacterias esporuladas es muy variable. Esta variabilidad puede ser debida a factores intrínsecos o extrínsecos. Los principales factores intrínsecos son la especie e incluso la cepa analizada, debido a que a veces se aprecia gran variabilidad en la termorresistencia de esporos genéticamente muy similares. Ejemplo de ello son las grandes diferencias entre la termorresistencia de *Bacillus cereus* y *Bacillus stearothermophilus*. También se han encontrado notables diferencias entre el valor D de distintas cepas de una especie, por ejemplo de *B. cereus* (Sarrias et al., 2002).

Por otro lado, la termorresistencia también está influenciada por factores extrínsecos; estos factores pueden clasificarse en previos, simultáneos y posteriores al tratamiento térmico (Murrell, 1964).

Los factores previos al tratamiento térmico incluyen, principalmente, a las condiciones de esporulación. De entre ellas, las que ejercen un mayor efecto parecen ser la composición y el pH del medio de esporulación, así como la temperatura a la que se produce. Entre estos factores, el más estudiado es la temperatura de esporulación. En general parece que la termorresistencia aumenta linealmente con esta temperatura (Leguérinel et al., 2007). No obstante, otros autores sugieren que hay una temperatura a la que la termorresistencia alcanzada es máxima y el resto de temperaturas, tanto mayores como menores, inducen una termorresistencia inferior (Baril et al., 2012).

Por otro lado, los factores simultáneos al tratamiento se refieren al medio en el que se aplica el tratamiento térmico, siendo la composición y el pH las características más importantes, al menos desde un punto de vista práctico. La composición del medio de tratamiento puede influenciar la resistencia al calor de los microorganismos debido a los ácidos orgánicos presentes (Palop et al., 1999a). Algunos autores han encontrado diferencias en termorresistencia al tratar en tampones neutros y en leche desnatada, de pHs muy próximos (Pagan et al., 1998). Uno de los factores más estudiados del medio

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

de tratamiento es el pH. Estos estudios permiten concluir que generalmente a pH próximo a la neutralidad los valores D son más elevados, disminuyendo a medida que se acidifica el medio (Condón et al., 1992). Algunos autores han observado que las diferencias de termorresistencia son menores cuando la temperatura de tratamiento aumenta (Casadei et al, 2001).

En último lugar se encuentran los factores que ejercen su acción después del tratamiento térmico. Estos factores no afectan directamente a su termorresistencia pero, como la determinación de esta termorresistencia se realiza mediante recuento de los microorganismos supervivientes, cualquier factor que influya en la reparación de las estructuras dañadas podría en principio modificar los valores D obtenidos (López et al., 1994).

Al igual que en los factores previos y en los simultáneos al tratamiento, la composición del medio y el pH son los factores más determinantes. Se han realizado varios estudios que comparan la termorresistencia estimada dependiendo del medio de recuperación. Algunos trabajos que comparan medios de recuperación de laboratorio tales como TSA (Tryptona Soja Agar), DTA (Dextrosa Tryptona Agar) y AN (Agar Nutritivo) entre otros, no encontraron diferencias significativas en los valores D estimados (López et al., 1997). Otros estudios comprueban la influencia del lote de fabricación de un único medio de recuperación, y observan distintas tasas de supervivencia pero sin afectar al valor D estimado (González et al., 1992).

En relación al pH, los medios de recuperación que tienen un pH cercano a la neutralidad tienen mayor tasa de supervivientes, sin embargo según algunos autores el valor D no se ve afectado significativamente (González et al., 1996). Otros estudios, por el contrario, parecen indicar un descenso del valor D con la acidificación del medio de recuperación (Leguerinel et al., 2000). La adición de determinados compuestos al medio de recuperación también puede influir positiva o negativamente en la termorresistencia estimada, por ejemplo la adición de extracto de levadura suele provocar un aumento en los valores D estimados (Odlaug et al., 1977).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Según se desprende de la revisión anterior la termorresistencia de los esporos puede cambiar con la temperatura de esporulación y con el pH del medio de tratamiento. Existen numerosos trabajos estudiando el efecto de ambos factores independientemente pero casi no existen trabajos que investiguen las posibles interacciones entre ambos factores. Además los dos únicos trabajos que hemos encontrado al respecto se han realizado con *B. subtilis* y *B. coagulans* (Palop et al., 1998), ambas especies no patógenas.

Otro aspecto interesante escasamente investigado es si los datos de termorresistencia obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas permiten predecir el comportamiento en fábrica, normalmente en condiciones anisotérmicas. La mayoría de los escasos datos publicados se han obtenido con células vegetativas. El único trabajo que hemos encontrado al respecto con esporos bacterianos se realizó con *B. sporothermodurans* (Esteban et al., 2013), una especie no patógena.

B. cereus es una bacteria ubiquitaria, de metabolismo aeróbico facultativo y capaz de formar esporas. Estos microorganismos son de origen telúrico y pueden hallarse en gran variedad de alimentos. Estas bacterias son en general mesófilas pero existen cepas psicrótrofas, las cuales son capaces de crecer a 4°C, por ello causan problemas en alimentos refrigerados.

Este patógeno emergente, dependiendo de la cepa, es capaz de provocar dos tipos de enfermedades transmitidas por alimentos, una es la intoxicación emética provocada por la ingestión de toxinas formadas previamente en el alimento y la otra es la toxiinfección diarreica por la ingesta de bacterias, en estado vegetativo o esporulado, que producen enterotoxinas en el intestino delgado.

La termorresistencia de *B. cereus* es relativamente baja por lo que en el pasado se estudió muy poco si se compara con otras especies esporuladas. Actualmente se tiende a aplicar tratamientos térmicos suaves, que afecten poco a la calidad de los alimentos, recurriendo a un almacenamiento en refrigeración posterior para prolongar su vida útil. Este tipo de tratamientos, que en el pasado se consideraban de pasteurización, se aplican mucho actualmente a alimentos listos para su consumo, pero se diferencian de los tratamientos del pasado en que son de más intensidad y pretenden conseguir una

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

vida útil relativamente larga. Es en este tipo de productos en los que *B. cereus*, por su psicrofilia y patogenicidad, resulta especialmente importante.

El presente trabajo tiene el objetivo de ampliar el conocimiento acerca de la influencia de diversos factores ambientales en la resistencia al calor de *Bacillus cereus*. En concreto, pretendemos averiguar si existen interacciones entre la temperatura de cultivo y el pH del medio de tratamiento, y saber si los datos obtenidos en condiciones isotérmicas permitirán prever el comportamiento de los esporos de esta especie en tratamientos anisotérmicos, los más usuales en la industria alimentaria.

4. MATERIALES.

4.1. EQUIPOS.

El agua destilada utilizada para la elaboración de los medios de cultivo y demás aplicaciones fue obtenida con un destilador Milli-RX 20 (Millipore; Billerica, MA, Estados Unidos). Las pesadas para la correcta preparación de los medios y reactivos se realizaron en una balanza de precisión (Sartorius TE3102S; Madrid, España). Una vez obtenidos los medios de cultivo y tratamiento se esterilizaron, como es usual, a 121 °C durante 20 minutos en un autoclave (Darlab K400; Barcelona, España).

El pH de los medios de tratamiento se midió con un pHmetro con compensación automática de temperatura (Selecta, pHmeter Basic 20+; Barcelona, España)

En el momento de su utilización, los medios de cultivo, una vez fundidos, se mantuvieron en baños termostáticos (Selecta, Precistern; Barcelona, España) a 50° hasta su uso. Cuando fue preciso trabajar en condiciones de esterilidad se utilizó una cámara de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR; Barcelona, España). Los cultivos se realizaron en estufas de aire forzado (Selecta J.P; Barcelona, España)

Para la obtención de las suspensiones de esporos se utilizó la técnica de centrifugación (Heraeus Megafuge 1.0R; Madrid, España). Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse E400; Barcelona, España) y los recuentos microscópicos con ayuda de una cámara de Thoma.

Para las determinaciones de termorresistencia se usó un manotermosonicador diseñado por nuestro grupo de investigación (Raso et al., 1997), dotado de un sistema automático de termostatación y calentamiento por rampas (Mastia; Cartagena, España).

El recuento de supervivientes se realizó con un contador automático por análisis de imagen, diseñado por nuestro grupo de investigación y fabricado por los servicios de la Universidad de Zaragoza.

4.2. PRODUCTOS QUÍMICOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Los productos químicos utilizados para la realización de este trabajo fueron, todos ellos, de calidad reactivo. El sulfato de manganeso, el fosfato de sodio y el ácido cítrico fueron suministrados por PANREAC (Barcelona, España). El tampón McIlvain de distintos pHs se preparó siguiendo las indicaciones de Dawson et al., (1969).

El caldo triptona soja (TSB) (lote 1633765, composición (g/L): digerido pancreático de caseína 17.0, digerido enzimático de soja 3.0, cloruro sódico 5.0, fosfato di-potásico 2.5), el agar triptona soja (TSA) (lote 1687530, composición (g/L): digerido pancreático de caseína 15.0, digerido enzimático de soja 5.0, cloruro sódico 5.0, agar 15.0), y el extracto de levadura (lote 1301903-04, composición (g/L): nitrógeno total 10.0-12.5, nitrógeno amino 5.1, cloruro sódico 0.3) fueron suministrados por OXOID (Madrid, España). El agar nutritivo (AN) (lote OL2301, composición (g/L): extracto de ternera 3.0, peptona 5.0, agar 15.0) y la dextrosa (lote 9F1501) fueron proporcionadas por BIOLIFE (Milán, Italia).

4.3. MICROORGANISMOS.

Para este estudio se utilizó la cepa tipo de *Bacillus cereus* (STCC 148) que nos fue suministrada por la colección española de cultivos tipo (Valencia, España).

5. MÉTODOS.

5.1. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE ESPOROS.

La cepa objeto de estudio nos fue suministrada en forma de liófilo. Para su revitalización se sembró en TSB enriquecido con 6g/L de extracto de levadura (TSBYE) y se incubó a 31°C durante 24 horas. Posteriormente se sembró en estría en TSA suplementado con 6g/L de extracto de levadura (TSAYE). El cultivo definitivo se realizó sembrando de nuevo en TSBYE una colonia perfectamente aislada e incubando a 31 °C durante 24 horas.

Dado que los medios de esporulación pueden ejercer un notable efecto en el rendimiento obtenido, decidimos realizar un experimento con el fin de determinar el medio más adecuado para esta cepa de entre los habitualmente utilizados por los distintos autores. Para ello se sembraron en superficie 0,1 ml del cultivo en TSBYE en placas de Agar Nutritivo (AN), Agar Nutritivo suplementado con 500 ppm de dextrosa (AN+G), Agar Triptona Soja (TSA) y TSA suplementado con 500 ppm de dextrosa (TSA+G). Como estimulante y sincronizador de la esporulación, todos los medios se enriquecieron con 3 ppm de manganeso y 6 g/L de extracto de levadura. Una vez sembradas en superficie las placas se incubaron, la mitad a 31°C y la otra mitad a 39°C.

La evolución de la esporulación se cuantificó con una técnica consistente en tomar con un asa de siembra parte del crecimiento superficial de las placas y diluirlo en 10 ml de tampón McIlvaine de pH 7. Después de realizar las diluciones decimales que se consideraron convenientes en el mismo medio, se sembró en masa una alícuota de 1 ml; posteriormente se pasteurizó el tubo de dilución a 75 °C durante 5 minutos y se realizó una nueva siembra en masa siguiendo el procedimiento antes descrito. El medio usado en estos recuentos fue TSAYE y las placas se incubaron a 31 °C durante 24-48 horas. El porcentaje de esporulación en cada medio, para cada tiempo de incubación, se calculó comparando los recuentos obtenidos en ambas placas. La esporulación se siguió también mediante observación microscópica en una cámara de Thoma. Los resultados de estos experimentos se detallan en el apartado correspondiente de la sección de resultados y discusión. El medio finalmente usado para el resto de la investigación fue AN suplementado con manganeso, extracto de levadura y 500 ppm de dextrosa.

Para preparar la suspensión, los esporos se recogieron de las placas inundando la superficie con tampón McIlvaine de pH 7 estéril y arrastrando el crecimiento superficial

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

con ayuda de un asa de Drigalski. La presuspensión se recogió de las placas con una jeringuilla y se procedió a eliminar las impurezas por centrifugación. Los tubos se centrifugaron a 4000 revoluciones por minuto durante 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el sedimento en tampón McIlvaine de pH 7 estéril. Este proceso se repitió cuatro veces. Las suspensiones finalmente obtenidas se pasaron a frascos de vidrio en los que se introdujeron también perlas de vidrio estériles para facilitar su dispersión. Previamente a su almacenamiento en refrigeración, las suspensiones se pasteurizaron (75 °C, 5 minutos) para eliminar las células vegetativas que pudiesen quedar. Por último se determinó el número y % de esporos en las suspensiones, según hemos descrito en el párrafo anterior, y se almacenaron en refrigeración, a 4 °C, hasta su uso.

Una vez seleccionado el medio y puesto a punto el método de preparación de las suspensiones, para estudiar el efecto de la temperatura de esporulación en la termorresistencia de *B. cereus* las placas, una vez sembradas, se incubaron a: 31°C, 35°C o 39°C. La concentración de esporos en las suspensiones obtenidas oscilaron entre 10^8 - 10^9 esporos/ ml.

5.2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS.

Los experimentos se realizaron en un manotermosonicador (Raso et al., 1997), adaptado para aplicar únicamente tratamientos térmicos. La ventaja de este equipo sobre el termorresistómetro TR-SC tradicional es que dispone de una cámara de tratamiento de 25 ml, lo que nos permite elaborar curvas de supervivencia con más de cuatro ciclos logarítmicos de inactivación. Una vez esterilizado el tampón, en el propio manotermosonicador, y estabilizada la temperatura de tratamiento, se inoculaban 0,2 ml de una dilución adecuada de la suspensión de esporos en la cámara de tratamiento. A periodos predeterminados de tiempo, que oscilaron entre 20 segundos y 1 minuto dependiendo de las condiciones de tratamiento, se extraían muestras de entre 0,2 y 0,3 ml, se diluían en tampón de pH 7 y se sembraban en masa en el medio de recuperación. Los tratamientos se realizaron en un rango de temperaturas que osciló entre 95°C y 105°C. Cada experimento se realizó como mínimo por triplicado.

Los tratamientos anisotérmicos se realizaron en el mismo equipo regulando el ritmo de calentamiento con los circuitos electrónicos del manotermosonicador (Mastia;

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Cartagena, España). El ritmo de calentamiento utilizado en nuestros experimentos fue de 5°C por minuto. Los experimentos se iniciaron a una temperatura de 40°C y se finalizaron entre 110°C y 115°C en función de las condiciones de tratamiento. Los tiempos de extracción en estos experimentos oscilaron entre 20 segundos y 3 minutos.

5.3. INCUBACIÓN Y RECuento DE SUPERVIVIENTES.

Una vez obtenidas las muestras, y tras realizar las correspondientes diluciones decimales, las bacterias se recuperaron en placas de TSAYE, sembradas en masa, incubando a 31 °C durante al menos 24 h. Tiempos de incubación más prolongados no modificaban el perfil de las gráficas de supervivencia.

Los recuentos se realizaron con un contador automático de colonias por análisis de imagen, diseñado por el grupo de Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos y construido por los servicios centrales de la Universidad de Zaragoza. Aunque la técnica se diseñó para el recuento de placas densamente pobladas, dado que las colonias de *B. cereus* tenían un crecimiento muy expansivo, decidimos utilizar valores obtenidos con placas con menos de 1000 unidades formadoras de colonias (ufc).

5.4. PARÁMETROS DE TERMORRESISTENCIA.

Los valores D se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de las líneas de supervivencia. Las gráficas de supervivencia se construyeron representando el logaritmo del recuento de supervivientes, en ordenadas, frente al tiempo de tratamiento, en abscisas. Para calcular los valores z se construyeron las gráficas de termodestrucción representando el logaritmo de los valores D frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa PRISMA (GraphPad PRISM 5.0; San Diego, California) y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$). Todas las determinaciones de termorresistencia se realizaron, al menos, por triplicado. Las barras de error de las figuras se corresponden, con el intervalo de confianza al 95% de la media. Las regresiones múltiples se realizaron con el complemento Essential Regression del programa Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation; Washington, Estados Unidos).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. ELECCIÓN DEL MEDIO DE ESPORULACIÓN.

Dado que, como es bien sabido, el porcentaje de esporulación puede cambiar ampliamente con las condiciones de cultivo, y que las mejores condiciones pueden ser diferentes para las distintas especies, e incluso cepas, decidimos estudiar los ritmos de esporulación de la cepa objeto de estudio en los medios que con más frecuencia se utilizan en los laboratorios de termobacteriología. Se incluyeron también como variables la presencia/ausencia de glucosa en el medio, y la temperatura de esporulación. Los medios utilizados fueron Agar Nutritivo suplementado con 500 ppm de dextrosa (AN+G), Agar Nutritivo (AN), Agar Triptona Soja suplementado con 500 ppm de dextrosa (TSA+G) y Agar Triptona Soja (TSA). Todos los medios fueron suplementados con 3 ppm de manganeso y 6 g/L de extracto de levadura. Las temperaturas de incubación utilizadas fueron 31°C y 39°C.

La tabla 1 muestra los porcentajes de esporulación obtenidos en cada una de las condiciones exploradas. La Figura 1 se ha incluido para facilitar la comparación de los resultados.

Tabla 1. Porcentajes de esporulación obtenidos en distintos medios de esporulación a 31°C y 39°C, en los tiempos de 1 y 4 días.

Medio de Esporulación	Tiempo (días)	Tª de Esporulación (°C)	% de Esporulación
TSA	1	31	0,1
		39	0,2
	4	31	7
		39	2
TSA+G	1	31	0,4
		39	0,2
	4	31	50
		39	5
AN	1	31	0,5
		39	0,2
	4	31	15
		39	12
AN+G	1	31	16
		39	1
	4	31	99
		39	42

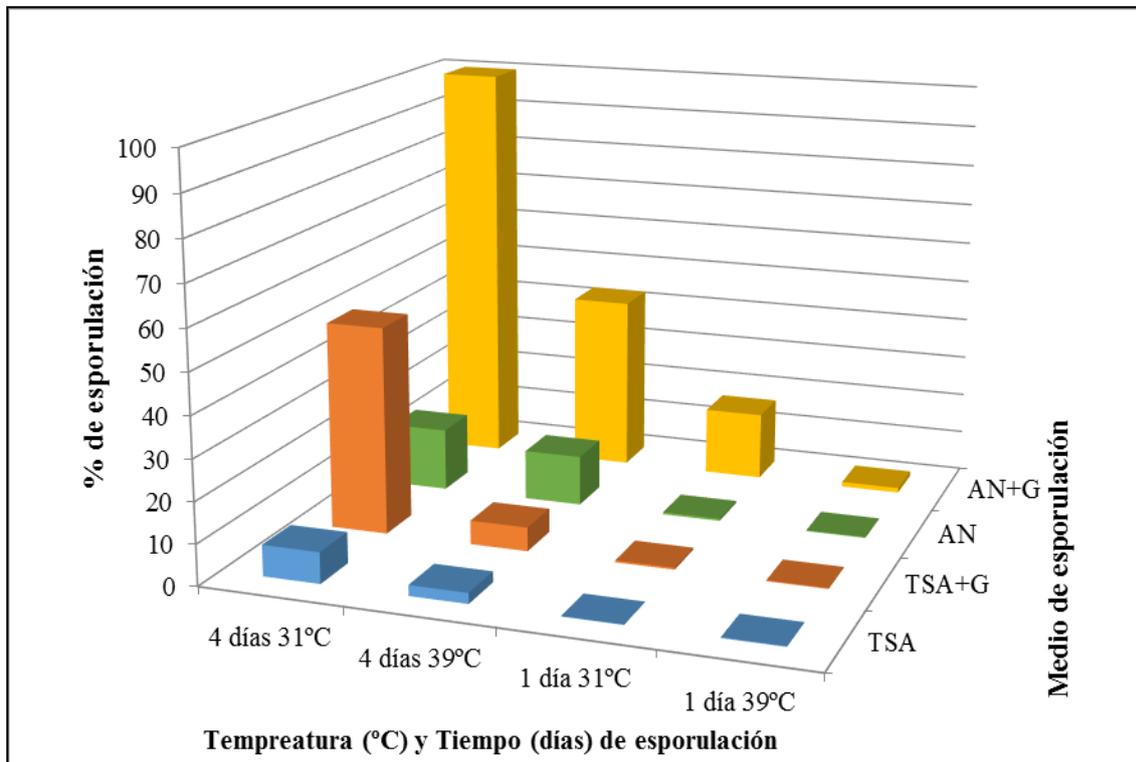


Figura 1. Efecto de las condiciones de cultivo en el porcentaje de esporulación de *B. cereus*.

Como se observa en la figura 1, en cualquier condición de esporulación el agar nutritivo resultó más favorable para la esporulación de *B. cereus* que el agar triptona soja; en todos los casos el porcentaje de esporulación en el primer medio duplico, al menos, el obtenido en el segundo. Por ejemplo, en el medio AN+G se obtuvo un porcentaje de esporulación próximo al 100% mientras que en el TSA+G resultó próximo al 50%. Podemos concluir, por tanto, que el AN+G es un medio de esporulación mejor que el TSA+G, al menos para esta cepa de *B. cereus*.

Por otra parte, el porcentaje de esporulación en ambos medios básicos mejoró sensiblemente al enriquecerlos con bacto-dextrosa. El % de esporulación en TSA cultivado 4 días a 31 °C paso del 7% al 50 % al añadir el azúcar, en tanto en AN paso del 15 al 99%. Los datos parecen indicar que esta cepa requiere una notable cantidad de energía para la esporulación. Aunque el efecto de la presencia de glucosa podría considerarse evidente, no lo es tanto; algunas especies, como *B. stearothermophilus*, generan a partir de la glucosa una gran cantidad de ácido que puede inhibir la propia esporulación. A juzgar por nuestros resultados este no es el caso cuando se trabaja con *B. cereus*.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Respecto al efecto de la temperatura de cultivo en el porcentaje de esporulación, nuestros resultados indican que los porcentajes son mayores a la temperatura más próxima a la óptima de crecimiento vegetativo. En el caso del AN con glucosa, el porcentaje de esporulación a 31°C fue del 99%, en tanto que a 39°C no alcanzó el 50%.

A partir de estos resultados optamos por realizar todas las esporulaciones de este trabajo en AN+G. Con objeto de tener un mayor margen de seguridad se estableció un tiempo de incubación de cinco días.

6.2. TERMORRESISTENCIA DE *B. cereus* EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los factores que afectan a la resistencia se clasifican en previos, simultáneos y posteriores al tratamiento térmico. En este estudio decidimos estudiar el efecto de aquellos que, por los datos existentes en la bibliografía, parecen tener una mayor relevancia: la temperatura de esporulación y el pH del medio de tratamiento. Las temperaturas de esporulación consideradas fueron 31°C, 35°C y 39°C y los pH del medio de tratamiento fueron 7, 6, 5 y 4. Los resultados obtenidos a las tres temperaturas de esporulación se detallan para cada pH del medio de tratamiento en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Tabla 2. Termorresistencia, en tampón McIlvaine de pH 7, de *B. cereus* esporulado a distintas temperaturas.

pH 7						
T ^a esporulación (°C)	T ^a Tratamiento (°C)	Dt (minutos)	Dt global (minutos)	IC 95%	Z (°C)	IC 95%
31	105	0,442	0,450	0,405 0,507	10,400	10,031 10,806
	105	0,450				
	105	0,457				
	102,5	0,780	0,769	0,728 0,814		
	102,5	0,758				
	102,5	0,769				
	100	1,348	1,358	1,269 1,460		
	100	1,404				
	100	1,328				
35	105	0,460	0,485	0,464 0,507	9,081	8,576 9,643
	105	0,494				
	105	0,503				
	102,5	0,880	0,884	0,851 0,920		
	102,5	0,899				
	102,5	0,875				
	100	1,757	1,726	1,650 1,809		
	100	1,772				
	100	1,647				
39	105	0,383	0,381	0,361 0,404	8,661	7,930 9,542
	105	0,403				
	105	0,360				
	102,5	0,817	0,775	0,737 0,818		
	102,5	0,803				
	102,5	0,691				
	100	1,387	1,440	1,399 1,485		
	100	1,452				
	100	1,488				

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Tabla 3. Termorresistencia, en tampón McIlvaine de pH 6, de *B. cereus*, esporulado a distintas temperaturas.

<h1>pH 6</h1>						
T ^a esporulación (°C)	T ^a Tratamiento (°C)	Dt (minutos)	Dt global (minutos)	IC 95%	Z (°C)	IC 95%
31	102,5	0,453	0,517	0,479	8,597	8,130 9,116
	102,5	0,488		0,561		
	102,5	0,484				
	100	0,991	0,972	0,915		
	100	0,986		1,038		
	100	0,941				
	97,5	1,871	1,811	1,730		
	97,5	1,775		1,900		
	97,5	1,790				
35	102,5	0,488	0,488	0,468	8,722	8,453 9,009
	102,5	0,495		0,509		
	102,5	0,477				
	100	0,924	0,930	0,901		
	100	0,931		0,962		
	100	0,938				
	97,5	1,894	1,822	1,763		
	97,5	1,778		1,884		
	97,5	1,795				
39	102,5	0,453	0,467	0,441	8,525	8,039 9,074
	102,5	0,482		0,498		
	102,5	0,468				
	100	0,839	0,857	0,814		
	100	0,861		0,904		
	100	0,871				
	97,5	1,817	1,804	1,738		
	97,5	1,814		1,875		
	97,5	1,782				

Tabla 4. Termorresistencia, en tampón McIlvaine de pH 5, de *B. cereus* esporulado a distintas temperaturas.

pH 5						
Tª esporulación (°C)	Tª Tratamiento (°C)	Dt (minutos)	Dt global (minutos)	IC 95%	Z (°C)	IC 95%
31	102,5	0,402	0,408	0,386 0,434	10,300	9,461 11,301
	102,5	0,425				
	102,5	0,399				
	100	0,707	0,694	0,655 0,737		
	100	0,747				
	100	0,637				
	97,5	1,282	1,251	1,191 1,318		
	97,5	1,215				
	97,5	1,251				
35	102,5	0,411	0,405	0,380 0,435	8,679	8,361 9,017
	102,5	0,394				
	102,5	0,412				
	100	0,789	0,772	0,746 0,799		
	100	0,764				
	100	0,764				
	97,5	1,547	1,528	1,452 1,612		
	97,5	1,565				
	97,5	1,474				
39	100	0,655	0,650	0,620 0,682	8,794	8,333 9,302
	100	0,650				
	100	0,645				
	97,5	1,286	1,275	1,222 1,333		
	97,5	1,316				
	97,5	1,248				
	95	2,263	2,404	2,287 2,534		
	95	2,422				
	95	2,544				

Tabla 5. Termorresistencia, en tampón McIlvaine de pH 4, de *B. cereus* esporulado a distintas temperaturas.

pH 4						
T^a esporulación (°C)	T^a Tratamiento (°C)	Dt (minutos)	Dt global (minutos)	IC 95%	Z (°C)	IC 95%
31	100	0,511	0,526	0,495	9,857	9,452 10,293
	100	0,522		0,561		
	100	0,546				
	97,5	0,952	0,935	0,908		
	97,5	0,926		0,962		
	97,5	0,927				
	95	1,667	1,692	1,623		
	95	1,661		1,766		
	95	1,749				
35	100	0,533	0,540	0,521	9,796	9,074 10,642
	100	0,549		0,561		
	100	0,546				
	97,5	0,905	0,899	0,866		
	97,5	0,879		0,937		
	97,5	0,902				
	95	1,736	1,758	1,722		
	95	1,764		1,795		
	95	1,773				
39	100	0,554	0,553	0,528	8,678	8,097 9,346
	100	0,527		0,580		
	100	0,580				
	97,5	1,107	1,132	1,093		
	97,5	1,173		1,174		
	97,5	1,175				
	95	2,057	2,085	2,028		
	95	2,078		2,145		
	95	2,120				

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

6.2.1. Influencia de la temperatura de esporulación.

Para el estudio de la temperatura de esporulación en la termorresistencia de esta cepa utilizamos el medio seleccionado, previamente descrito, y se utilizaron como temperaturas de incubación 31°C, 35°C y 39°C.

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo por triplicado a tres temperaturas distintas: 105°C, 102,5°C y 100°C. Los tratamientos de referencia se realizaron en tampón McIlvaine de pH 7. Las muestras se extrajeron a intervalos de tiempo que oscilaron entre 20 segundos y 1 minuto.

Con los recuentos obtenidos se representaron las líneas de supervivencia y se calculó el valor D. La figura 2 se incluye, a modo de ejemplo, para ilustrar la cinética de inactivación de esta especie. La figura, que incluye tres réplicas, permite también apreciar la repetitividad de nuestros resultados.

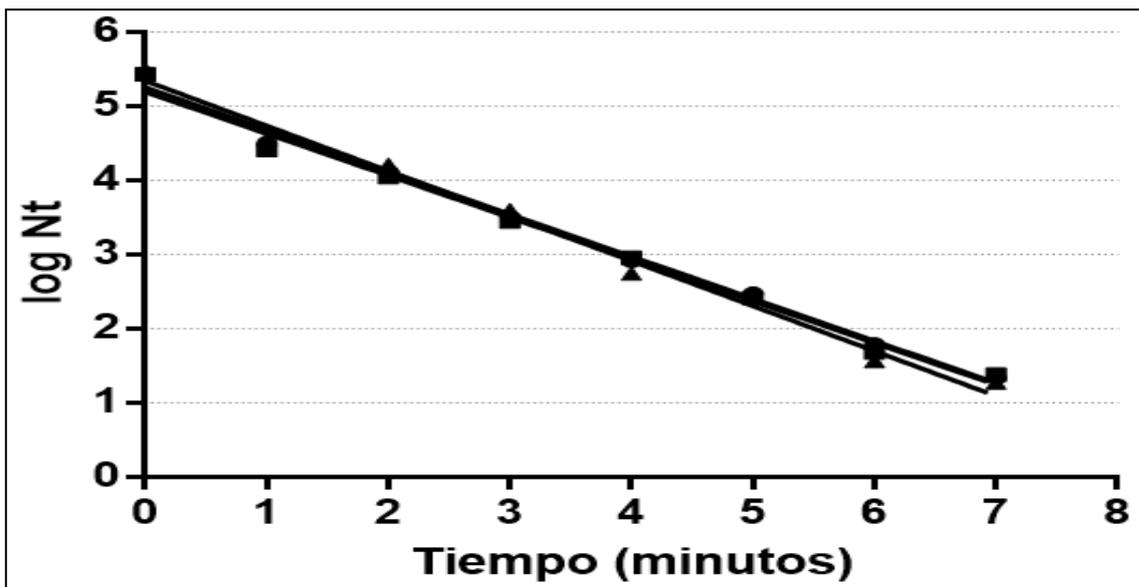


Figura 2. Líneas de supervivencia a 100 °C de *B. cereus* esporulado de 35°C y tratado en tampón fosfato citrato de pH 7. Réplicas: \blacktriangle A \blacksquare B \blacktriangleleft C.

Como se observa en la figura 2, *B. cereus* se inactivó siguiendo un curso estrictamente exponencial y no se observaron, en ningún caso, fenómenos de hombro ni de cola de una duración significativa. Esta circunstancia parece indicar que en esta especie no se producen fenómenos importantes de latencia que exijan una activación previa a la muerte por el calor. Tampoco parecen existir fracciones de la población con mayor termorresistencia, al menos de tamaño superior a 1 espora cada 10.000.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

La figura 3 muestra los valores D_{100} obtenidos con las suspensiones esporuladas a las tres temperaturas seleccionadas. Como se puede observar en la figura la termorresistencia de esta especie alcanza un máximo cuando esporula a temperaturas próximas a 35 °C, y disminuye tanto por encima como por debajo de este valor. Mientras que los valores D_{100} son significativamente mayores para los esporos obtenidos a 35 °C, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los obtenidos a 39°C y 31°C.

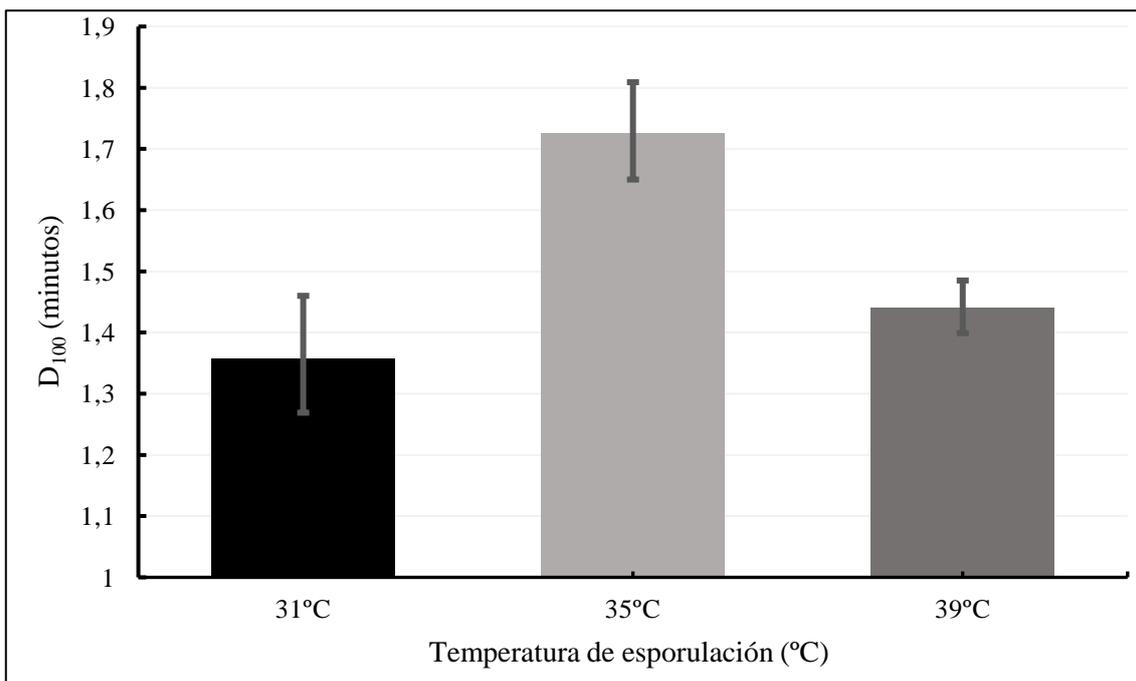


Figura 3. Valores D_{100} de *B. cereus* esporulado a 31°C, 35°C y 39°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza para el 95%.

Los datos en la bibliografía indican que hay dos interacciones distintas entre la temperatura de esporulación y la termorresistencia de los esporos. La primera de ellas establece que el aumento de la temperatura de esporulación conlleva un aumento de la termorresistencia, en ocasiones esta relación es aparentemente lineal y en ocasiones exponencial. La tabla 6 (Palop et al., 1998) sintetiza la magnitud de los efectos observados en distintas especies y cepas de microorganismos formadores de esporos.

Como se desprende de la tabla 6 la magnitud del aumento de la termorresistencia consecuencia del aumento de la temperatura de esporulación varía mucho en función de la especie, e incluso de la cepa, analizada.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Tabla 6. Influencia de la temperatura de esporulación en la termorresistencia de varios bacilos aeróbicos esporoformadores (Palop et al., 1998).

Microorganism	Sporulation temperature	Heating temperature	Fold increase in D value	References
<i>B. subtilis</i> 4673	20 - 50 C	100 C	10	Beaman & Gerhardt 1986
<i>B. cereus</i> IOLD	17 - 42 C	100 C	10	
<i>B. stearothermophilus</i> 7953	45 - 75 C	100 C	10	
<i>B. subtilis</i> STCC 4524	30 - 52 C	108 C	7.8	Condón et al. 1992
<i>B. coagulans</i> var <i>thermoacidurans</i>	30 - 45 C	93 C	5	El-Bisi & Ordal 1956
<i>B. coagulans</i> ATCC 8038	35 - 50 C	100 C	1.3	Fernández-Coll & Rodríguez-Toro 1986
<i>B. subtilis</i> NCTC 3610	20 - 55 C	90 C	4	Khoury et al. 1987
<i>B. stearothermophilus</i> NRRLB 4419	45 - 75 C	100 C	2.6	
<i>B. megaterium</i> ATCC 19213	20 - 45 C	75 C	2.9	
<i>B. subtilis</i>	30 - 45 C	98.5 C	10	Lechowich & Ordal 1962
<i>B. subtilis</i> A	23 - 49 C	100 C	5	Lindsay et al. 1990
<i>B. psychrosacharolyticus</i> ATCC 23296	5 - 20 C	85 C	2	Michels & Visser 1976
<i>B. licheniformis</i> STCC 4523	30 - 52 C	109 C	10	Raso et al. 1995
<i>B. stearothermophilus</i> 5531	37 - 50 C	110 C	3	Williams & Robertson
<i>B. stearothermophilus</i> 7254	37 - 50 C	110 C	2	1954
<i>B. stearothermophilus</i> 8267	37 - 50 C	110 C	1.5	
<i>B. stearothermophilus</i> 3848	37 - 50 C	110 C	4.5	
<i>B. stearothermophilus</i> 10253	37 - 50 C	110 C	1.4	
<i>B. stearothermophilus</i> 10877	55 - 60 C	120 C	1.3	
<i>B. stearothermophilus</i> 5540	55 - 60 C	120 C	1.1	

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

También se ha descrito en la bibliografía la existencia de una temperatura óptima de esporulación a la cual se alcanza un máximo de termorresistencia por encima y por debajo de la cual la termorresistencia disminuye. Nuestra cepa podría clasificarse a este respecto en este grupo, dado que alcanza su máxima termorresistencia a 35 °C. También otros autores han encontrado una relación de este tipo con otras cepas de *B. cereus* (Gonzalez et al., 1999).

En cualquier caso el efecto de la temperatura de esporulación en la termorresistencia de nuestra cepa es, aunque estadísticamente significativa, de pequeña cuantía si se compara con la de la mayoría de especies estudiadas (Tabla 6).

El efecto de la temperatura de esporulación en la termorresistencia podría verse influenciado por la temperatura de tratamiento por lo que procedimos a comparar los valores Dt obtenidos a las diferentes temperaturas de calentamiento. La figura 4 muestra las líneas de termodestrucción construidas con los tiempos de reducción decimal a tres temperaturas de tratamiento diferentes. A partir de la recta de regresión de estos tres valores pudimos calcular el valor z para cada una de las suspensiones estudiadas.

Los valores z obtenidos para las suspensiones obtenidas a 31°C, 35°C y 39°C, resultaron ser 10,4, 9,1 y 8,6 respectivamente (figura 5).

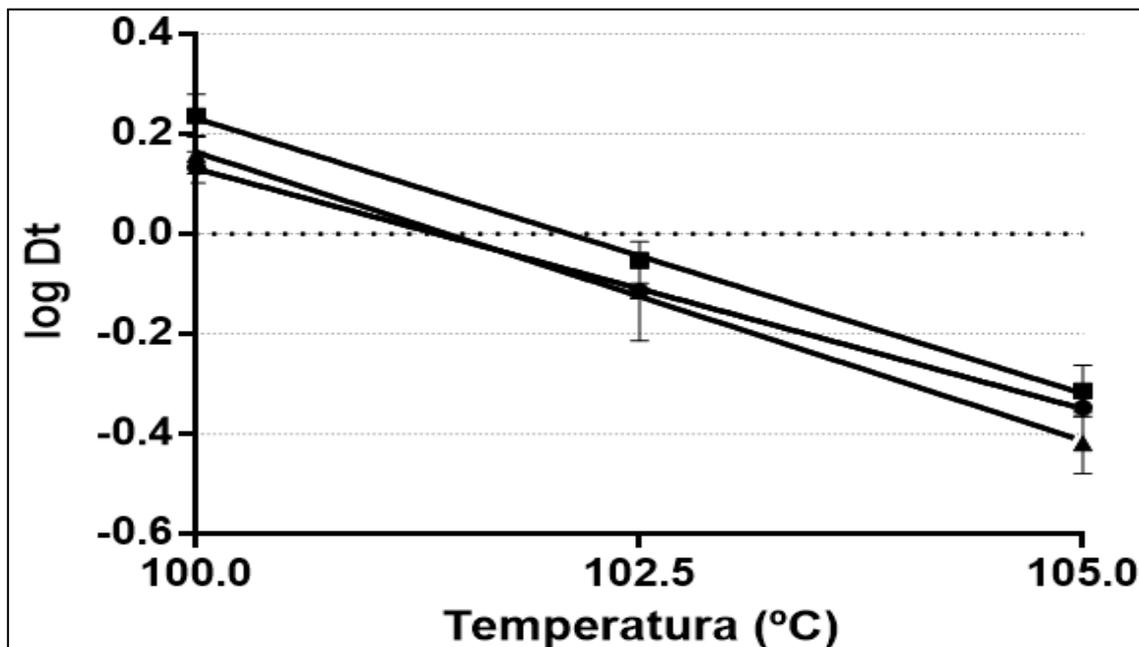


Figura 4. Líneas de termodestrucción de *B. cereus* en medio de pH 7. T^a de esporulación: ● 31°C ■ 35°C ▲ 39°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza para el 95%.

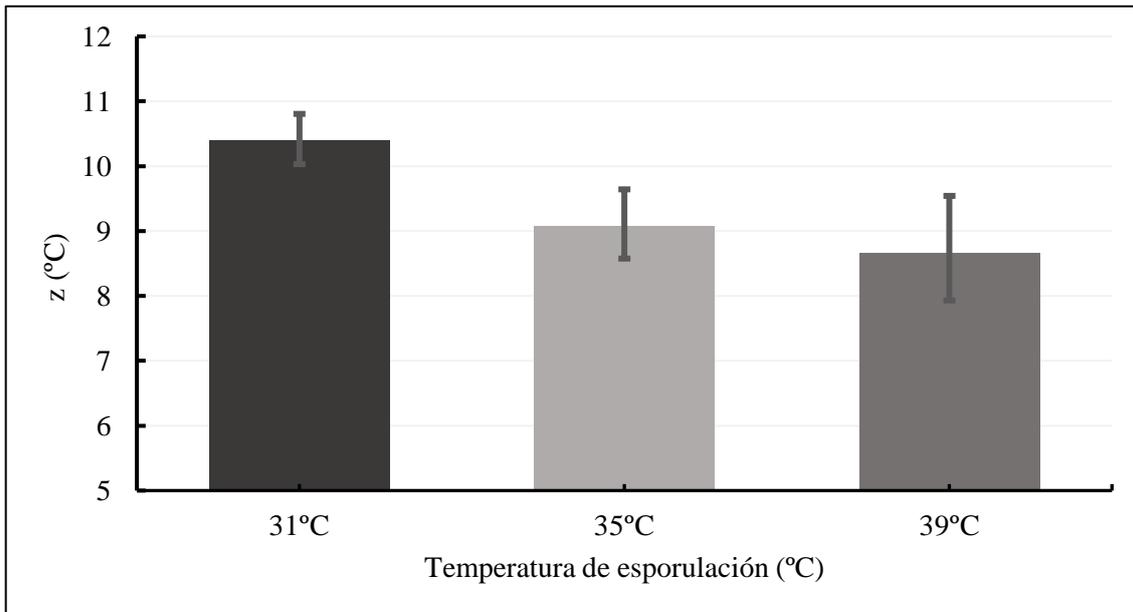


Figura 5. Valores z de *B. cereus* esporulado a 31°C, 35°C y 39°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza para el 95%.

Como se desprende de las figura 4 y 5 el valor z de las suspensiones obtenidas a 35 y 39 °C no difirió significativamente; o dicho en otras palabras, la mayor resistencia de los esporos obtenidos a 35 °C se mantuvo constante a todas las temperaturas de tratamiento. Por el contrario, el valor z de la suspensión obtenida a 31 °C fue significativamente mayor que el de las anteriores. A una temperatura de tratamiento de 100 °C la termorresistencia de las suspensiones obtenidas a 31 y 39 °C no difirió significativamente, mientras que a 105 °C la termorresistencia de la suspensión obtenida a 39 °C fue sensiblemente mayor que la de 31 °C y muy semejante a la de la obtenida a 35 °C.

Los datos bibliográficos indican que la temperatura de esporulación tienen escasa influencia en los valores z de especies semejantes, como *B. subtilis* (Condón et al., 1992a) y *B. licheniformis* (Raso et al., 1995). En nuestra investigación hemos observado que el valor z es significativamente mayor en la suspensión obtenida a la menor temperatura de esporulación, si bien es cierto que la magnitud de las diferencias es pequeña.

Por el momento se desconoce el mecanismo a través del cual la temperatura de esporulación influye en la termorresistencia microbiana. Según algunos autores podría deberse a una mayor deshidratación del protoplasto, y según otros a una mayor mineralización de los esporos obtenidos a mayor temperatura (Palop et al., 1999b).

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

6.2.2. Influencia del pH del medio de tratamiento.

El pH del medio de tratamiento es uno de los factores simultáneos al tratamiento que más afectan a la termorresistencia de los esporos. Ciertamente la cuantía de los efectos de la actividad de agua son mayores pero su aplicación en el procesado industrial es escasa por los notables cambios que produce en la textura de los alimentos. Por el contrario la acidificación apenas afecta a la textura y únicamente provoca cambios en el sabor lo que, en ocasiones, puede ser incluso deseable; es por este motivo que la acidificación de las conservas es una práctica generalizada en la industria alimentaria.

Para estudiar el efecto del pH en la termorresistencia de *B. cereus* realizamos las determinaciones de resistencia al calor a 105°C, 102,5°C, 100°C, 97,5°C y 95°C utilizando como medio de tratamiento tampón McIlvaine de pH 7, 6, 5 o 4. Las determinaciones se realizaron según hemos descrito, extrayendo las muestras a intervalos de tiempo que oscilaron entre 20 segundos y 1 minuto.

Los primeros experimentos se realizaron en unas condiciones de referencia que fueron: una temperatura de esporulación de 31 °C y una temperatura de tratamiento de 100°C. Los resultados obtenidos en esta primera exploración se detallan en la figura 6. Posteriormente se realizó un estudio sistemático con el resto de suspensiones. Los valores D_{100} obtenidos se detallan en las tablas 2, 3, 4 y 5. La figura 7 se incluye para facilitar la comparación de los resultados obtenidos en los medios de distinto pH.

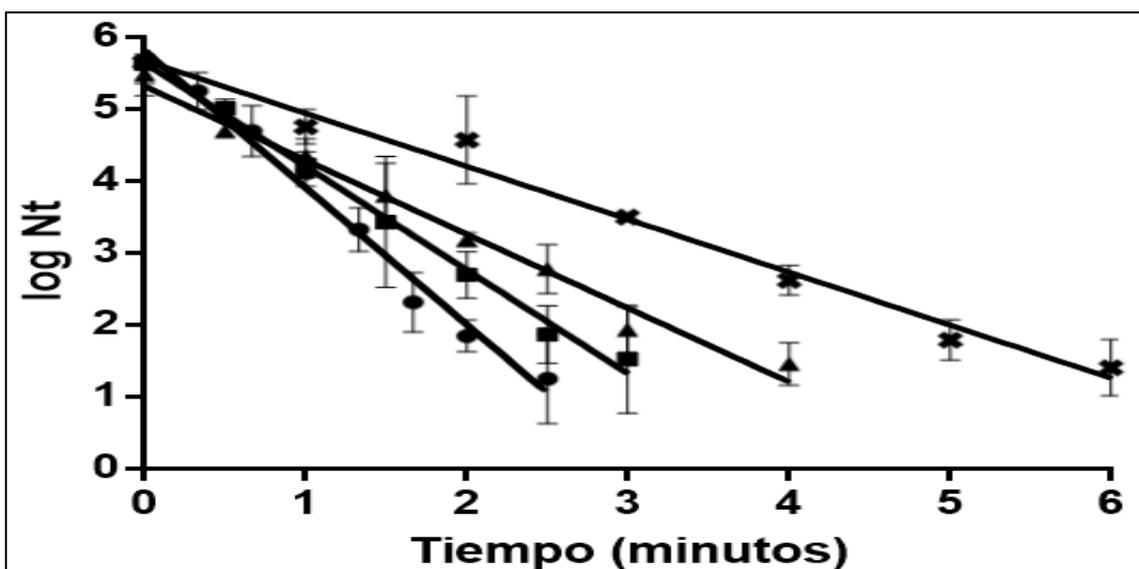


Figura 6. Líneas de supervivencia a 100 °C de *B. cereus* esporulado a 31°C y tratado en medios de distinto pH: ● pH4 ■ pH5 ▲ pH6 * pH7 . Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

La figura 6 muestra el aumento de la velocidad de inactivación cuando el pH del medio de tratamiento disminuye. La figura demuestra también que la acidificación no cambia la cinética exponencial de inactivación, es decir a ninguno de los pHs investigados se observan la aparición de hombros ni de colas. Esto permite comparar fácilmente el efecto del pH en la termorresistencia a partir del estudio de los valores D_t y z .

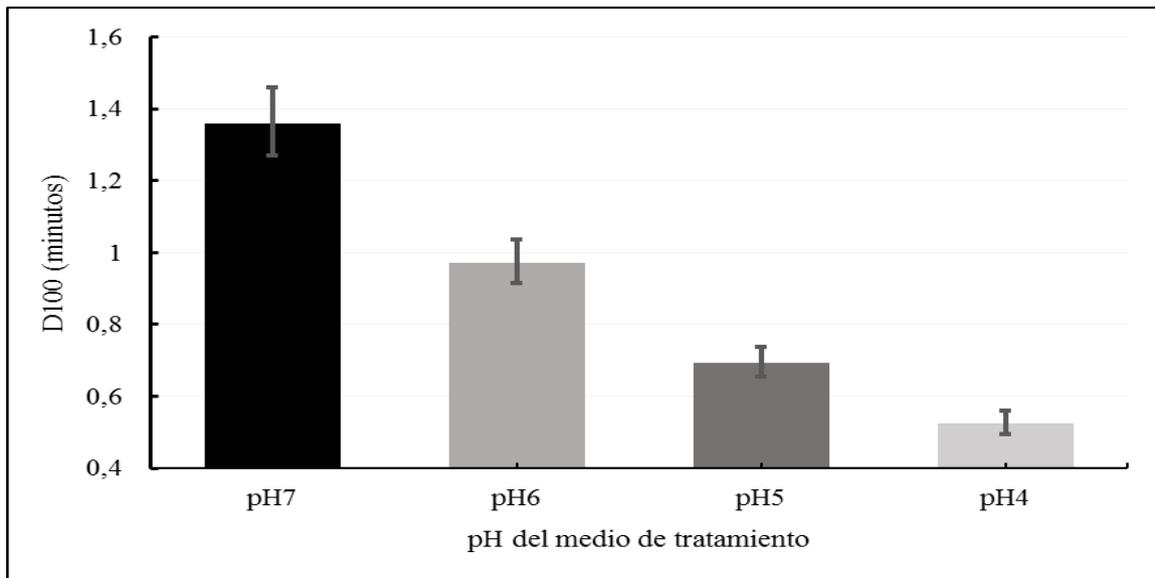


Figura 7. Valores D_{100} de *B. cereus* tratado en medios de distinto pH. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza para el 95%.

Como se puede observar en la figura 7, los valores D_{100} aumentan significativamente cuando el pH del medio de tratamiento se acerca a la neutralidad. El aumento del pH del medio de tratamiento desde 4 hasta 7 aumenta la termorresistencia de nuestra cepa tres veces aproximadamente. De la figura se deduce que existe una relación prácticamente lineal entre ambas variables.

Dada su importancia desde un punto de vista práctico, han sido numerosos los autores que han estudiado la influencia del pH del medio de tratamiento en la termorresistencia de los esporos bacterianos. Estos autores (Baril et al., 2012; Palop et al., 1999a; Samapundo et al., 2011; Palop et al., 1996; Condón et al., 1992b) coinciden en que la termorresistencia presenta valores más elevados cuando el medio de tratamiento está cercano a la neutralidad y decrecen cuando el medio es más ácido. Nuestros resultados apoyan esta observación general. Desde un punto cuantitativo la magnitud del efecto de la acidificación es muy similar al de especies próximas, como *B. coagulans* – los valores D aumentan aproximadamente entre 3-5 veces cuando el pH del

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

medio de tratamiento aumenta de 4 a 7- (Palop et al., 1998). y menor que las especies termófilas, tales como *B. stearothermophilus* – los valores D_{115} de 10 minutos aproximadamente a pH 7 a aproximadamente 1 en un medio de pH 4- (López et al., 1996).

La explicación del efecto de la acidificación no se conoce con certeza, sin embargo hay varias hipótesis al respecto. Una de ellas supone que la protonización de los grupos carboxilo del cortex del esporo provoca un colapso de toda su estructura, lo que permite la rehidratación del protoplasto con la consecuente pérdida de termorresistencia (Gould et al., 1975). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que se ha observado por microscopía electrónica que el tamaño del cortex del esporo decrece al aplicarle un tratamiento térmico y que esta reducción de tamaño es mayor cuando el medio de tratamiento presenta un pH ácido (Okereke et al., 1990).

Otras hipótesis establecen que esta influencia puede ser debida a la interacción de los protones del medio ácido con los minerales del esporo, de tal manera que sustituirían a los cationes divalentes presentes de forma natural en el esporo y en sus proteínas provocando una mayor sensibilidad a la desnaturalización térmica (Bender et al., 1985).

Siguiendo un protocolo experimental semejante al descrito en el apartado anterior, decidimos estudiar si el efecto del pH era dependiente de la temperatura de tratamiento. Para ello se construyeron las líneas de termodestrucción a partir de las cuales se calcularon los valores z . Las líneas de termodestrucción se muestran en la figura 8 y los valores z calculados en la figura 9.

Como era de esperar encontramos una relación exponencial entre los valores D_t y la temperatura de tratamiento a todos los pHs explorados. Comparando las líneas de termodestrucción se observa que, en general, son paralelas lo que indicaría que el efecto del pH es independiente de la temperatura de tratamiento. La línea correspondiente al medio de pH 6 parece ser una excepción a este comportamiento general. Con objeto de valorar la magnitud de esta diferencia procedimos a calcular los valores z , que se incluyen en la figura 9.

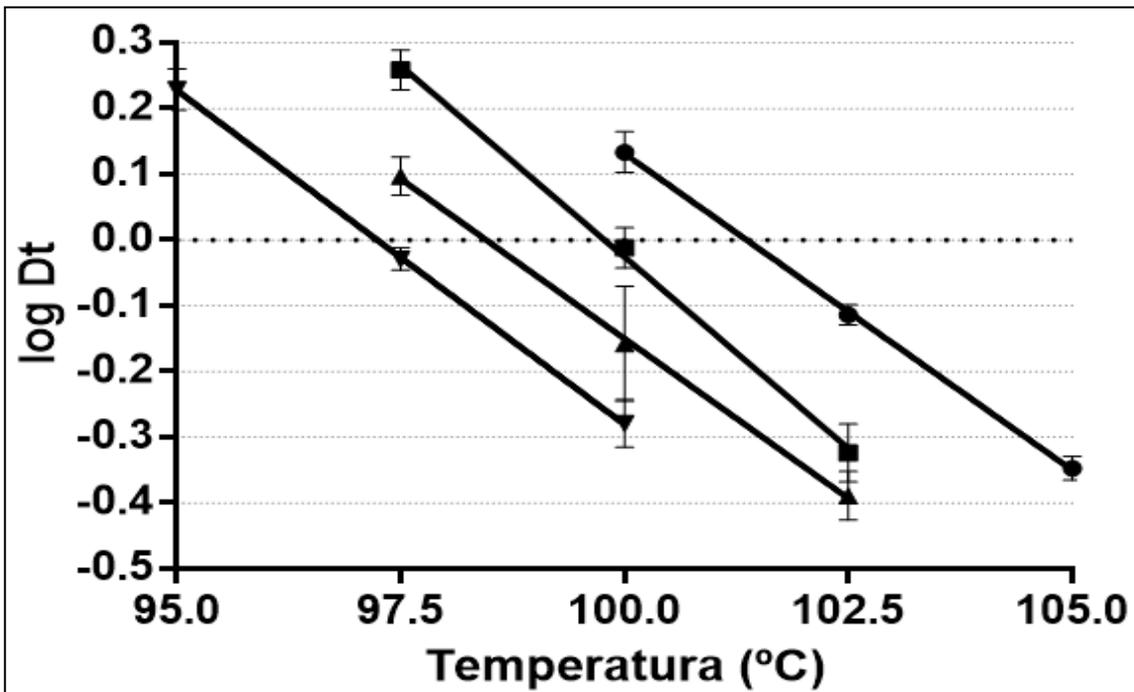


Figura 8. Líneas de termodestrucción en medios de distinto pH de *B. cereus* esporulado a 31°C. pH 7 —■— pH 6 —▲— pH 5 —▼— pH 4. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza para el 95%.

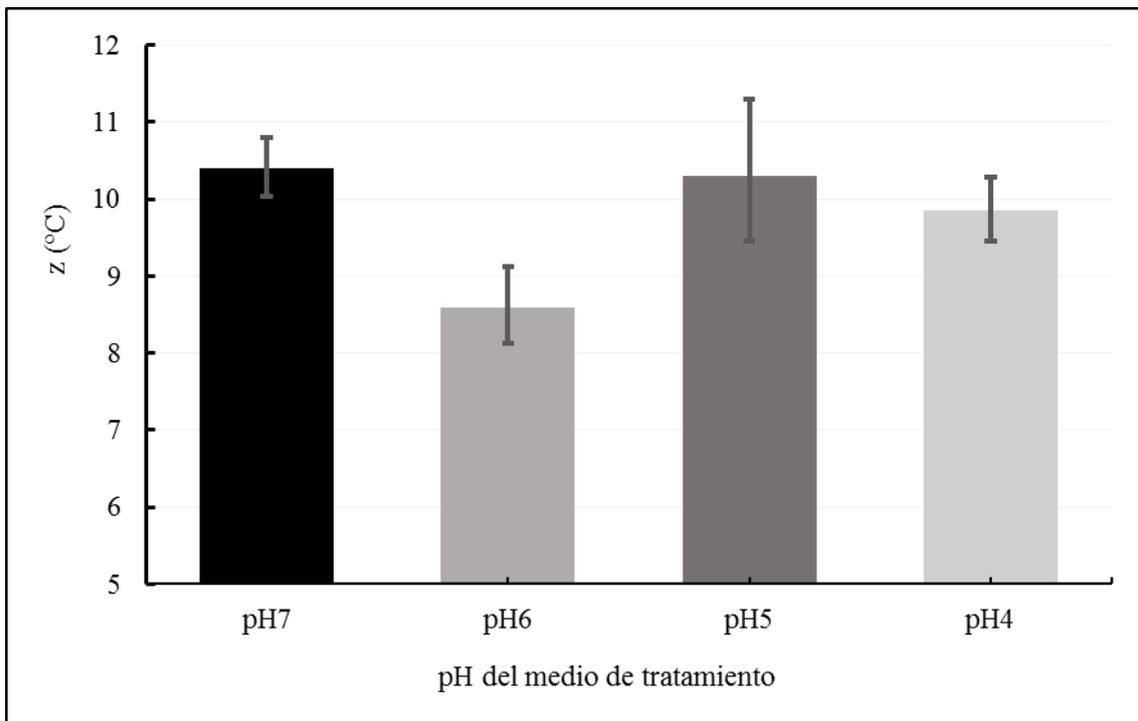


Figura 9. Valores z de *B. cereus* en medios de tratamiento de distinto pH. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

El análisis estadístico de los valores z calculados indicaron que existían diferencias significativas no solo entre los valores z obtenidos a pH 6 y el resto, sino también entre los pH 4 y pH 7. Estas diferencias, aunque significativas fueros de poca magnitud. No existe ninguna explicación en la bibliografía que nos permita justificar este comportamiento, aparentemente aleatorio. En la bibliografía si se han descrito cambios progresivos del valor z con la acidificación, si bien es cierto que existen discrepancias entre los resultados obtenidos por distintos autores. Unos autores han observado que a medida que el pH del medio de tratamiento es mas bajo, el valor z obtenido es mayor (Condón et al., 1992b; Palop et al., 1996), otros que sucede lo contrario (Mallidis et al., 1990), y otros que no existe ninguna interacción entre el valor z y el pH del medio de tratamiento (Baril et al., 2012; Mazas et al., 1997). Esto parece indicar que la influencia del pH del medio de tratamiento en el valor z , al igual que en los valores D , depende en gran medida del microorganismo estudiado.

6.2.3. Influencia combinada de la temperatura y el pH.

Según hemos indicado en la introducción el efecto de la temperatura de esporulación y del pH del medio de tratamiento en la termorresistencia de los esporos bacterianos se ha estudiado repetidamente, sin embargo la posible interacción de ambas variables es mucho menos conocida. Por ello el siguiente paso en nuestra investigación fue estudiar su influencia combinada en la termorresistencia de *B. cereus*.

Para resolver esta incógnita, se completó la matriz experimental determinando la termorresistencia de las suspensiones obtenidas a 31°C, 35°C y 39°C en los cuatro pHs de tratamiento.

A partir de las correspondientes gráficas de supervivencia se calcularon los valores D_{100} que aparecen detallados en las tablas 2, 3, 4, y 5. Con estos valores D_{100} se realizó una regresión múltiple del tipo cuadrática con interacciones y posteriormente se eliminaron los términos de la ecuación sin significación. La ecuación obtenida fue:

$$D_{100} = 23 - 4,460 * pH - 1,434 * T^{aesp} - 0,187 * pH^2 + 0,301 * pH * T^{aesp} + 0,02384 * T^{aesp}^2 + 0,00837 * pH^2 * T^{aesp} - 0,00559 * T^{aesp}^2 * pH$$

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

Tabla 7. Valores D_{100} en medios de pH 7, 6, 5 y 4 de suspensiones esporuladas a 31°C, 35°C o 39°C. Se incluyen los valores experimentales y los predichos con una ecuación cuadrática.

pH	Tª esporulación	D_{100} obtenido experimentalmente	D_{100} obtenido modelizando
7	31	1,358	1,376
	35	1,726	1,655
	39	1,44	1,444
6	31	0,972	0,954
	35	0,93	1,072
	39	0,857	0,879
5	31	0,694	0,677
	35	0,772	0,701
	39	0,65	0,592
4	31	0,526	0,544
	35	0,54	0,540
	39	0,553	0,584

Enfrentando los valores experimentales frente a los calculados con la regresión múltiple (figura 10) se puede estudiar la bondad de las predicciones y detectar la presencia de sesgos.

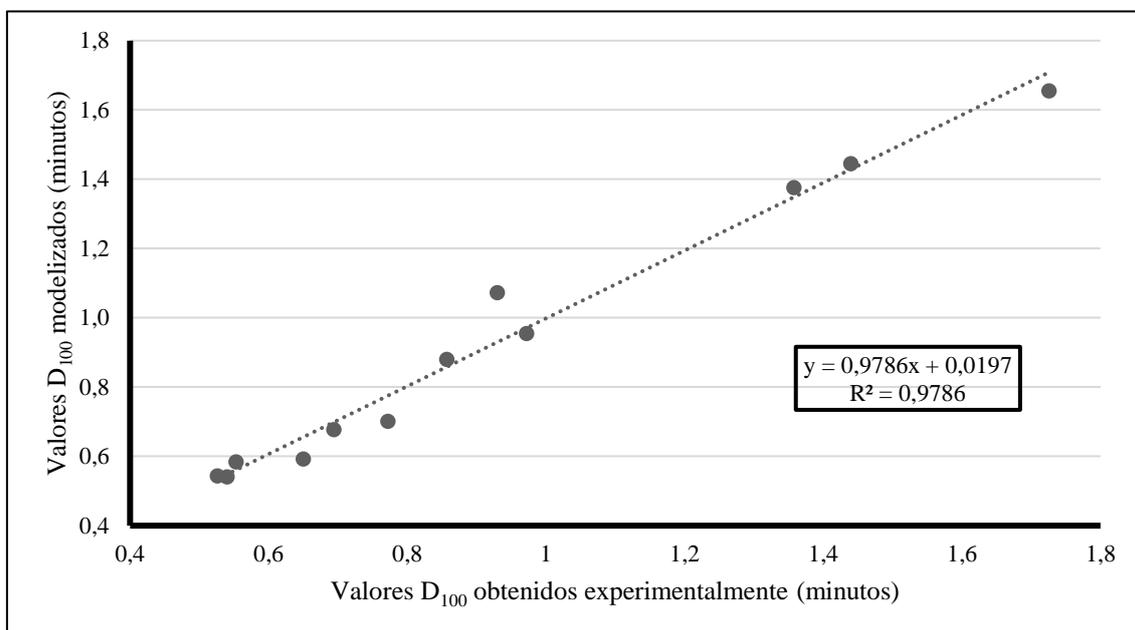


Figura 10. Relación entre los valores D_{100} obtenidos experimentalmente y los obtenidos a partir del modelo desarrollado.

Como se desprende de la figura 10 el modelo desarrollado predice, a juzgar por el coeficiente de determinación, con exactitud el efecto del pH y la temperatura de esporulación en la termorresistencia de *B. cereus*. Además el modelo no está sesgado

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

puesto que los errores se distribuyen aleatoriamente en todo el rango de termorresistencias.

A partir de la ecuación desarrollada se pudo construir el correspondiente diagrama de superficie (figura 11) que ayuda a visualizar las posibles interacciones entre variables.

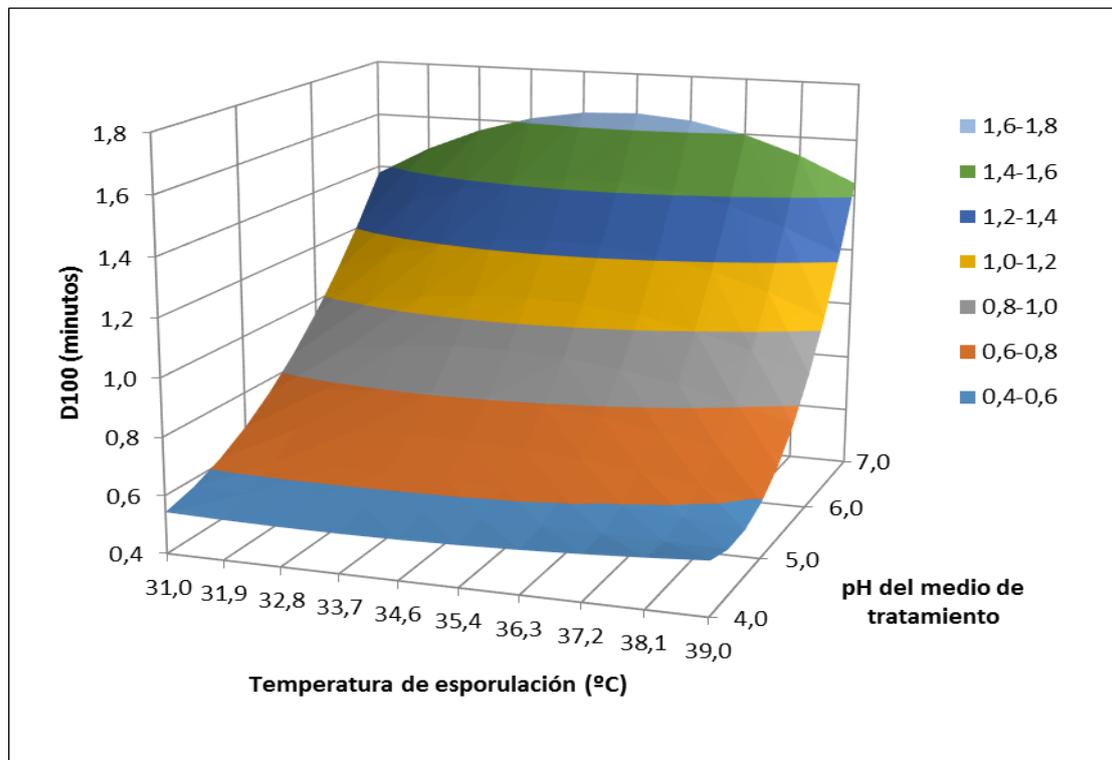


Figura 11. Relación entre los valores D_{100} de *B. cereus* la temperatura de esporulación y el pH del medio de tratamiento.

El diagrama de superficie nos permite concluir que existe una notable interacción entre los efectos de la temperatura de esporulación y los del pH del medio de tratamiento: El efecto de la temperatura de esporulación aumenta con el pH del medio de tratamiento; además el efecto del pH del medio de tratamiento es mayor cuando el microorganismo ha esporulado a 35 °C. No existen datos en la bibliografía con los que podamos comparar nuestros resultados.

6.3. TERMORRESISTENCIA DE *B. cereus* EN CONDICIONES ANISOTÉRMICAS

El método tradicional para la determinación de la termorresistencia de los esporos bacterianos ha sido el tratamiento isotérmico, es decir, que se realiza a una temperatura de tratamiento constante extrayendo muestras a diferentes tiempos. Sin

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

embargo los tratamientos térmicos que se aplican en las industrias conserveras suelen ser anisotérmicos, es decir el tratamiento empieza a bajas temperaturas y va ascendiendo hasta alcanzar la temperatura de régimen.

De lo anterior se deduce que normalmente los cálculos de los tratamientos térmicos industriales se realizan a partir de datos obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas. Aunque existen muy pocos datos al respecto, algunos datos bibliográficos parecen indicar que en algunas ocasiones el comportamiento microbiano difiere cuando se trata en condiciones isotérmicas y anisotérmicas. Es posible que durante los tratamientos anisotérmicos se produzcan fenómenos de adaptación y/o sensibilización de los esporos bacterianos al calor lo que puede inducir a errores en el diseño de estos tratamientos (Esteban et al., 2013).

El principal objetivo de esta parte de la investigación fue comprobar la relación entre los valores de termorresistencia obtenida en los experimentos realizados a temperatura constante y los experimentos realizados con un tratamiento anisotérmico.

Los experimentos con tratamiento anisotérmico fueron determinados a los dos pHs extremos: 4 y 7 con objeto de detectar la posible influencia de esta variable. El estudio se realizó con los esporos obtenidos a 35°C, es decir los más termorresistentes. Para la realización de los tratamientos térmicos se utilizó una temperatura de partida de 40°C y un ritmo de calentamiento de 5°C por minuto. Los experimentos se realizaron por duplicado.

A partir de la curva de inactivación en condiciones anisotérmicas es posible calcular matemáticamente un valor D_t de referencia y el valor z que explicaría el ritmo de inactivación. Estos valores se obtuvieron con una hoja de cálculo Excel desarrollada al efecto por Álvarez y Condón.

La figura 12 muestra las curvas de inactivación en el medio de pH 7 y la figura 13 las obtenidas en el medio de pH 4. Las figuras incluyen también el ritmo de inactivación predicho a partir de los datos obtenidos en condiciones isotérmicas, que se han descrito en los apartados anteriores.

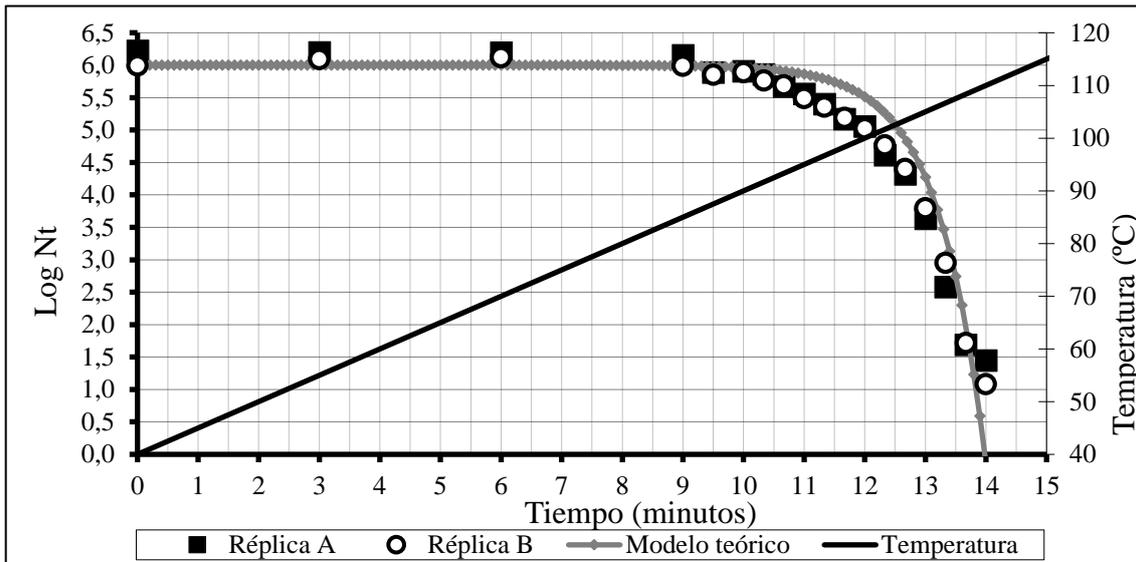


Figura 12. Gráficas de supervivencia obtenida en un tratamiento a temperatura variable, con un aumento constante de 5°C/minuto en un medio de tratamiento de pH 7.

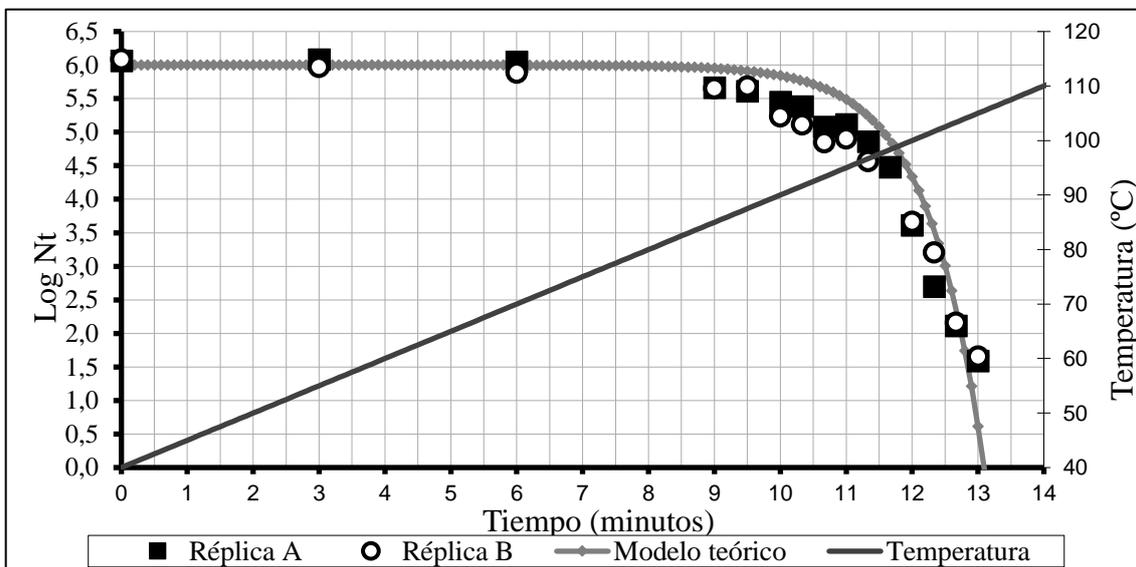


Figura 13. Gráficas de supervivencia obtenida en un tratamiento a temperatura variable, con un aumento constante de 5°C/minuto en un medio de tratamiento de pH 4.

Como se puede observar en las figuras 12 y 13 los valores obtenidos experimentalmente en condiciones anisotérmicas no coinciden en ninguno de los casos con los ritmos de inactivación predichos a partir de los valores D y z obtenidos en los tratamientos isotérmicos. Estas discrepancias podrían deberse a fenómenos de adaptación y/o sensibilización aunque los datos existentes son tan escasos que no nos atrevemos a plantear ninguna hipótesis.

Para cuantificar la magnitud de las discrepancias entre los valores esperados y los obtenidos experimentalmente ajustamos datos experimentales con la hoja de cálculo descrita y, a partir de ella dedujimos el valor D_{100} , que elegimos como referencia, y el valor z que explicaría el comportamiento observado experimentalmente. La figura 16

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

muestra, a modo de ejemplo uno de estos ajustes y permite apreciar la bondad del modelo.

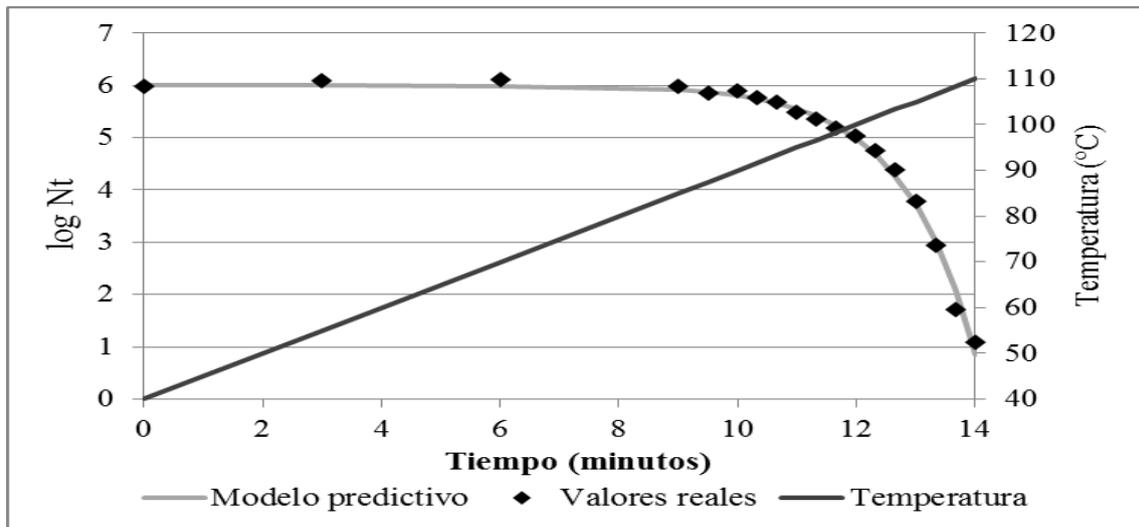


Figura 16. Curva de inactivación de *B. cereus* sometido a un tratamiento anisotérmico en un medio de pH 7.

Los valores D_{100} y z , estimados a partir de los ajustes, se incluyen en la tabla 8. En la tabla se han incluido también los valores obtenidos en condiciones isotérmicas a efectos comparativos.

Tabla 8. Comparación de los valores D_{100} y z obtenidos en los tratamientos isotérmicos y anisotérmicos

pH	Tratamiento Isotérmico		Tratamiento Anisotérmico		Error acumulado
	D_{100} (minutos)	Z (°C)	D_{100} (minutos)	Z (°C)	
7	1,726	9,081	1,218	14,115	0,266
			1,203	15,044	0,856
4	0,54	9,796	0,709	18,670	0,107
			0,604	15,711	0,510

La tabla 8 permite cuantificar las diferencias entre los valores D_{100} y z obtenidos en ambos tratamientos. En los valores D se aprecia un ligero cambio, en diferente sentido dependiendo del pH de medio de tratamiento. A pH 7 el D observado es inferior al calculado mientras que a pH 4 es ligeramente superior; este diferente comportamiento podría ser debido a la temperatura de referencia seleccionada (100 °C). En cualquier caso, lo más relevante y cuantitativamente más importante es el cambio de los valores z aparentes. En ambos casos el microorganismo muestra un valor z mayor en los tratamientos isotérmicos. Este mayor valor z implica que las diferencias en termorresistencia en condiciones isotérmicas y anisotérmicas será tanto mayor cuanto más alta sea la temperatura de régimen del autoclave. Este es un aspecto importante que debería ser investigado con mayor profundidad dado que apenas existen datos en la bibliografía al respecto y puede tener graves consecuencias en la práctica industrial.

7. CONCLUSIONES

De los resultados de esta investigación pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- El porcentaje de esporulación de *Bacillus cereus* es mayor en agar nutritivo que en agar triptona soja. La esporulación mejora en ambos medios si son enriquecidos con glucosa.
- La inactivación térmica de *B. cereus* sigue una cinética estrictamente exponencial.
- La termorresistencia de *B. cereus* depende de la temperatura de esporulación. La máxima termorresistencia se alcanza cuando la esporulación se produce a 35 °C, disminuyendo tanto por encima como por debajo de este valor.
- La termorresistencia de *B. cereus* aumenta con el pH del medio de tratamiento. El efecto del pH solo cambia ligeramente con la temperatura de tratamiento.
- Existe una interacción entre los efectos de la temperatura de esporulación y el pH del medio de tratamiento. El efecto del pH es mayor en los esporos obtenidos a aquellas temperaturas que inducen una mayor termorresistencia. El efecto de la temperatura de esporulación es mayor cuando se compara la termorresistencia en medios neutros.
- Los esporos muestran en los tratamientos anisotérmicos una termorresistencia mayor que la deducida de los tratamientos isotérmicos, siendo la discrepancia tanto mayor cuanto más alta es la temperatura de calentamiento.

7. CONCLUSIONS

From the results of this investigation can be extract the following conclusions:

- The sporulation's percentage of *Bacillus cereus* is higher in nutrient agar than in tryptone soya agar. The sporulation improves in both media if they are enriched with glucose.
- The thermal inactivation of *B. cereus* follows a strictly exponential kinetics.
- The heat resistance of *B. cereus* depends of the sporulation temperature. The maximum heat resistance is reached when the sporulation occurs at 35°C, decreasing both above and below this value.
- The heat resistance of *B. cereus* increases with the pH of the treatment media. The effect of the pH only changes slightly with the treatment temperature.
- There is an interaction between the effects of the sporulation temperature and the pH of the treatment media. The effect of the pH is higher in the spores obtained in the temperatures which induces a higher heat resistance. The effect of the sporulation temperature is higher when the heat resistance is compared in neutral media.
- The spores shows in the nonisothermal treatments a higher heat resistance than deduced from the isothermal treatments, being the discrepancy bigger when the heating temperature is higher.

8. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo de fin de grado me ha permitido conocer un patógeno emergente como es *B. cereus*, su importancia en la seguridad de los alimentos y la influencia de diversos factores ambientales en su termorresistencia. Durante la realización de este trabajo he aprendido el manejo de numerosos equipos de laboratorio, entre ellos destaca el manotermosonicador con el que realicé las determinaciones de termorresistencia, también aprendí a manejar los demás termorresistómetros presentes en el laboratorio, aunque finalmente no los usé en este trabajo de fin de grado. Otro de los grandes aportes de este trabajo ha sido el

Por otro lado, también aumente mis conocimientos acerca del análisis estadístico de los datos y aprendí a utilizar programas como GraphPad Prisma, o complementos como el Essential Regression del programa Excel para la realización de las regresiones múltiples.

A parte de los conocimientos a nivel de manejo de equipos y programas, también mejoré mis conocimientos acerca del funcionamiento del laboratorio, sobre todo en materia de las obligaciones y riesgos que hay en él.

Por último en materia de redacción y elaboración de material escrito; en mi opinión este trabajo me ha dado gran cantidad de aportaciones que me han permitido mejorar mi forma de redactar, tanto en español como en inglés, así como la organización y estructura propia de los documentos científicos. Otra aportación de este trabajo también ha sido la capacidad de poder extraer conclusiones y compararlas con otros autores de la bibliografía a partir de los resultados obtenidos experimentalmente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ball, C.O. and Olson, F.C.W. (1957). Sterilization in food technology. London: Mc Graw-Hill Company.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguériel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F. and Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*, 30(1), pp.29-36.
- Beaman, T.C. and Gerhardt, P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, pp.1242- 1246.
- Bender, G.R. and Marquis, R.E. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, pp.1414-1421.
- Casadei, M., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J. and Gaze, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1-2), pp.125-134.
- Condon, S., Bayarte, M. and Sala, F. (1992a). Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(3), pp.251-256.
- Condon, S. and Sala, F., (1992b). Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *Journal of Food Protection*, 55(8), pp.605-608.
- Dawson, R., Elliot, D., Elliot, W. and Jones, M. (1969). *Data for biochemical research*. Oxford at the Clarendon Press, Oxford, pp.654.
- El-Bisi, H.M. and Ordal, Z.J. (1956). The effect of sporulation temperature on the thermal resistance of *Bacillus coagulans* (var. *thermoacidurans*). *Journal of Bacteriology*, 71, pp.10- 16.
- Esteban, M., Huertas, J., Fernández, P. and Palop, A. (2013). Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. *Food Microbiology*, 34(1), pp.158-163.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

- Fernández-Coll, F. and Rodríguez-Toro, W. (1986). Thermal resistance of spores of two species of the genus *Bacillus*. J. Agric. Univ. P.R. 70, pp.189-195.
- González, I., López, M., Bernardo, A., Mazas, M. and González, J. (1992). Modificaciones en la respuesta al calor de *Bacillus cereus* inducidas por la utilización de diferentes lotes del medio de recuperación: Apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores induced by lots of different recovery media. Anales de la Facultad de Veterinaria de León. 38, pp.89-98.
- González I, López M, Martínez S, Bernardo A and González J. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. International Journal of Food Microbiology, 51(1), pp.81-84.
- González, I., López, M., Mazas, M., Bernardo, A. and Martín, R. (1996). Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology, 31(1-3), pp.341-347.
- Gould, G. and Dring, G. (1975). Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. Nature, 258(5534), pp.402-405.
- Khoury, P.H., Lombardy, S.J. and Slepecky, R.A. (1987). Perturbation of the heat resistance of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol. Current Microbiology, 15, pp.15-19.
- Klotz, B., Pyle, D. and Mackey, B. (2007). New Mathematical Modeling Approach for Predicting Microbial Inactivation by High Hydrostatic Pressure. Applied and Environmental Microbiology, 73(8), pp.2468-2478.
- Lechowich, R.J. and Ordal, Z.J. (1962). The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores. Canadian Journal of Microbiology, 8, pp.287-295.
- Leguerinel, I., Couvert, O. and Mafart, P. (2000). Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. International Journal of Food Microbiology, 55(1-3), pp.223-227.
- Leguerinel, I., Couvert, O. and Mafart, P. (2007). Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. International Journal of Food Microbiology, 114(1), pp.100-104.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

- Lindsay, J.A., Barton, L.E., Leinart, A.S. and Pankratz, H.S. (1990). The effect of sporulation temperature on sporal characteristics of *Bacillus subtilis* A. *Current Microbiology*, 21, pp.75-79.
- López, M. (1994). Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la respuesta al calor de *Bacillus stearothermophilus*. Tesis doctoral. Universidad de León.
- López, M. (1996). Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3), pp.405-410.
- Lopez, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J., Martin, R. and Bernardo, A. (1997). Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(4), pp.305-311.
- Mallidis, C., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G. and Katsaboxakis, C. (2007). Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science and Technology*, 25(4), pp.442-448.
- Mazas, M., López, M., González, I., Bernardo, A. and Martín, R. (1997). Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 25(5), pp.331-334.
- Michels, M.J.M. and Visser, E.F. (1976). Occurrence and thermoresistance of spores of psychrophilic and psychrotrophic aerobic sporeformers in soil and foods. *Journal of Applied Microbiology*, 41, pp.1-11.
- Murrell, W.G. Heat resistance of microorganisms. *Aust. J. Pharmacy*. S40. 1964.
- Odling, T. and Pflug, I., (1977). Recovery of spores of *Clostridium botulinum* in yeast extract agar and pork infusion agar after heat treatment. *American Society for Microbiology*, 34(4), pp.377-381.
- Okereke, A., Beelman, R., Doores, S. and Walsh, R. (1990). Elucidation of the Mechanism of the Acid-blanch and EDTA Process Inhibition of *Clostridium sporogenes* PA 3679 Spores. *Journal of Food Science*, 55(4), pp.1137-1142.

Trabajo de Fin de Grado de Raúl Alonso

- Pagán, R., Mañas, P., Alvarez, I. and Sala, F. (1998). Heat resistance in different heating media of *listeria monocytogenes* ATCC 15313 grown at different temperatures. *Journal of Food Safety*, 18(3), pp.205-219.
- Palop, A., Mañas, P. and Condón, S. (1998). Sporulation temperature and heat resistance of bacillus spores: a review. *Journal of Food Safety*, 19(1), pp.57-72.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S. and Sala, F. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(1), pp.1-10.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S. and Sala, F. (1999a). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), pp.243-249.
- Palop, A., Sala, F., and Condón, S. (1999b). Heat Resistance of Native and Demineralized Spores of *Bacillus subtilis* Sporulated at Different Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp. 1316–1319.
- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S. and Sala, F. (1995). Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiology*, 12, pp.357-361.
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S., and Sala, F. (1997). Influence of Temperature and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), pp.465-471.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R. and Devlieghere, F. (2011). Validated empirical models describing the combined effect of water activity and pH on the heat resistance of spores of a psychrotolerant *Bacillus cereus* strain in broth and béchamel sauce. *Journal of Food Protection*, 74(10), pp.1662-1669.
- Sarrías, J., Valero, M. and Salmerón, M. (2002). Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiology*, 19(6), pp.589-595.
- Williams, O.B. and Robertson, W.J. (1954). Studies on heat resistance. VI. Effect of temperature of incubation at which formed on heat resistance of aerobic thenophilic spores. *Journal of Bacteriology*, 67, pp.377-378.