

FOTO 5.- Corte de testículo de rata de 90 días de edad y tiroidectomizado a los 30 días de vida. Células de Leydig normales y otras con núcleos densos. Vasos sanguíneos.

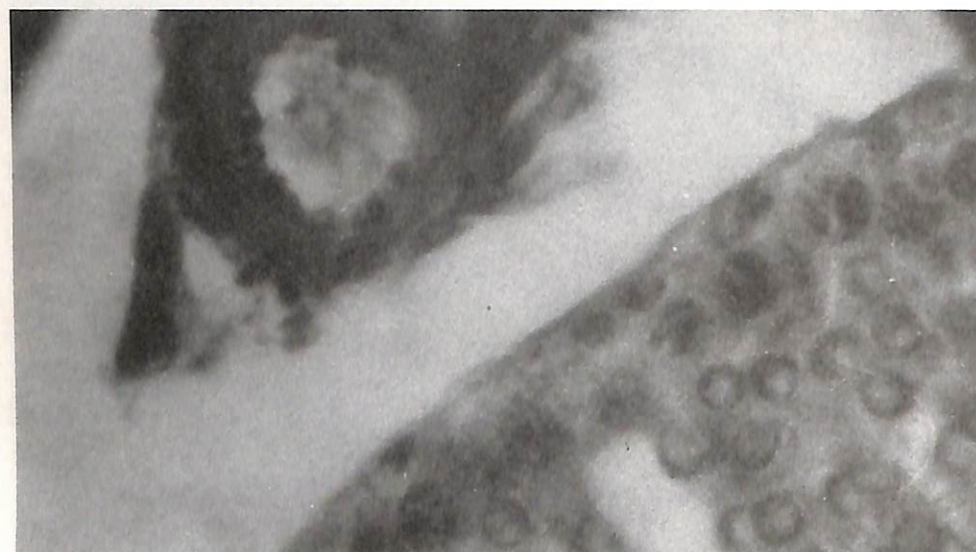


FOTO 6.- Corte de testículo de rata de 140 días tiroidectomizado a partir de los 28 días de vida. Degeneración nuclear. Citoplasma poco eosinófilo en células de Leydig. Amplio edema intersticial.

EFFECTOS DEL MEDIO DE RECUPERACION SOBRE LA RESPUESTA AL CALOR DE *Bacillus stearothermophilus*.

(EFFECTS OF RECOVERY MEDIA ON HEAT RESISTANCE OF *Bacillus stearothermophilus*).

I. González Martínez,*
M. López Fernández,*
A. Bernardo Alvarez,*
J. González Prieto,*
y R. Martín Sarmiento*

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, heat resistance.
Palabras clave: *Bacillus stearothermophilus*, termorresistencia.

SUMMARY

The effects of various recovery media: nutrient agar (NA), dextrose tryptone agar (DTA), antibiotic assay medium (AAM) and tripticase soy agar (TSA) on survival counts and D_T and z values of heat treated spores of *B. stearothermophilus* were studied. NA, DTA and AAM provided very similar results in recoveries, D_T and z , while, when TSA was used, a few higher z values and a 50% lower counts and D_T values were obtained.

The presence of sodium chloride in the plating media decreased the levels of recovery and D_T values. Failure of different lots of nutrient agar to support the growth of *B. stearothermophilus* was due to a calcium deficiency in the medium.

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia de varios medios de subcultivo: agar nutritivo (NA), medio de ensayo de antibióticos (AAM), agar dextrosa triptona (DTA) y agar tripticasa soja (TSA), con y sin almidón, sobre la respuesta al calor de *B. stearothermophilus*. Nuestros resultados indican que la utilización de NA, DTA ó AAM tiene poca influencia sobre la recuperación y sobre los valores D_T y z , mientras que con TSA se obtienen recuentos y valores D_T en torno a un 50% más bajos y un valor z algo más alto, lo que se debe a la presencia de cloruro sódico en este medio.

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

An. Fac. Vet. León. 1991, 37, 29-40

Se han estudiado también los efectos de la adición al agar nutritivo de cloruro sódico, calcio y otros cationes divalentes. El cloruro sódico resultó ser un eficaz inhibidor del crecimiento, mientras que la presencia de calcio lo favorece.

INTRODUCCION

Los esporos que sobreviven a los tratamientos térmicos sufren efectos subletales que se traducen generalmente en mayores requerimientos nutritivos, modificaciones de la temperatura óptima de incubación y un aumento en la sensibilidad a determinados inhibidores, por lo que las condiciones de recuperación pueden afectar significativamente al recuento de esporos supervivientes y, en consecuencia, a los valores obtenidos para los parámetros que definen su termorresistencia. En el caso de *B. stearothermophilus* resulta extremadamente importante definir las condiciones de subcultivo óptimas dado que, por su elevada termorresistencia, se utiliza frecuentemente como indicador biológico para evaluar los tratamientos de esterilización.

La revisión de los trabajos existentes sobre la evaluación de los medios de recuento para *Bacillus stearothermophilus* ^{5,11,13,14} pone de manifiesto que no hay acuerdo sobre cuál de ellos es más adecuado y, con frecuencia, existen contradicciones entre los resultados obtenidos por los diversos autores. Cook y Gilbert ⁵ al comparar el DTA, un medio frecuentemente recomendado en la recuperación de esporos de *B. stearothermophilus* tratados por el calor ^{9,10,15,17}, frente al AAM con almidón, concluyeron que este último resulta claramente superior. Labbe ¹¹ obtuvo resultados poco satisfactorios con DTA y TSA y peores aún con NA y recomendó el TSB-agar. Por el contrario, Mikolajcik y Rajkwski ¹⁴, comparando TSB-agar con DTA y TSA, encontraron que este último era el mejor de los probados.

Existe además alguna evidencia de que con medios de igual formulación, procedentes de distintas casas comerciales ^{5,16} se obtienen resultados distintos y, aunque algunos autores sugieren que este efecto puede ser debido a la presencia de cloruro sódico en el medio ¹¹, en otros casos ¹⁶ no parece ser ésta la causa.

Buena parte de las discrepancias entre los distintos autores al valorar los medios de recuento son debidas a la escasa precisión de las técnicas usadas con este fin. El propósito del presente trabajo fue comparar los medios recomendados más frecuentemente para la recuperación de esporos de *Bacillus stearothermophilus* y evaluar su posible efecto sobre los recuentos y los valores D obtenidos, empleando los sistemas puestos a punto en los últimos años por Condón y Sala ^{2,3}, que mejoran grandemente la fiabilidad de los datos.

Se ha comprobado también la influencia de los medios sobre los valores z obtenidos, problema éste que ha sido muy poco investigado. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la adición de almidón, cloruro sódico y diversos cationes.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos:

Se utilizó la cepa ATCC 12980 de *Bacillus stearothermophilus*. Se mantuvo liofilizada en ampollas de vidrio y antes de proceder a su utilización, fué sometida a varios pases en medio BHI incubando a 60° C durante 24 horas.

Medios:

Medio de esporulación. Se utilizó Agar Nutritivo (NA) (BIOLIFE) que contenía: extracto de carne, 3 g; peptona de carne, 5 g; agar, 15; agua destilada, 1 litro; suplementado con 0,001 g de Manganeso ($MnSO_4 \cdot 1.H_2O$).

Medios de recuperación: Se usaron los siguientes medios: Agar dextrosa triptona (DTA), agar tripticasa soja (TSA), medio de ensayo de antibiótico (AAM) y agar nutritivo (NA) cuya composición fué la siguiente:

DTA: triptona, 10 g (DIFCO); dextrosa, 5 g (OXOID); agar, 12 g (MERCK); agua destilada, 1 litro.

TSA (BIOLIFE): tripticasa, 15 g; peptona de soja, 5 g; ClNa, 5 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro. TSA sin cloruro sódico: tripticasa, 15 g (DIFCO), peptona de soja, 5 g (OXOID), agar, 15 g (MERCK).

AAM: peptona, 6 g (DIFCO); triptona, 4 g (DIFCO); extracto de levadura, 3 g (OXOID); lab lemco beef extract, 1,5 g (OXOID); dextrosa, 1 g (OXOID); agar, 15 g (MERCK); agua destilada, 1 litro.

NA (BIOLIFE ó DIFCO): extracto de carne, 3 g; peptona de carne, 5 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro.

Preparación de la suspensión de esporos:

Se sembraron frascos de Roux con un cultivo en caldo nutritivo de 24 horas de incubación a 60° C, procedente de una única colonia aislada por estría en NA e incubada a 60° C durante 24 horas. El grado de esporulación se determinó por recuento directo al microscopio, alcanzándose tras 19-22 horas de incubación una tasa del 60-65%.

Los esporos se recogieron por arrastre con perlas de vidrio y tampón Mc Ilvaine de pH 7,0, eliminándose los restos de agar y grandes agregados por centrifugación a 600 x G durante 5 minutos. La suspensión fué lavada y centrifugada a 2500 x G 15 minutos, al menos 4 veces. Posteriormente, se ajustó la concentración a 10^8 - 10^9 esporos/ml, por recuento en cámara de Thoma, y se almacenaron en el citado tampón a refrigeración hasta su uso.

Determinaciones de termorresistencia:

Se llevaron a cabo en un termorresistómetro TR-SC ² utilizando como medio de calentamiento tampón Mc Ilvaine pH 7,0 las temperaturas de tratamiento que se indican en cada experimento.

Incubación y recuento de supervivientes:

La incubación se realizó, durante 24 horas a 50° C tras una ligera desecación de las placas en una estufa de aire forzado a 50° C 30 minutos.

Los recuentos se efectuaron siguiendo el método descrito por Condón y Sala ³.

Determinaciones de los valores D_T y z:

Los valores D_T y z se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de la recta de regresión de las gráficas de supervivencia y termodestrucción, respectivamente.

La mayor parte de las gráficas de supervivencia obtenidas en la realización de este trabajo presentan hombros al comienzo del tratamiento, y alguna de ellas, pequeñas colas al final del mismo. Los hombros no se han tenido en cuenta a la hora de trazar las rectas y las colas se han suprimido de las figuras a fin de facilitar su comprensión.

La comparación de los valores z se realizó mediante el correspondiente test de paralelismo ¹⁸.

RESULTADOS

Influencia del medio de recuperación sobre los valores D_T y z .

Para la realización de este estudio se utilizaron los medios, NA, DTA, AAM, y TSA, con y sin la adición de un 0,1% de almidón a fin de comprobar su posible efecto favorable del que existen diversas referencias. Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en el rango de temperaturas de 118-131° C. Los valores D_T obtenidos se muestran en la tabla I. Puede comprobarse en la citada tabla que sólo al utilizar TSA se obtuvieron, en todos los casos, cifras claramente más bajas que con los demás medios, incluso después de prolongar el tiempo de incubación con este medio hasta 48 horas. En la tabla II figuran los valores z calculados a partir de los datos de la tabla I. La Figura 1 corresponde a las gráficas de supervivencia a 120° C con los diferentes medios utilizados.

Efectos del cloruro sódico.

A fin de comprobar si los bajos valores obtenidos con el TSA eran debidos a la presencia de cloruro sódico, que este medio incorpora como ingrediente al 0,5%, se añadió este compuesto a la misma concentración a los demás medios de subcultivo y se obtuvieron las correspondientes gráficas de supervivencia a 125° C. El resultado fue, no sólo un fuerte descenso en los recuentos, que quedaron reducidos a 1/4 ó 1/5 de los obtenidos en ausencia de la sal, sino también en los valores D_T (tabla III).

Para confirmar el efecto inhibitorio de este compuesto se llevó a cabo una experiencia añadiendo al NA concentraciones variables de cloruro sódico entre el 0-3% y obteniendo las correspondientes gráficas de supervivencia a 125° C (Fig. 2). Puede observarse que la adición de cloruro sódico al 0,25% disminuye ya sensiblemente los recuentos, que van sufriendo un descenso progresivo al aumentar la concentración de la sal hasta el 1,25%. En la figura 2 no se presentan los datos para concentraciones superiores a ésta, por ser la inhibición prácticamente total a partir de este nivel. En cuanto a los valores D_T , disminuyen ya claramente al añadir un 0,5% de sal, siendo máximo el descenso a un 1,25%, la concentración más alta a la que pudo estimarse (tabla IV).

Pudo también comprobarse que la eliminación del cloruro sódico del medio TSA dio lugar a un aumento en el valor D_{125} , que pasó a ser similar al obtenido con los demás medios en ausencia de sal. También aumentaron los recuentos, si bien éstos resultaron algo más bajos que con NA y AAM.

Efectos de los cationes divalentes.

Algunas de las partidas de agar empleadas dieron lugar a recuentos y valores D muy inferiores a los normales, efecto ya descrito en alguna ocasión por otros autores¹¹. Se ha sugerido que este fenómeno podría deberse a la presencia de cloruro sódico en tales partidas, pero al menos en nuestro caso, ha de descartarse esta causa puesto que los análisis de este componente revelaron que en ninguna ocasión su concentración era superior al 0,03%.

Se consideró entonces la posibilidad de que el origen del problema detectado radica-se en un insuficiente contenido en cationes divalentes en las partidas defectuosas, cuya influencia sobre la respuesta al calor de los esporos es bien conocida. Para estudiar este problema, se ensayó el efecto de la adición de diversos cationes divalentes (calcio, magnesio, manganeso a concentración de 100 ppm; hierro, cobre, cobalto y zinc a 20 ppm, todos ellos en forma de sulfato). Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 3, en la que puede verse que el Fe^{++} no modificó ni los recuentos ni el valor D , el Co^{++} , si algo, produjo un escaso aumento en la tasa de recuperación, el Mg^{++} , y en

menor medida, el Mn^{++} incrementaron ligeramente los recuentos, mientras que el Ca^{++} mejoró los recuentos y aumentó el valor D hasta un nivel que puede considerarse normal ($D_{125} = 0,46$ min). Por su parte, el zinc y el cobre produjeron una inhibición total (consecuentemente, no aparecen en la gráfica).

Para demostrar que la mejora observada al añadir sulfato cálcico era debida al Ca^{++} y no al sulfato, se adicionó el catión en forma de cloruro, a la misma concentración de 100 ppm. En la Figura 3 puede verse que el efecto logrado es, dentro del error experimental, idéntico.

Asimismo, se investigó la influencia del cloruro cálcico a la concentración del catión de 1000 ppm. El valor D_{125} resultó ser sensiblemente igual al obtenido con Cl_2Ca a 100 ppm, pero los recuentos disminuyeron aproximadamente a la mitad.

DISCUSION

Los resultados que hemos obtenido indican que existe poca o ninguna diferencia entre utilizar como medios de subcultivo NA, DTA ó AAM, tanto en la tasa de recuperación de los esporos como en los parámetros de termorresistencia calculados (valores D_T y z). La utilización del TSA da lugar a la obtención de recuentos y valores D_T en torno a un 50% más bajos, y un valor z de 8,5 frente a valores próximos a 7-7,5 obtenidos con los otros medios.

Cabría especular sobre la posibilidad de que los resultados obtenidos con TSA se debieran a diferencias en el pH ya que este medio presenta un pH claramente distinto, 7,3 frente a valores próximos a 6,8 de los otros medios, pero los datos existentes en la bibliografía^{4,5,13}, parece demostrar que 7,3 es el pH al que se obtienen recuentos y valores D_T más altos para los esporos de *Bacillus stearothermophilus* sometidos a tratamiento térmico. El peor rendimiento y los bajos valores D_T obtenidos con TSA se deben a la presencia en este medio de $ClNa$ al 0,5%, dado que la adición de este compuesto a la citada concentración a los otros medios produjo efectos similares y, por otra parte, al utilizar TSA exento de $ClNa$, tanto los recuentos como los valores D aumentan hasta niveles semejantes a los obtenidos con los distintos medios probados.

El efecto inhibitorio del cloruro sódico sobre los esporos de *B. stearothermophilus* tratados por el calor ha sido descrito en numerosas ocasiones^{6,11,19} aunque existe poca información sobre su influencia en los valores D y mucha menos sobre el valor z ⁸. En nuestro caso la inhibición se manifiesta a la concentración del 0,25%, muy inferior a la estimada por otros autores^{1,6,8} y es total a concentraciones superiores al 1,25%, resultados que parecen confirmar la sugerencia de algunos investigadores^{6,8} de que el cloruro sódico puede jugar un papel importante en el control de la alteración por bacterias termofílicas de alimentos enlatados.

Los bajos recuentos obtenidos al utilizar algunas partidas de NA deficientes en calcio concuerdan con los resultados descritos por Evancho y col.,⁷ que demuestran que concentraciones de calcio entre 30 y 50 ppm son, en general, necesarias para la recuperación de *B. stearothermophilus* tratados por el calor y que deficiencias en la concentración de calcio en los medios pueden ser responsables de los bajos niveles de recuperación obtenidos.

Sobre la base de nuestros resultados, no nos parece difícil encontrar explicación a las profundas discrepancias existentes entre las conclusiones a las que han llegado distintos investigadores al evaluar los medios de recuperación para *B. stearothermophilus*. En general no tienen en cuenta la posible presencia de activadores ó inhibidores^{5,7,11} que, de acuerdo con nuestros datos referidos al Ca^{++} y al $ClNa$, son responsables de las

mayores diferencias encontradas entre medios. Además, los tratamientos térmicos aplicados a los esporos en las experiencias llevadas a cabo por los diferentes investigadores suelen ser muy distintos, desde tan sólo 80° C durante 10 minutos ⁷ hasta 22 minutos a 121° C ¹¹; en estas condiciones, los daños subletales deben ser también muy diversos, por lo que no resulta posible comparar las conclusiones de unos autores con las de otros. Por último, no pocos de los datos experimentales son obtenidos por métodos inadecuados y de fiabilidad dudosa.

Nuestros resultados están en líneas generales de acuerdo con los de Mallidis y Scholefield ¹³, que no encuentran diferencias significativas ni en los recuentos ni en los valores D_T al utilizar AAM, DTA y TSA carente de cloruro sódico.

La adición de almidón al 0,1% mejora sensiblemente los recuentos en NA, DTA y AAM, lo que confirma los datos previos existentes ^{5,11,13}. Sin embargo, no produjo efectos apreciables sobre los valores D, a diferencia de lo observado por Mallidis y Scholefield ¹³ y Cook y Gilbert ⁵.

Los experimentos llevados a cabo durante la realización del presente trabajo, dieron como resultado un valor z para los esporos de *B. stearothermophilus* de 7,61 al utilizar como medio de subcultivo NA, 7,28 al emplear DTA y 7,76 con AAM, valores que caen dentro del rango en el que se encuentran los datos aportados por otros autores ^{8,12}. La comparación entre las pendientes de las correspondientes gráficas de termodestrucción mediante el test de paralelismo, revela que las diferencias entre estos datos no son estadísticamente significativas. El valor z calculado con TSA fué de 8,52, significativamente más alto, que el observado con NA ($p > 0,05$), con DTA ($p > 0,01$) y con AAM ($p > 0,05$). Aunque hemos realizado una cuidadosa revisión bibliográfica, no hemos encontrado referencias que comparen los valores z obtenidos en los medios ensayados por nosotros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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. Bact.* **33**, 621-632.
- 2) CONDON, S., LOPEZ, P., ORIA, R. y SALA, F.J. (1989). "Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer". *J. Food Sci.*, **54**, (2), 451-457.
- 3) CONDON, S., ORIA, R. y SALA, F.J. (1987). "Heat resistance of microorganisms: an improved method for survival counting". *J. Microbiol. Methods* (7), 37-44.
- 4) COOK, A.M. y BROWN, R.M.V. (1965). "Relationship between heat activation and percentage colony formation for *B. stearothermophilus* spores. Effect of storage and pH of the recovery medium". *J. Appl. Bact.* **28**, (3), 361-364.
- 5) COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1968). "Factors affecting the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on colony count of unheated and heated spores". *J. Food Technol.*, **3**, 285-293.
- 6) COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1969). "The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *B. stearothermophilus*". *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, (1), 96-102.
- 7) EVANCHO, G.M., ASTHON, D.H. y CORSON, C.M. (1974). "Effect of calcium supplementation of brom cresol purple broth on recovery counts of *B. stearothermophilus*". *J. Food Sci.*, **39**, 1161-1162.
- 8) FEEHERRY, F.E., MUNSEY, D.T. y ROWLEY, D.B. (1987). "Thermal inactivation and injury of *B. stearothermophilus* spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, (2), 365-370.
- 9) FIELDS, M.L. (1963). "Effect of heat on spores of rough and smooth variants of *B. stearothermophilus*". *Appl. Microbiol.*, **11**, 100-104.

- 10) HARNULV, B.G., JOHANSSON, M. y SNYGG, B.G. (1977). "Heat resistance of *B. stearothermophilus* spores at different Aw". *J. Food Sci.*, **42**, 91-93.
- 11) LABBE, R.G. (1979). "Recovery of spores of *Bacillus stearothermophilus* from thermal injury". *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 457-462.
- 12) MALLIDIS, C.G. y SCHOLEFIELD, J. (1985). "The release of dipicolinic acid during heating and its relation to the heat destruction of *B. stearothermophilus*". *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 479-486.
- 13) MALLIDIS, C.G. y SCHOLEFIELD, J. (1986). "Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*". *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 517-523.
- 14) MIKOLAJCIK, E.M. y RAJKOWSKI, K.J. (1980). "Simple technique to determine heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in fluid systems". *J. Food Protec.*, **43**, 799-804.
- 15) NAVANI, S.K., SCHOLEFIELD, J. y KIBBY, M.R. (1970). "A digital computer program for the statistical analysis of heat resistance data applied to *B. stearothermophilus* spores". *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 690-620.
- 16) PFLUG, I.J., GERALDINE, M., SMITH, M. y CHRISTENSEN, R. (1981). "Effect of soybean casein digest agar lot on number of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered". *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 226-230.
- 17) ROTMAN, Y. y FIELDS, M.L. (1969). "Chemical composition and heat resistance of *B. stearothermophilus* spores". *J. Food Sci.*, **34**, 345-349.
- 18) STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. (1960). "Principles and procedures of statistics". McGraw-Hill Company Inc. New York.
- 19) STUMBO, C.R. (1965). "Thermobacteriology in food processing". Academic Press Inc. New York.

TABLA I
Influencia del medio de recuperación sobre los valores D_T obtenidos para los esporos de *B. stearothermophilus*.

Medio	T.T. (° C)	D_T (min)	r_o
NA	118	4,59*	- 0,996**
NA + A*	118	4,59	- 0,992
DTA	118	4,52	- 0,996
DTA + A*	118	4,52	- 0,996
TSA	118	1,86	- 0,992
TSA + A*	118	2,38	- 0,994
NA	120	2,48*	- 0,996**
NA + A*	120	2,37	- 0,995
DTA	120	2,40	- 0,996
DTA + A*	120	2,48	- 0,996
AAM	120	1,73	- 0,996
AAM + A*	120	1,83	- 0,997
TSA	120	1,06	- 0,997
TSA + A*	120	1,05	- 0,994
NA	122	1,29*	- 0,999**
AN + A*	122	1,37	- 0,991
DTA	122	1,47	- 0,998
DTA + A*	122	1,22	- 0,992
TSA	122	0,73	- 0,992
TSA + A*	122	0,64	- 0,995
NA	125	0,57*	- 0,992**
NA + A*	125	0,60	- 0,992
DTA	125	0,52	- 0,997
DTA + A*	125	0,43	- 0,994
TSA	125	0,30	- 0,992
TSA + A*	125	0,33	- 0,997
NA	128	0,20*	- 0,993**
AN + A*	128	0,29	- 0,995
DTA	128	0,19	- 0,990
DTA + A*	128	0,17	- 0,990
TSA	128	0,14	- 0,992
TSA + A*	128	0,13	- 0,991
NA	131	0,094*	- 0,992**
NA + A*	131	0,102	- 0,987
DTA	131	0,066	- 0,991
DTA + A*	131	0,076	- 0,984
TSA	131	0,053	- 0,986
TSA + A*	131	0,061	- 0,992

* Con adición de almidón al 0,1%

** Media de dos experimentos

TABLA II
Influencia del medio de recuperación sobre los valores z obtenidos para los esporos de *B. stearothermophilus*.

Medio	z (° C)	r_o
NA	7,61	- 0,997
NA + A*	8,07	- 0,997
DTA	7,08	- 0,998
DTA + A*	7,19	- 0,999
AAM	7,76	- 0,998
TSA	8,51	- 0,999
TSA + A*	8,42	- 0,997

* Con adición de almidón al 0,1%.

TABLA III
Influencia del cloruro sódico sobre la respuesta al calor de los esporos de *B. stearothermophilus*. Temperatura de tratamiento: 125° C.

Medio	D_T (min)	r_o
NA	0,50	- 0,998
NA + 0,5% ClNa	0,31	- 0,994
DTA	0,52	- 0,997
DTA + 0,5% ClNa	0,36	- 0,997
AAM	0,46	- 0,992
AAM + 0,5% ClNa	0,30	- 0,994

TABLA IV
Influencia de la concentración de ClNa en el medio de subcultivo NA sobre los valores D_{125} obtenidos.

Concentración de ClNa (%)	D_T (min)	r_o
0	0,50	- 0,996
0,25	0,51	- 0,998
0,50	0,35	- 0,986
0,75	0,32	- 0,987
1	0,32	- 0,993
1,25	0,26	- 0,992

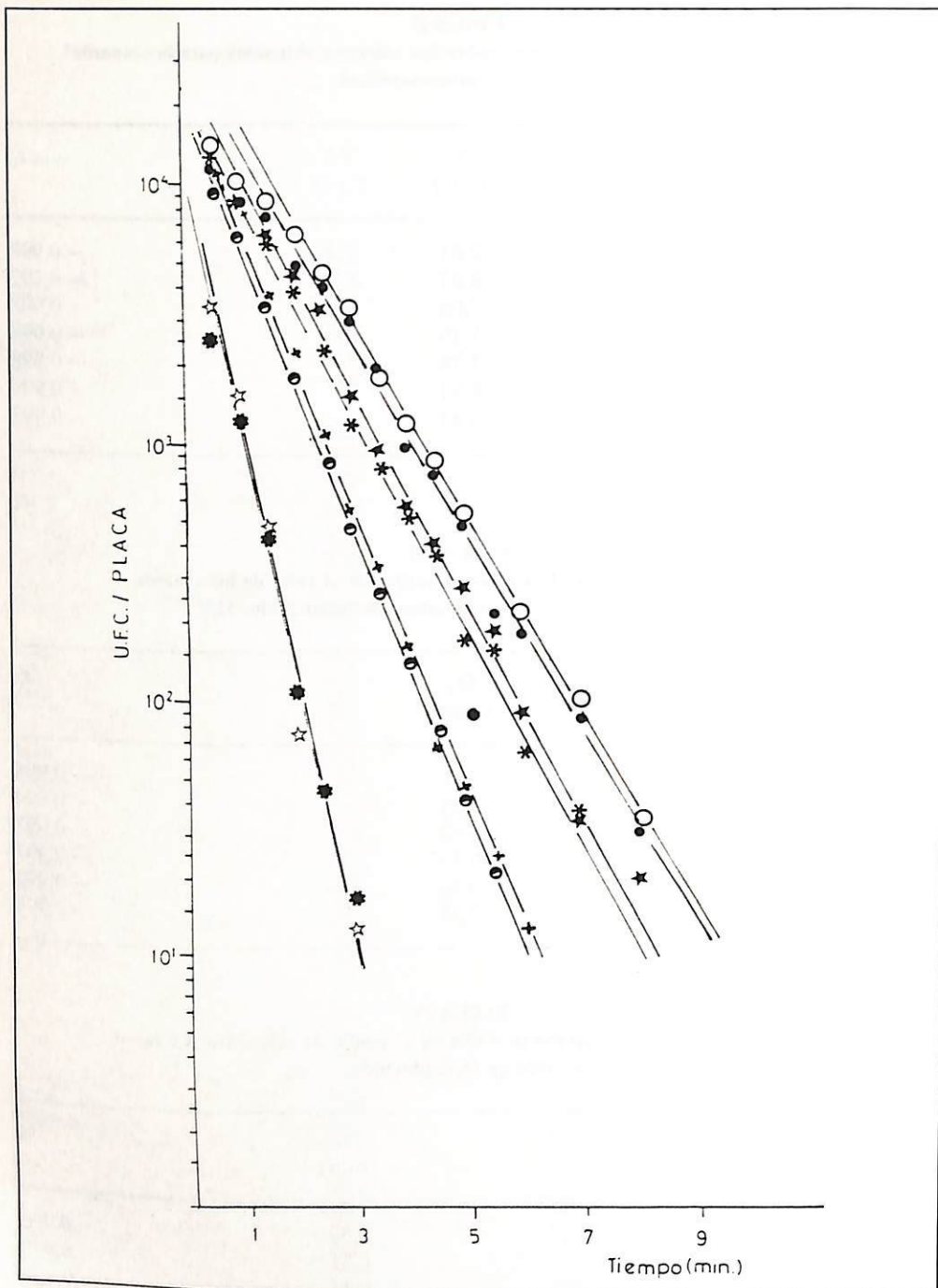


Fig. 1.- Influencia del medio de recuperación sobre la respuesta al calor de los esporos de *B. stearothermophilus*. Temperatura de tratamiento 120° C. (●) NA, (○) NA+A, (◐) AAM, (+) AAM+A, (*) DTA, (◑) DTA+A, (⊛) TSA, (⊙) TSA+A.

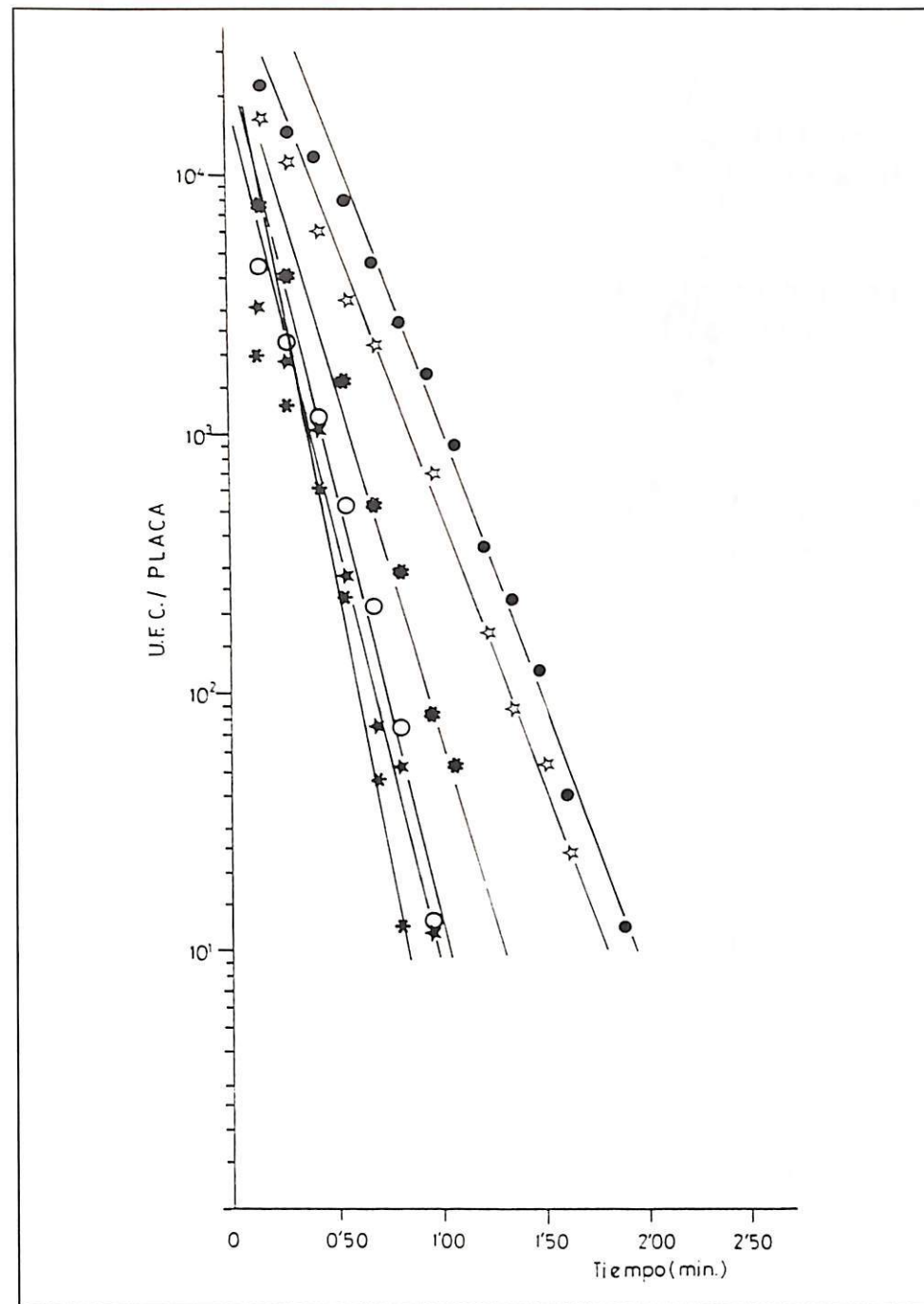


Fig. 2.- Influencia de la concentración de CNa sobre la respuesta al calor de los esporos de *B. stearothermophilus*. Temperatura de tratamiento: 125° C. (●) 0%, (⊛) 0,25%, (⊙) 0,5%, (○) 0,75%, (⊛) 1%, (⊙) 1,25%.

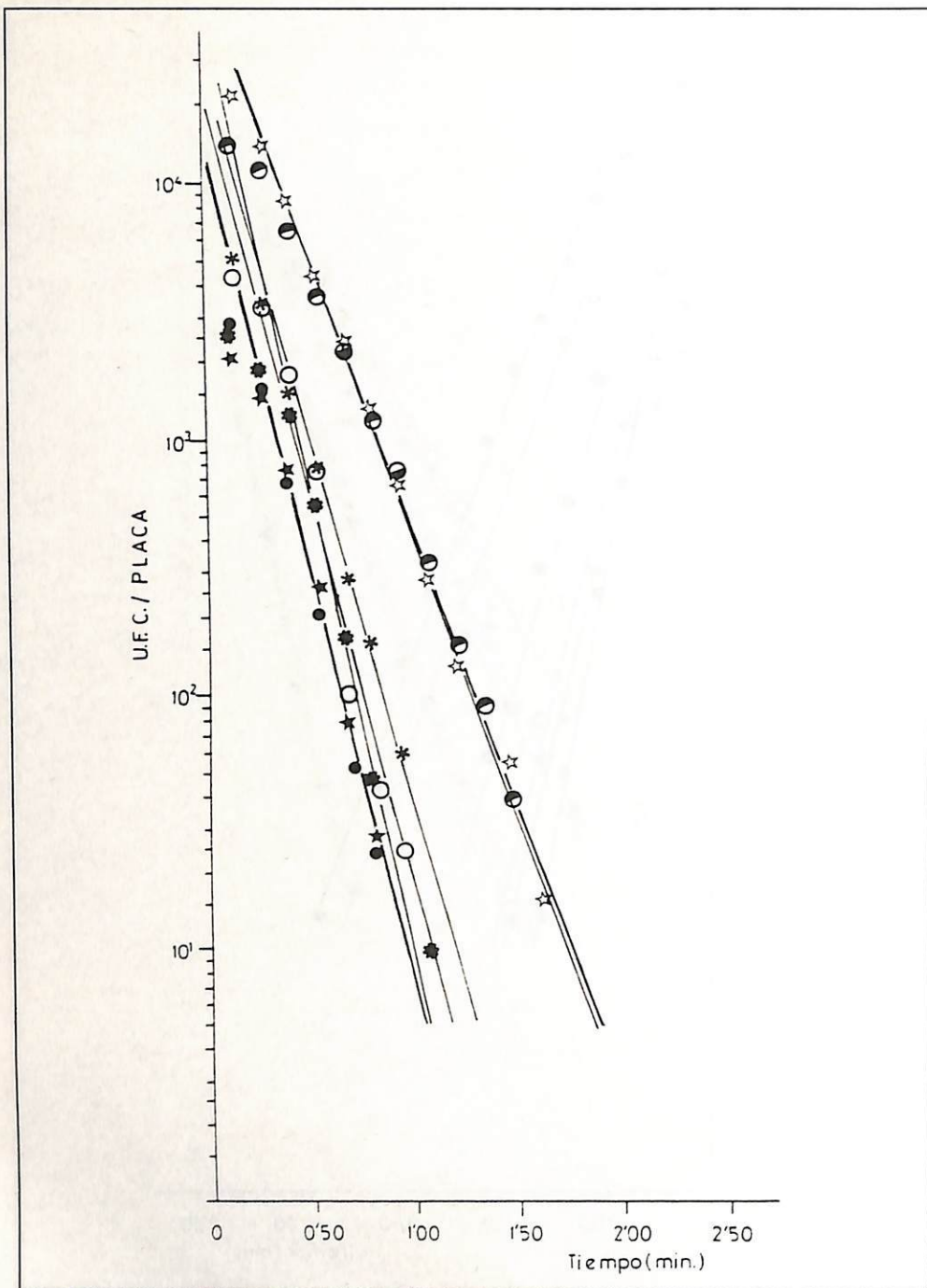


Fig. 3.- Influencia de la adición de diversos cationes a NA procedente de un lote con el que se habían obtenido bajos recuentos. Temperatura de tratamiento: 125° C. (●) sin cationes, (◐) 100 ppm de Ca⁺⁺, (○) 100 ppm de Mn⁺⁺, (*) 100 ppm de Mg⁺⁺, (⊗) 20 ppm de Co⁺⁺, (☆) 20 ppm de Fe⁺⁺ (todos ellos adicionados en forma de SO₄⁻²), (☆) 100 ppm de Ca⁺⁺ en forma de Cl₂Ca.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE SUBCULTIVO SOBRE EL COMPORTAMIENTO FRENTE AL CALOR DE LOS ESPOROS DE *Bacillus stearothermophilus*

(INFLUENCE OF RECOVERY TEMPERATURE ON HEAT RESISTANCE OF *Bacillus stearothermophilus* SPORES)

M. López Fernández,*
I. González Martínez,*
J. González Prieto,*
R. Martín Sarmiento,*
y A. Bernardo Alvarez*

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, heat resistance.
Palabras clave: *Bacillus stearothermophilus*, termorresistencia.

SUMMARY

The effects of recovery temperature (40-65° C) on the apparent behaviour of heat-treated spores of *Bacillus stearothermophilus* were studied using as plating media nutrient agar (NA), dextrose triptone agar (DTA) and antibiotic assay medium (AAM). Colony counts increased with temperature from 45 to 60° C.

D_T values obtained at 50-60° C were slightly higher than those at 65° C and 40-45° C. z values were not modified by incubation temperatures.

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia de la temperatura de incubación post-tratamiento sobre la respuesta al calor de *B. stearothermophilus* en el rango de 40 a 65° C utilizando como medios de recuperación agar nutritivo (NA), agar dextrosa triptona (DTA) y medio de ensayo de antibiótico (AAM). Los recuentos aumentaron, en todos los casos, con la temperatura de incubación hasta 60° C. Los valores D obtenidos incubando a 40-45° C y 65° C fueron ligeramente inferiores a los correspondientes al rango 50-60° C. El valor z no se vio modificado significativamente.

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.