

EFICACIA DEL CLORURO SÓDICO COMO INHIBIDOR DE
Bacillus stearothermophilus

(EFFECTIVENESS OF SODIUM CHLORIDE AS INHIBI-
TORY AGENT FOR *Bacillus stearothermophilus*)

Mercedes López Fernández *
Margarita Mazas Alberdi **
Isaac González Martínez **
Josefa González Prieto **
Ana Bernardo Alvarez **

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, heat resistance, NaCl inhibition, spores
Palabras claves: *Bacillus stearothermophilus*, resistencia al calor, inhibición por NaCl, esporos.

SUMMARY

The effects of different salt concentrations in the recovery medium on the unheated and heated *Bacillus stearothermophilus* spores (ATCC 12980, 7953, 15951 and 15952) were investigated. Uninjured spores of strain 7953 did not form colonies after addition of salt at concentration of 3%, whereas the other strains were able to grow up to a level of 6%. Sodium chloride had a marked effect on the recovery of injured spores. Concentrations as low as 0.5% caused a reduction in the recovery efficiency. In all cases, increasing the salt levels resulted in a progressive reduction of recovery rates, although the minimum inhibitory concentration varied among the strains, from 2% for 7953 and 15952 strains, 3% for 15951 strain and 4% for 12980 strain.

D-values gradually decreased as the salt content in the medium increased resulting in a reduction of 50% when survivors were recovered in the presence of 2% of salt.

No statistical significance ($p > 0.05$) differences were detected among calculated z-values for all strains in all assayed conditions. z-Values ranged from 7.35 to 8.08, with a mean value of 7.81 ± 0.23 .

* Area de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Orense. Universidad de Vigo.

** Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. An, Fac. Vet. León. 1994-96, 39, 71-80

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto inhibitorio ejercido por el cloruro sódico sobre *Bacillus stearothermophilus* (cepas ATCC 12980, 7953, 15951 y 15952). La intensidad del efecto observado varió, tanto para los esporos no tratados como para los sometidos a la acción del calor. En el primer caso, la adición de un 3% de sal no permitió el crecimiento de la cepa 7953, mientras que las otras tres fueron capaces de formar colonias incluso tras la adición de un 6% de NaCl. El calentamiento produjo un aumento de la sensibilidad de los esporos de tal forma que, la adición de un 0.5% dio lugar a un descenso en los niveles de recuperación hallados, que disminuían progresivamente al incrementar la cantidad de sal añadida, aunque se pusieron de manifiesto diferencias entre cepas. Así, concentraciones superiores al 2% de sal no permitieron la recuperación de las cepas 7953 y 15952, mientras que fue necesario añadir para obtener este efecto al menos un 3% de sal en el caso de la cepa 15951 y un 4% para la 12980. En todos los casos, los valores D aparentes calculados descendieron progresivamente al aumentar la concentración de sal, reduciéndose en torno a un 50% al añadir el 2%.

El efecto causado por la sal resultó independiente de la temperatura de tratamiento, obteniéndose valores z de $7.81^{\circ}\text{C} \pm 0.23$.

INTRODUCCIÓN

Bacillus stearothermophilus es un microorganismo de elevada termorresistencia que ocasiona con alguna frecuencia problemas en la industria conservera, siendo uno de los agentes responsables de la alteración de los alimentos enlatados conocida como "fermentación simple" o "agriado". Aunque esta alteración podría ser controlada incrementando la intensidad del tratamiento térmico, las repercusiones negativas que ello acompaña no lo hacen aconsejable en muchas ocasiones. Sin embargo, es bien conocido que los esporos que sobreviven a los tratamientos térmicos son más sensibles frente a determinados inhibidores presentes en el medio, por lo que estos compuestos podrían desempeñar un papel importante en el control de la alteración. En este sentido, tiene especial importancia el cloruro sódico, que constituye un ingrediente usual en la mayor parte de las conservas. El efecto inhibitorio del cloruro sódico sobre *B. stearothermophilus* ha sido ya descrito en alguna ocasión, tanto para los esporos no tratados¹, como para aquellos que han sufrido un tratamiento térmico^{1,3,4,6,7,11}. Sin embargo, a partir de los datos existentes no es posible predecir la concentración mínima que inhibe la recuperación de los esporos tratados. Por otra parte, aunque son escasos los trabajos existentes en relación al efecto que la sal ejerce sobre los tiempos de reducción decimal^{4,6,7}, parece existir un acuerdo en que el NaCl provoca un descenso de los mismos, pero tampoco se conoce si este efecto es dependiente de la temperatura de tratamiento. Tan sólo Feheerry y col.⁴ han comparado los valores z obtenidos entre 115 y 121°C para los esporos recuperados en un medio sin sal y tras la adición del 0,9% de cloruro sódico, encontrando valores z de 8,3 y 7,6, respectivamente. Parece, por tanto, que la presencia de sal puede modificar los valo-

res z obtenidos, pero realmente a partir de tan escasos e incompletos datos no es posible extraer ninguna conclusión.

Este trabajo se ha planteado con la finalidad de estudiar el efecto inhibitorio de la sal sobre los esporos de *B. stearothermophilus* y comprobar si los valores z obtenidos en un amplio rango de temperaturas de tratamiento (115-130°C) se ven modificados por la presencia de diferentes concentraciones de sal en el medio utilizado para la recuperación de los esporos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos y preparación de las suspensiones de esporos

Se emplearon las cepas 7953, 12980, 15951 y 15952 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Los microorganismos se mantuvieron liofilizados en ampollas de vidrio y, antes de proceder a su utilización, fueron sometidas a varios pases en el medio de enriquecimiento caldo cerebro corazón (BHI, Oxoid), incubando a 53°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron tres resiembras en caldo nutritivo (CN) en el que se cultivaron en las condiciones citadas.

Las esporulaciones se llevaron a cabo a 53°C en agar nutritivo (AN, Biolife) suplementado con 1 ppm de manganeso añadido en forma de $\text{SO}_4\text{Mn.H}_2\text{O}$. Se utilizaron frascos de Roux que se sembraron, en todos los casos, con un cultivo en caldo nutritivo de 24 horas de incubación a 53°C, procedente de una única colonia aislada por estría en AN e incubada a 53°C durante 24 horas. El grado de esporulación se determinó por recuento directo al microscopio.

Los esporos se recogieron por arrastre con perlas de vidrio y tampón McIlvaine⁹ de pH 7,0 estériles, eliminándose los restos de agar y grandes agregados por centrifugación a 600 x g durante 5 minutos. Seguidamente, se resuspendieron en el mismo tampón, y se centrifugaron a 2500 x g durante 15 minutos, proceso que se repitió al menos cuatro veces. Posteriormente, se ajustó la concentración a 10^8 - 10^9 esporos/ml, por recuento en cámara de Thoma y se almacenaron a refrigeración hasta su uso.

Determinaciones de termorresistencia

Se llevaron a cabo en un termorresistómetro TR-SC² en un amplio rango de temperatura (115-130°C) empleando tampón McIlvaine 180 mM de pH 7,0 como medio de calentamiento.

Los valores D en las diferentes condiciones ensayadas se calcularon, una vez determinado el perfil de las gráficas de supervivencia, a partir de la inversa de la pendiente del tramo recto de la línea de regresión.

Los valores z se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de la recta de las gráficas de termodestrucción, obtenidas al representar log D frente a las correspondientes temperaturas (115, 120, 125 y 130°C) y se compararon por el test de paralelismo¹⁰.

Evaluación del efecto inhibitorio del cloruro sódico

La acción inhibitoria del cloruro sódico sobre los esporos calentados y sin tratar se investigó añadiendo al medio de recuperación/crecimiento (agar nutritivo suplementado con 100 ppm de calcio⁸) porcentajes variables de este compuesto (0; 0,5; 1,25; 2; 3; 4; 5 y 6% (p/v)).

Incubación y recuento de supervivientes

En todos los casos la temperatura de incubación utilizada fue 50°C y los recuentos se realizaron empleando un contador automático de colonias (AMS Protos) siguiendo las especificaciones descritas por Ibarz y col.⁵. Las incubaciones se llevaron a cabo en estufas controlando la humedad relativa mediante la colocación de bandejas que periódicamente se rellenaron con agua calentada hasta la temperatura de incubación. En el caso de los esporos no tratados, los recuentos se efectuaron al cabo de 48 h, independientemente de la concentración de sal añadida. Para los esporos tratados se realizaron los recuentos tras 30 h para la concentración de 0,5% (a_w : 0.997), 48 h para el 1,25% (a_w : 0.994) y 2% (a_w : 0.991) y tres días para el resto de las concentraciones ensayadas. Los valores de a_w al cabo de este tiempo resultaron ser de 0.971 y 0.968 para las concentraciones del 3 y 4% de sal, respectivamente.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los porcentajes relativos de crecimiento obtenidos para los esporos sin tratar de las distintas cepas estudiadas en las diferentes concentraciones de cloruro sódico ensayadas. En general, todas las cepas fueron sensibles a la acción de la sal, aunque la intensidad del efecto fue diferente; la cepa 7953 resultó totalmente inhibida con concentraciones del 3%, mientras que las otras tres fueron capaces de crecer a las concentraciones más altas ensayadas, del 6%, aunque éstas provocaban una fuerte reducción del número de microorganismos capaces de formar colonias.

El calentamiento produjo un aumento en la sensibilidad de los esporos al NaCl, de tal forma que, concentraciones ya del 0,5% dieron lugar a un descenso en los niveles de recuperación hallados, que disminuían progresivamente al incrementar la cantidad de sal añadida. Este efecto puede observarse en la figura 2 en la que se muestra, a modo de ejemplo, una de las gráficas de supervivencia obtenidas a 120°C para cada cepa a las diferentes concentraciones de sal estudiadas. No fue posible la recuperación a partir de concentraciones del 2% de sal para las cepas 7953 y 15952, del 3% para la 15951 y del 4% para la 12980.

En la tabla I se recogen los valores D_T obtenidos para las distintas cepas al usar las diferentes concentraciones de cloruro sódico que permitían la recuperación de las mismas. En todos los casos, los valores D calculados descendieron progresivamente al aumentar la concentración de sal, reduciéndose en torno a un 50% al usar concentraciones del 2%.

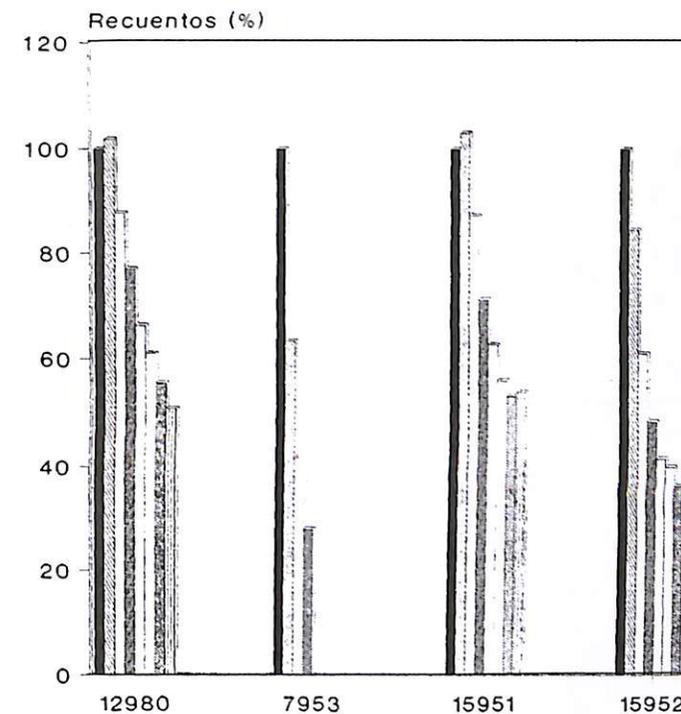


Fig. 1.- Eficiencia del cloruro sódico en la inhibición de esporos de *Bacillus stearothermophilus* expresada como

$$\% \text{ de recuentos} = \frac{\text{ufc/placa en AN suplementado con las diferentes concentraciones de NaCl}}{\text{ufc/placa en AN sin NaCl}} \times 100$$

Concentraciones de NaCl: (■) 0%; (▨) 0,5%; (□) 1,25%; (■) 2%; (▨) 3%; (□) 4%; (▨) 5%; (▨) 6%.

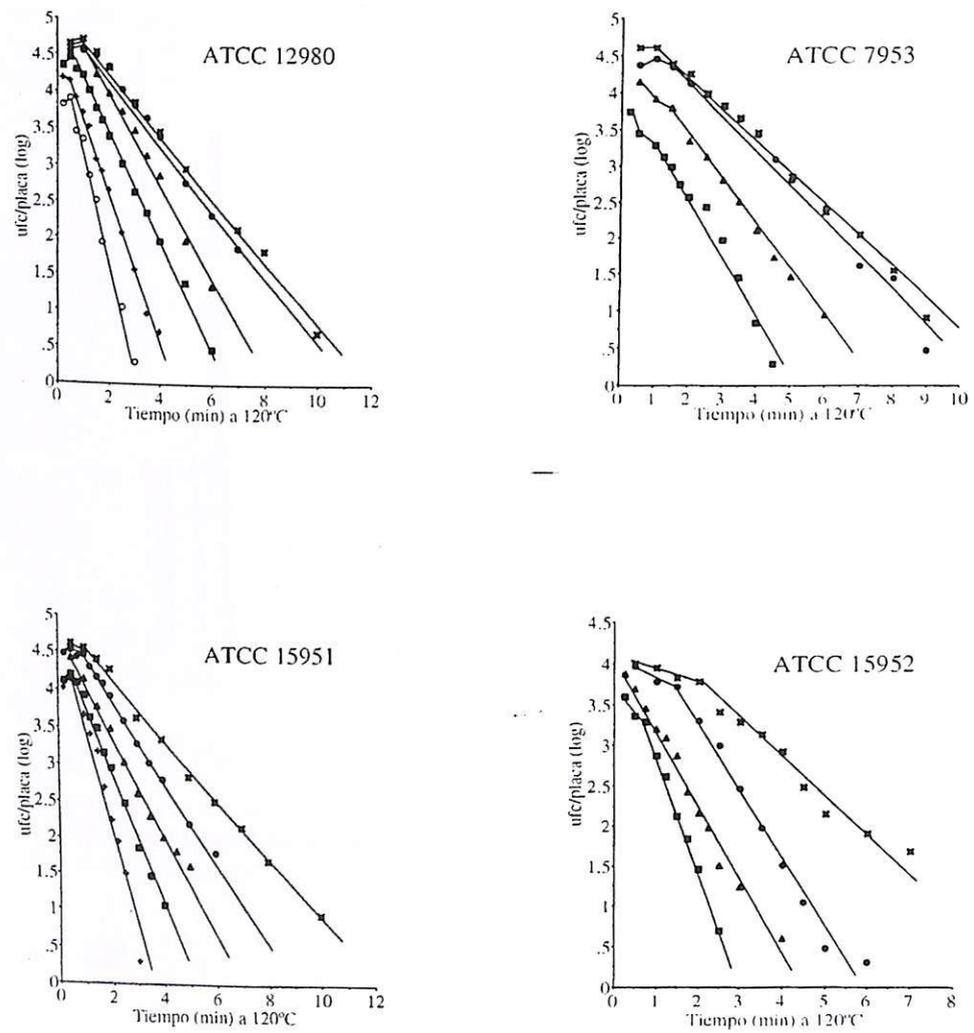


Fig 2.- Gráficas de supervivencia obtenidas para *Bacillus stearothermophilus* utilizando como medio de recuperación agar nutritivo (x) y suplementado con diferentes concentraciones de NaCl: 0,5% (●); 1,25% (◆); 2% (■); 3% (+) y 4% (o).

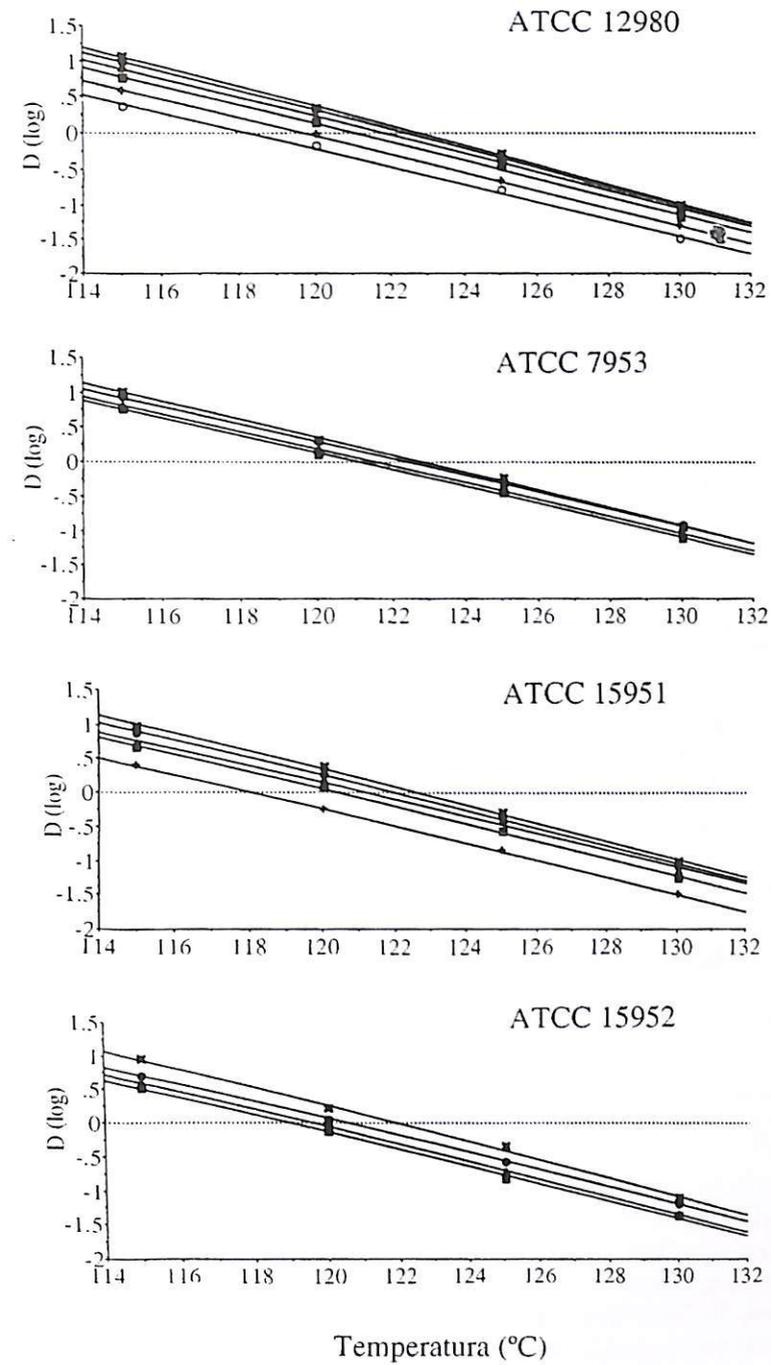


Fig 3.- Gráficas de termodestrucción obtenidas para *Bacillus stearothermophilus* utilizando como medio de recuperación agar nutritivo (x) y suplementado con diferentes concentraciones de NaCl: 0,5% (●); 1,25% (◆); 2% (■); 3% (+) y 4% (o).

Tabla I.- Efecto de la concentración de cloruro sódico en el medio de recuperación sobre la aparente resistencia al calor de los esporos de *B. stearothermophilus*. Valores D (min).

Cepas	NaCl (%)	D ₁₁₅	D ₁₂₀	D ₁₂₅	D ₁₃₀
12980	0	11,43	2,19	0,52	0,10
	0,5	9,50	2,11	0,44	0,096
	1,25	7,91	1,63	0,41	0,086
	2,0	5,73	1,38	0,36	0,066
	3,0	3,86	0,98	0,21	0,048
	4,0	2,35	0,67	0,16	0,032
	5,0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
7953	0	10,16	2,17	0,59	0,11
	0,5	8,55	2,00	0,46	0,12
	1,25	6,40	1,51	0,41	0,087
	2,0	5,73	1,30	0,34	0,076
	3,0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
15951	0	9,42	2,38	0,52	0,098
	0,5	7,46	1,83	0,46	0,082
	1,25	5,31	1,47	0,40	0,071
	2,0	4,49	1,11	0,28	0,056
	3,0	2,46	0,55	0,14	0,032
	4,0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
15952	0	8,95	1,61	0,46	0,079
	0,5	5,16	1,15	0,27	0,066
	1,25	3,71	0,96	0,19	0,045
	2,0	3,39	0,80	0,15	0,043
	3,0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No creció.

Las gráficas de termodestrucción obtenidas para las distintas cepas en las diferentes condiciones ensayadas se muestran en la figura 3. A pesar de que los valores z aumentaron ligeramente al incorporar sal al medio, el tratamiento estadístico no reveló la existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) en ningún caso. Los valores z hallados en este trabajo para las cuatro cepas de *B. stearothermophilus* en las diferentes condiciones ensayadas oscilaron entre 7,35 y 8,04°C para la cepa 12980, 7,80-8,08°C para la 7953, 7,57-8,07°C para la 15951 y 7,35-7,93°C para la 15952, lo que indica que el efecto de la sal es independiente de la temperatura de tratamiento.

DISCUSIÓN

El cloruro sódico presente en el medio de crecimiento/recuperación ha resultado ser un agente eficaz para la inhibición de *B. stearothermophilus*, aunque la concentración que produce una inhibición total varía en relación con la cepa, tanto para los esporos no tratados como para aquellos que han sufrido un tratamiento térmico. En el primer caso, una de las cepas, la 7953, se vio inhibida con concentraciones de cloruro sódico en el medio a partir del 2%, resultados similares a los descritos por Briggs y Yazdany¹ para otra cepa diferente, la NCIB 8919. Sin embargo, las otras tres cepas ensayadas resultaron mucho menos afectadas por la presencia de NaCl, dado que fueron capaces de crecer incluso en presencia del 6,0% de sal. Aunque el efecto de la sal sobre los esporos que sobreviven a los tratamientos térmicos ha sido más estudiado^{1,3,4,6,7,11}, tampoco se ha llegado a establecer la concentración de sal necesaria para inhibir la recuperación de los mismos porque los diversos autores que han estudiado el tema, o bien han utilizado una única concentración de cloruro sódico en el medio o, en aquellos casos en los que se ha usado un amplio rango, los tratamientos han sido realizados a tiempo fijo, y, en la mayor parte de los casos, han utilizado una única cepa. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que, aunque existen diferencias entre las distintas cepas en cuanto a la sensibilidad frente al cloruro sódico en el medio de recuperación, en todos los casos concentraciones entre el 2,0 y el 4,0% inhibieron el crecimiento de los esporos tratados.

El descenso que la presencia de sal en el medio de recuperación causa sobre los valores D, en torno a un 50% con tan sólo un 2% de sal, resulta bastante importante, aunque en ocasiones se ha encontrado una mayor reducción en los valores D₁₂₁ obtenidos para una de las cepas estudiadas, la 12980⁶, incluso habiendo utilizado concentraciones de sal inferiores, del 0,5 y 0,9%. Por tanto, y a pesar de que otros factores, como las condiciones de obtención de los esporos o de recuperación de los mismos pueden influir sobre la magnitud del efecto causado por la sal, se podría llegar a concluir que la presencia de este compuesto constituye un factor de gran importancia en el control de la alteración causada por *B. stearothermophilus* en los alimentos enlatados y, dado que concentraciones del 2% de sal o superiores son habituales en la mayoría de las conservas, cabe esperar que en estas condiciones la supervivencia de este microorganismo sea mucho más baja que la habitualmente obtenida en medios de laboratorio con bajas concentraciones de sal, aunque existe la posibilidad de que al cabo de un determinado tiempo de almacenamiento se llegaran a reparar los daños subletales. Es interesante resaltar que la fuerte inhibición causada por la presencia de sal en el medio de recuperación resulta independiente del pH del medio de calentamiento⁷, por lo que seguidamente esta inhibición se producirá también en alimentos de distinta acidez.

Como ya se ha señalado, tan sólo Feeherry y col.⁴ estudiaron si el efecto de la sal era dependiente de la temperatura de tratamiento no llegando a aclarar este problema. Nuestros resultados, que confirman los obtenidos por los citados autores para la cepa 12980, ponen de manifiesto, tras la aplicación del correspondiente análisis estadístico, que los valores z calculados no se vieron afectados por la presencia de sal en ningún caso. El hecho de que el efecto de la sal resulte independiente de la tem-

peratura de tratamiento, indica que actuará como agente preventivo de la alteración, tanto en los tratamientos convencionales como en el rango UHT.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT, proyecto ALI 93-0239.

BIBLIOGRAFÍA

1. BRIGGS, A. y YAZDANY, S. (1970). Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 621-632.
2. CONDON, S., ARRIZUBIETA, M.J. y SALA, F.J. (1993). Microbial heat resistance determinations by the multipoints system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. *J. Microbiol. Meth.*, **18**, 357-366.
3. COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1969). The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, 96-102.
4. FEEHERRY, F.E., MUNSEY, D.T. y ROWLEY, D.B. (1987). Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 365-370.
5. IBARZ, P., PALOP, A., CONDON, S. y SALA, F.J. (1991). Adaptación de un contador automático de U.F.C. al recuento de placas densamente pobladas. *Libro de Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Microbiología*. pp. 159. Salamanca, España.
6. LABBE, R.G. (1979). Recovery of spores of *Bacillus stearothermophilus* from thermal injury. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 457-462.
7. LOPEZ, M., MAZAS, M., GONZALEZ, I. BERNARDO, A. y GONZALEZ, J. (1994). Effect of pH and sodium chloride on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **12**, 317-322.
8. LOPEZ, M., GONZALEZ, I., MAZAS, M. y BERNARDO, A. (1994). Efecto del contenido en calcio del medio de subcultivo sobre la recuperación de los esporos de *Bacillus stearothermophilus* tratados por el calor. *IX Congreso de Microbiología de los Alimentos*. p. 77. Lérida, España.
9. MCKENZIE, H.A. y DAWSON, R.M.C. (1969). pH, buffers and physiological media. En: *Data for biochemical research*. pp 475-508. R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot and K.M. Jones (Ed.). Oxford at the Clarendon Press, Oxford.
10. STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. (1960). *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill Book Company.
11. ZECHMAN, L.G. y PFLUGG, I.J. (1991) *Bacillus stearothermophilus* spore recovery altered by media concentration and formulation. *J. Food Sci.*, **56**, 1408-1414.

PRODUCCIÓN ANIMAL Y TECNOLOGÍA DEL ADN ANIMAL PRODUCTION AND DNA TECHNOLOGY

J.M. Castro*
H. Sandoval**

Palabras clave: Marcadores moleculares, animales transgénicos, bioreactores, ovino.
Key words: Molecular markers, transgenic animals, bioreactors, ovine.

SUMMARY

Current limits for the possible role of biotechnology in animal production seem to be advancing further than what is ethically acceptable. In all areas of animal production, modern molecular genetics techniques find application. This review is an overview of the potential of modern biotechnology in animal production with special focus in sheep and goat production traits and animal health.

RESUMEN

Los límites en la aplicación de la biotecnología en producción animal, parecen avanzar más allá de lo éticamente aceptable. Las modernas técnicas de Biología Molecular, están encontrando aplicación en todas las áreas de la producción animal. Esta revisión es una visión global del potencial que ofrece la moderna biotecnología en la Producción animal, con un énfasis especial en ganado ovino y caprino.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas tecnologías de Genética Molecular a la producción animal, se ha comenzado a aplicar en la presente década, y sin duda, será un tema cotidiano para un gran número de investigadores. Ya hoy en día, muchos de ellos, persiguen el aislamiento e identificación de marcadores de ADN que puedan estar asociados, o ligados a genes de importancia en producción o en la resistencia a enfermedades. Por este motivo se habla hoy de las técnicas "MAS", o selección asistida,

* Dpto. Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.

** Estación Agrícola Experimental. CSIC. León.

An. Fac. Vet. León. 1994-96, 39, 81-97