



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIOS DE TERMORRESISTENCIA DE BACILLUS CEREUS EN ARROZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: CRISTIAN RODRIGO BASTIDAS NARVAES

TUTOR/A ACADEMICO: ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ

COTUTOR/A: MARÍA DOLORES RODRIGO ALIAGA

DIRECTOR EXPERIMENTAL: MARÍA ÚBEDA-MANZANARO CRESPO

Curso Académico: 2020-2021

VALENCIA, FECHA

Resumen

Bacillus cereus puede producir una toxiinfección alimentaria diarreaica o emética por medio de la producción de distintas toxinas. Las esporas de *B. cereus* se pueden encontrar comúnmente en productos con alto contenido en almidón como arroz y derivados, cereales y derivados, productos a base de carne, productos lácteos, especias y hierbas. En este estudio se determinó la termorresistencia de las esporas de *B. cereus* en una solución de arroz (cocido liofilizado) y el efecto del quitosano añadido en la termorresistencia de las esporas. Los capilares que contenían las soluciones de arroz inoculadas con esporas de *B. cereus*, tanto la solución control como la suplementada con quitosano de insecto a una concentración de 250 µg/mL, se sumergieron en un baño de agua a 80 °C para su activación, para luego ser sumergidos en un baño de aceite a 90, 95, 100 y 105 °C durante períodos de tiempo de exposición predeterminados. La siembra se realizó en profundidad y a partir del conteo de UFC de cada tratamiento realizado en diferentes diluciones se determinaron los ciclos de reducción logarítmicos y el valor D. La temperatura tuvo una alta incidencia para la reducción de esporas de *B. cereus*, siendo mucho más evidente en 100 y 105 °C donde los tiempos de tratamiento eran más cortos, pero donde se obtuvieron valores D mucho menores. La adición de quitosano tuvo incidencia en la reducción del valor D en 90 y 95 °C, pero en 100 y 105 °C su efecto no fue significativo.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, quitosano, termorresistencia, arroz.

Resum

Bacillus cereus pot produir una toxiinfecció alimentària diarreaica o emètica per mitjà de la producció de diferents toxines. Les espores de *B. cereus* es poden trobar comunament en productes amb alt contingut en midó com arròs i derivats, cereals i derivats, productes a base de carn, productes lactis, espècies i herbes. En aquest estudi es va determinar la termorresistencia de les espores de *B. cereus* en una solució d'arròs (bullit liofilitzat) i l'efecte del quitosano afegit en la termorresistencia de les espores. Els capil·lars que contenen les solucions d'arròs inoculades amb espores de *B. cereus*, tant la solució control com la suplementada amb quitosano d'insecte a una concentració de 250 µg/ml, es van submergir en un bany d'aigua a 80 °C per a la seua activació, per a després ser submergits en un bany d'oli a 90, 95, 100 i 105 °C durant períodes de temps d'exposició predeterminats. La sembra es va realitzar en profunditat i a partir del comptatge de UFC de cada tractament realitzat en diferents dilucions es van determinar els cicles de reducció logarítmics i el valor D. La temperatura va tindre una alta incidència per a la reducció d'espores de *B. cereus*, sent molt més evident en 100 i 105 °C on els temps de tractament eren més curts, però on es van obtindre valors D molt menors. L'addició de quitosano va tindre incidència en la reducció del valor D en 90 i 95 °C, però en 100 i 105 °C el seu efecte no va ser significatiu.

Paraules clau: *Bacillus cereus*, quitosano, termorresistencia, arròs.

Abstract

Bacillus cereus can cause diarrheal or emetic food poisoning through the production of various toxins. *B. cereus* spores can be commonly found in starchy products such as rice and rice products, cereals and cereal products, meat products, dairy products, spices and herbs. In this study, the heat resistance of *B. cereus* spores in a solution of rice (cooked freeze-dried) and the effect of added chitosan on spore heat resistance were determined. Capillaries containing rice solutions inoculated with *B. cereus* spores, both the control solution and the one supplemented with insect chitosan at a concentration of 250 µg/mL, were immersed in a water bath at 80 °C for activation, then immersed in an oil bath at 90, 95, 100 and 105 °C for predetermined exposure time periods. Seeding was performed in depth and from the CFU count of each treatment performed at different dilutions, the logarithmic reduction cycles and the D value were determined. Temperature had a high incidence for the reduction of *B. cereus* spores, being much more evident at 100 and 105 °C where the treatment times were shorter, but where much lower D values were obtained. The addition of chitosan had an effect on the reduction of the D value at 90 and 95 °C, but at 100 and 105 °C its effect was not significant.

Keywords: *Bacillus cereus*, chitosan, thermoresistance, rice.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz es el cereal más cultivado en el mundo y es el segundo de mayor consumo después de trigo. Presenta un pH cercano a 7 y está constituido por 79 % carbohidratos, 7 % proteína, 3 % fibra, 2 % grasa, vitaminas y minerales. Esta composición le permite actuar como un excelente medio de cultivo una vez se cocina y tiene la humedad suficiente. El gran consumo de este grano a nivel mundial es uno de los factores que favorece su implicación en brotes de origen alimentario. Uno de los patógenos más importantes ligado a este producto es *Bacillus cereus* (Coto et al., 2012).

Bacillus cereus pertenece a un género de bacterias gram-positivas, formadoras de endosporas y anaerobias facultativas. La resistencia de sus esporas a una serie de condiciones adversas ha dado lugar a una amplia distribución del organismo en la naturaleza. Se ha aislado en el aire, el suelo y el agua, así como en material animal y vegetal (Griffiths y Schraft, 2017).

B. cereus es una bacteria que puede ser un riesgo para la inocuidad alimentaria en productos alimenticios procesados, pasteurizados y otros productos alimenticios listos para su consumo (Juneja et al., 2019).

Las esporas de *B. cereus* se pueden encontrar con mucha frecuencia en productos a base de arroz, alimentos ricos en almidón, productos a base de carne cocida, cereales y productos a base de cereales, productos lácteos, especias y hierbas. *B. cereus* puede inducir una intoxicación alimentaria diarreica o emética a través de la producción de distintas toxinas (Griffiths y Schraft, 2017). La enfermedad diarreica es una infección y está producida por el crecimiento del microorganismo en el intestino delgado, mientras que la enfermedad emética es una intoxicación alimentaria al consumir alimentos que contengan la toxina cereulida, la cual es producida por el microorganismo durante su crecimiento en el alimento contaminado (Martin et al., 2019). *B. cereus* también puede causar infecciones sistémicas y locales en individuos inmunológicamente comprometidos y vulnerables (Griffiths y Schraft, 2017).

En 2018 estuvo relacionado con 98 brotes transmitidos por alimentos entre los países miembros de la Unión Europea, lo que representa un 1,9 % de los brotes ocurridos ese año. Un total de 1539 personas se vieron afectadas en estos brotes de los cuales 111 fueron hospitalizados y una falleció (EFSA y ECDC, 2019).

Se han descrito brotes causados por *B. cereus* en otros países, entre ellos un brote que afectó a 45 personas en un restaurante en Camberra (Australia) en 2018 (Thirkell et al., 2019), y en china en 2018 que afectó a 200 estudiantes en un colegio (Chen et al., 2018).

Los brotes de toxiinfecciones causadas por *B. cereus* se deben, en su mayoría, al consumo de arroz contaminado con esporas o células vegetativas (Gilbert et al., 1974). Cerca del 95 % de los casos de la enfermedad emética se deben al consumo de arroz (Hocking, 2003). En concreto se le relaciona con el consumo de arroz chino frito (Lake et al., 2004), debido a la preparación

de grandes cantidades de arroz hervido que almacenan en condiciones que permiten la germinación de las esporas que ha resistido al proceso de cocción y terminan de cocinar o recalientan en respuesta a la demanda de los clientes. Logísticamente es una práctica interesante, pero para que sea segura el alimento se ha de almacenar por debajo de 7 °C o por encima de 63 °C, temperaturas límite para la germinación de las esporas y crecimiento de las células vegetativas (Bilung et al., 2016).

Las células vegetativas de *B. cereus* no pueden crecer sobre el arroz crudo por la baja humedad del grano, sin embargo, pueden sobrevivir durante 48 semanas en temperaturas de refrigeración o en lugares secos. La viabilidad del patógeno se reduce hasta unas 16 semanas si se almacena a temperaturas superiores a 45 °C con una actividad de agua (a_w) = 0,78 (Jaquette y Beuchat. 1998).

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la viabilidad y desarrollo de los microorganismos, al producir una gran variedad de cambios estructurales y funcionales que pueden conllevar a un descenso progresivo en el número de células viables o su muerte tras una exposición prolongada a temperaturas por encima de la óptima. La termorresistencia de un microorganismo está determinada por su capacidad para soportar un tratamiento térmico máximo (Pérez-Chabela et al., 2016)

Las esporas de *B. cereus* tienen una resistencia al calor relativamente baja, sin embargo, son capaces de sobrevivir a los procesos de calentamiento utilizados en el procesamiento de alimentos, como la pasteurización (Christiansson, 2011).

Diversos estudios han demostrado una gran variabilidad en la resistencia térmica de las esporas dentro del grupo *B. cereus* (Choma et al., 2000; Fernández et al., 1999; Wijnands et al., 2005). Un gran estudio comparativo de cien cepas de *B. cereus* de diversas fuentes reveló que las cepas productoras de toxina emética tenían mayor resistencia al calor que las cepas diarreicas y ambientales (Carlin et al., 2006; Luu-Thi et al., 2014).

No solo la temperatura puede influir en la supervivencia de los microorganismos. Los antimicrobianos naturales se postulan como sustancias que pueden combinarse muy bien con otros procedimientos de conservación en lo que se llama tecnología de barreras. Uno de estos antimicrobianos que está alcanzando gran relevancia en los últimos años es el quitosano. Este producto es un polisacárido catiónico, compuesto principalmente de unidades de 2-desoxi-2-amino-D glucopiranososa con enlaces β -(1-4) (Han et al., 2010; Choi et al., 2016). Es un derivado de la quitina, el segundo polímero más abundante que se encuentra en la naturaleza después de la celulosa, y se obtiene por desacetilación de la misma en presencia de álcali (Xie et al., 2013; Bonilla et al., 2013). Los quitosanos suelen derivarse de la quitina, el principal componente estructural de los exoesqueletos de los crustáceos (Vårum y Smidsrød, 2005) e insectos (Mujtaba et al., 2019). Este material presenta como ventajas su bajo costo, baja toxicidad, biodegradabilidad y

biocompatibilidad (Han et al., 2010). Además, posee propiedades antimicrobianas contra hongos, algas y bacterias e incluso podría proteger a las plantas mediante la inducción de sus mecanismos de defensa innata (Rabea et al., 2003; Choi et al., 2016).

El objetivo del estudio es evaluar la termorresistencia de las esporas de *Bacillus cereus* en una matriz de arroz a diferentes temperaturas, tiempos de exposición y el efecto del quitosano en la termorresistencia de dichas esporas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Esporulación

La cepa de *Bacillus cereus* CECT 148 usada en este estudio procedió de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa se reactivó en caldo nutritivo en agitación por 24 h a 32 °C, posteriormente se inocularon 0.5 mL del cultivo de *Bacillus cereus* preparado anteriormente en 20 frascos Roux con ANF (Agar Nutritivo Fortificado) y se incubaron a 30 °C. Pasadas 48 horas se realizó una extensión en fresco sobre un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos para observar la proporción de esporas respecto a las células vegetativas de *Bacillus cereus* en el microscopio de contraste de fases, con objeto de controlar el porcentaje de esporulación que se iba alcanzando. Cuando la tasa de esporulación fue de aproximadamente el 90 %, se procedió a realizar la recolección de las esporas.

La recolección de esporas se realizó por medio de un asa de Digrafsky de metal modificada, barriendo suavemente la superficie del agar y realizando lavados de la superficie del agar con agua bidestilada. La solución recolectada se centrifugó a 2500 g por 15 minutos a 5 °C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 5 mL de agua bidestilada y se llevó a centrifugar nuevamente en las mismas condiciones previamente descritas. Este proceso se repitió 4 veces.

Finalmente, las esporas se almacenaron en suspensión de 100 mL de agua destilada a 4 °C (Imagen 1), quedando una concentración final del orden de 10^9 ufc/mL.



IMAGEN 1. Suspensión de esporas de *Bacillus cereus*

2.2 Preparación de soluciones de arroz

Se preparó una solución de arroz en agua destilada a una concentración del 2 % (p/v), a partir de arroz previamente cocido, liofilizado y molido. Para ello, se pesaron 0.4 g del preparado de arroz y se resuspendió en 19 mL de agua destilada. Después de esterilizar el preparado en el autoclave, se le añadió 1 mL de la solución de esporas (previamente agitada durante 30 minutos en una placa orbital), completando un volumen final de 20 mL, y se agitó en vortex para homogeneizar la solución.



IMAGEN 2. Arroz cocido liofilizado y solución de arroz

La solución de arroz + quitosano, compuesta de arroz al 2 % (p/v) y una concentración de quitosano de insecto (procedente de *Tenebrio molitor*, MealFood Europe, S. L. Salamanca, España) de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se preparó de la siguiente forma: se pesaron 0.4 g del preparado de arroz y se resuspendió en 18.194 mL de agua destilada. Este preparado se esterilizó en autoclave y después se le adicionó 500 μL de una solución de quitosano de insecto al 1 % (p/v) en ácido acético al 1 % (v/v), más 306 μL de NaOH al 1 % para ajustar el pH entre 6.8 y 6.9. Finalmente, se le adicionó 1 mL de la solución de esporas, completando así un volumen de 20 mL y se homogeneizó por agitación. La concentración inicial de esporas en las soluciones de arroz fue de 10^8 ufc/mL

2.3 Tratamiento de termorresistencia

2.3.1 Llenado de capilares

En este estudio se utilizaron capilares de vidrio cerrados por un extremo de dimensiones 1,50 x 2,00 x 100 mm (Vitrex, ref. 217913. Imagen 2). El llenado de los capilares para el estudio de termo resistencia, se llevó a cabo utilizando una cámara-desechado con bomba de vacío (Imagen 3), dentro de una cabina de bioseguridad. Los capilares estériles se sujetaron con una goma elástica al gancho de la cámara-desechado, con el extremo cerrado hacia arriba. En la base, se situó un vaso de precipitado de 50 mL con los 20 mL de la disolución de arroz y esporas. Los capilares se mantienen con el gancho en

una posición elevada por encima del vaso para que no estén en contacto con la disolución. A continuación, se activó la bomba de vacío y se hace vacío en el interior de la cámara-desechado. Una vez conseguido el vacío, se bajaron los capilares con el gancho y se introdujeron en la solución de arroz (Imagen 4). A continuación, se rompió el vacío con la válvula de la tapa para hacer subir la solución de arroz por los capilares, los cuales se llenaron hasta un volumen de 2/3 de su capacidad, se cerró la válvula, se subieron los capilares, hasta quedar fuera de la solución de arroz y se volvió a abrir la válvula para que subiera un poco la solución de arroz y así centrar la columna de líquido en el capilar. Para cerrar la otra abertura de los capilares, se usó silicona de secado rápido y se dejó secar durante 30 minutos.



IMAGEN 1. Capilares



2. IMAGEN 3. Cámara-desechado con bomba de vacío



IMAGEN 4. Llenado de capilares

2.3.2 Activación de esporas

Antes de cualquier estudio de termo resistencia con esporas es necesario activarlas con calor para que estén en condiciones de germinar y crecer en el medio de cultivo. Para la activación de las esporas de *B. cereus*, los capilares se colocaron en unas gradillas con gancho diseñadas para este tipo de estudio (Imagen 5). Los capilares se distribuyeron de forma homogénea en cada gradilla para la activación de las esporas por calor. Las gradillas con los capilares se sumergieron en baño de agua (HAAKE N3) a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 10 minutos (Imagen 6).



IMAGEN 5. Gradillas de capilares diseñadas

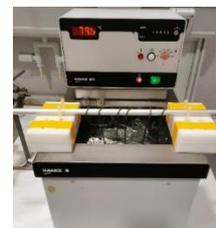


IMAGEN 6. Baño de agua, HAAKE N3

2.3.3 Tratamiento térmico

Se realizó el tratamiento térmico de la solución de arroz y solución de arroz + quitosano a 90, 95, 100 y 105 °C a diferentes tiempos de exposición (tabla 1)., Para este tratamiento se utilizó un baño de aceite de silicona (HAAKE DC5, Imagen 7).

TABLA 1. Temperatura y tiempo de exposición al tratamiento térmico

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
90	0, 10, 20, 30, 40, 50
95	0, 2, 4, 7, 10, 12
100	0, 0.5, 1, 2, 3, 5
105	0, 0.5, 1, 1.5, 2.5



IMAGEN 7. Baño de aceite, HAAKE DC5

Para el tiempo 0 (t_0) de cualquier temperatura de tratamiento, se tomó una gradilla de capilares después de la activación de las esporas y no se trató térmicamente.

El resto de las gradillas se llevaron inmediatamente al baño de aceite, el cual estaba listo con la temperatura determinada para cada ensayo. A partir de ese momento, se procedió a contabilizar el tiempo de exposición sacando una gradilla en el tiempo determinado. Los capilares extraídos se introdujeron en un baño con hielo (Imagen 8) para detener el efecto de la temperatura en las esporas de *Bacillus cereus*.



IMAGEN 8. Baño de hielo con gradillas y capilares

El procedimiento descrito anteriormente se realizó para todas las temperaturas en los tiempos establecidos y para las dos soluciones de arroz utilizadas (arroz y arroz + quitosano).

2.4 Siembra

Para la siembra en profundidad, los capilares se limpiaron con etanol al 96 %, y con la ayuda de una pinza se partieron los extremos para la extracción de la solución (entre 5-8 capilares, para tener un volumen de 700 μL aproximadamente), que se depositó en tubos Eppendorf estériles. Con la solución recuperada de los capilares se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} por duplicado (serie A y serie B). De cada solución decimal se sembraron 100 μL en profundidad en agar nutritivo enriquecido con almidón 1 g/L y se incubaron durante 18 - 20 horas a 30 °C (Imagen 9). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento manual de colonias de *Bacillus cereus* (Imagen 9).



IMAGEN 9. Siembra en profundidad y recuento manual de colonias de *Bacillus cereus*

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el Software Statgraphics Centurion XVI (Addinsoft SARL, Nueva York, NY, EE.UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tratamiento térmico de las esporas en arroz

La figura 1 muestra las curvas de supervivencia para las esporas de *Bacillus cereus* tratadas a diferentes temperaturas.

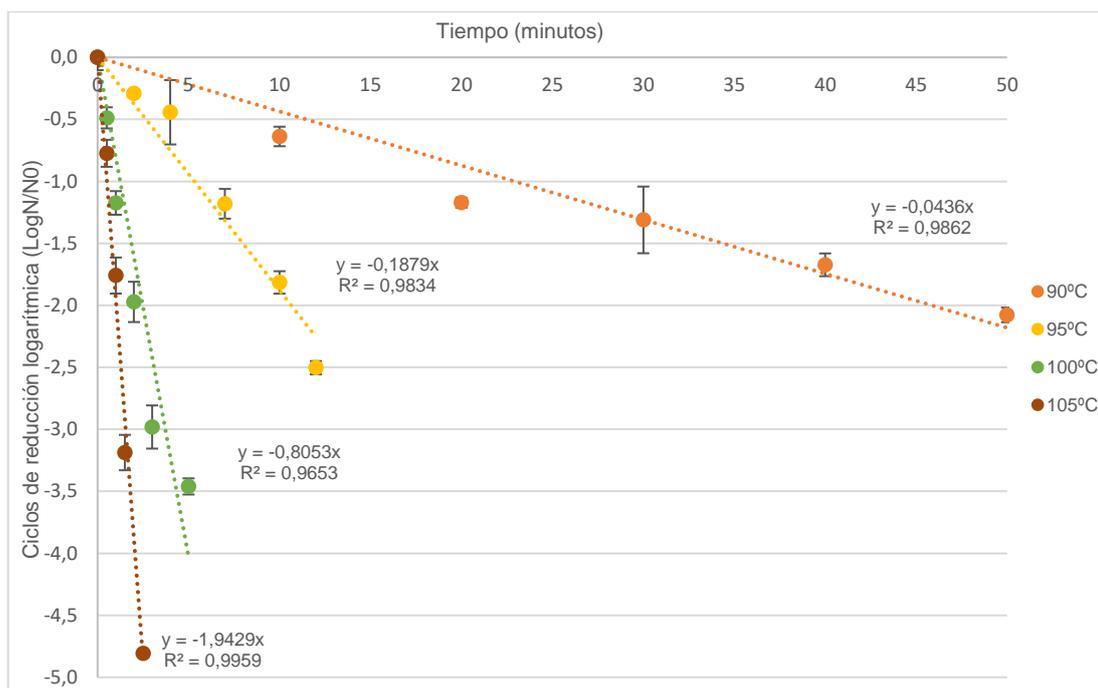


Figura 1. Curvas de supervivencia de esporas de *Bacillus cereus* en arroz tras un tratamiento de termorresistencia a 90, 95, 100 y 105 °C.

Como se puede observar en la figura 1, al aumentar la temperatura de tratamiento aumenta la muerte de esporas expresada como el logaritmo de fracción de supervivientes ($\text{Log}_{10}(N/N_0)$). El tratamiento en el que mayor reducción se produjo fue el de 105 °C por 2,5 minutos, con el que se alcanzaron 4,8 ciclos de reducción, muy cercano a los 5 ciclos logarítmicos recomendados para los procesos mínimos de cocción.

En todos los casos se obtienen relaciones lineales entre el tiempo de tratamiento y la temperatura, por lo que se puede aplicar el modelo de Bigelow (Mafart y Leguerine, 1998) para deducir las constantes cinéticas D y z que definen cada curva de inactivación.

En la tabla 2, se observan los valores D y z, constantes cinéticas de inactivación para el estudio de termorresistencia.

TABLA 2. Valores D y z de termorresistencia

Quitosano ($\mu\text{g/mL}$)	Temperatura °C	Valor D (minutos) \pm SD	Valor z °C
0	90	22,91 \pm 0,11 ^{a, A}	8,97
0	95	5,32 \pm 0,06 ^{b, A}	
0	100	1,21 \pm 0,13 ^{c, A}	
0	105	0,52 \pm 0,02 ^{d, A}	

250	90	17,75 ± 0,76 ^{a, B}	8,89
250	95	3,34 ± 0,01 ^{b, B}	
250	100	1,03 ± 0,05 ^{c, A}	
250	105	0,35 ± 0,08 ^{c, A}	

*Diferencia en el valor del superíndice en minúscula para una misma concentración de quitosano, indica, diferencia significativa (Valor-P < 0,05) entre temperaturas.
*Diferencia en el valor del superíndice en mayúscula para una misma temperatura, indica, diferencia significativa (Valor-P < 0,05) entre concentraciones de quitosano.

3.2 Tratamiento térmico de las esporas en arroz con quitosano

En la figura 2 se observan las curvas de supervivencia para las esporas de *Bacillus cereus* en un medio con una concentración de quitosano de 250 µL/mL a las distintas temperaturas de tratamiento. Como ocurrió en el caso de las curvas de supervivencia en arroz, al aumentar la temperatura de tratamiento aumenta la muerte de esporas expresada como el logaritmo decimal de la fracción de supervivientes ((Log₁₀(N/N₀)).

Las curvas de supervivencia se ajustaron a una ecuación de primer orden por lo que se pudo aplicar el modelo de Bigelow (Mafart y Leguerine, 1998) para obtener las constantes cinéticas D y z.

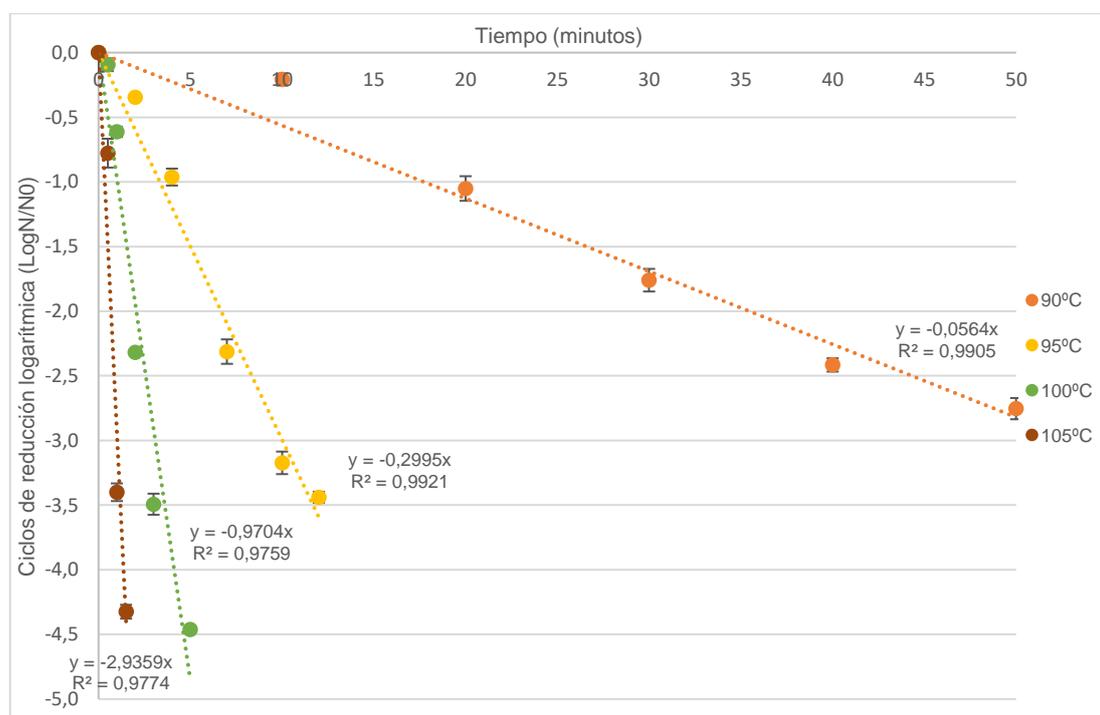


Figura 2. Curvas de supervivencia de esporas de *Bacillus cereus* en arroz con quitosano (250 µL/mL) tras un tratamiento de termorresistencia a 90, 95, 100 y 105 °C.

El tratamiento en el que mayor reducción se produjo fue el de 105 °C por 2,5 minutos, con el que se alcanzaron 4,32 ciclos de reducción, muy cercano a los 5 ciclos logarítmicos recomendados para los procesos mínimos de cocción.

En la tabla 2, se describen también los valores D y z, constantes cinéticas de inactivación para el estudio de termorresistencia más quitosano.

3.3 Análisis estadístico

3.3.1 ANOVA multifactorial con factor temperatura para los valores D en arroz y en arroz con quitosano

A partir de las rectas de regresión se obtuvieron los valores D (tabla 2), de reducción decimal para cada temperatura del estudio. Con estos datos se llevó a cabo un análisis de varianza multifactorial, y de esta forma determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el Valor D.

En la tabla 3, se observa el análisis de varianza del Valor D, teniendo como factor la temperatura.

TABLA 3. Análisis de Varianza para los valores de D en arroz

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A: temperatura	724,426	3	241,475	20420,75	0,0000
Residuos	0,07095	6	0,011825		
Total (corregido)	724,497	9			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Teniendo en cuenta que el valor P de la temperatura obtenido de análisis de varianza es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el valor D con un 95,0 % de nivel de confianza.

Para determinar entre qué temperaturas los valores D eran significativamente diferentes se llevó a cabo un análisis de múltiple rango.

En la tabla 4 se observan los resultados de las pruebas de múltiple rango para el valor D por la temperatura, para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

TABLA 4. Pruebas de Múltiple Rangos para D por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
105	2	0,515	0,0768928	X
100	4	1,205	0,0543714	X
95	2	5,32	0,0768928	X
90	2	22,91	0,0768928	X

Como se puede observar en la tabla 4, no existen grupos homogéneos, por lo cual, nos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas de tratamiento con un nivel del 95,0 %.

En la tabla 5, se observa el análisis de varianza del Valor D para las muestras que se han tratado en presencia de quitosano, teniendo como factor la temperatura.

TABLA 5. Análisis de Varianza para los valores de D en arroz con quitosano

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Temperatura	426,588	3	142,196	1206,76	0,0000
Residuos	0,589167	5	0,117833		
Total (corregido)	427,177	8			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Teniendo en cuenta que el valor P de la temperatura con la variable quitosano obtenido de análisis de varianza es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el valor D con un 95,0% de nivel de confianza.

Como en el caso anterior, para determinar entre qué temperaturas los valores D eran significativamente diferentes se llevó a cabo un análisis de múltiple rango

En la tabla 6 se observan los resultados de las pruebas de múltiple rango para el Valor-D por la temperatura para arroz con quitosano, para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

TABLA 6. Pruebas de Múltiple Rangos para D por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
105	3	0,353333	0,198186	X
100	2	1,035	0,242728	X

95	2	3,34	0,242728	X
90	2	17,745	0,242728	X

Como se observa en la tabla 6, solo existen grupos homogéneos entre las temperaturas de 100 Y 105 °C, los cual no muestra que entre estas temperaturas con la adición de quitosano no hay diferencia significativa. Sin embargo, entre las temperaturas de 90, 95 y 100 °C más quitosano, no hay grupos homogéneos, por lo cual, en los términos anteriormente descritos existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0%.

3.3.2 Regresión múltiple para Valor D

En la tabla 2 se muestran los tiempos de reducción decimal (valor D) obtenidos para cada temperatura y concentración de quitosano. El Valor D es el tiempo necesario para destruir el 90 % de la población microbiana de un determinado microorganismo a una temperatura dada (Lee y Kaletunc, 2002; Vasan et al., 2013).

En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza realizado teniendo en cuenta los valores D.

TABLA 7. Análisis de Varianza del Valor-D

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	402,591	2	201,295	7,39	0,0321
Residuo	136,103	5	27,2206		
Total (Corr.)	538,693	7			

El resultado del modelo ajustado de regresión lineal múltiple para describir la relación entre Valor-D y las 2 variables independientes (temperatura y quitosano), nos entrega la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Valor } D = 130,135 - 1,2579 * X - 0,00749 * Y$$

donde: X = temperatura; Y = concentración de Quitosano

Dado que el valor P del modelo descrito en la tabla 7 del análisis de varianza ANOVA es menor que 0,05, se puede concluir que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0 %.

La figura 3 nos muestra la superficie de respuesta a partir de la ecuación del modelo ajustado obtenida de la regresión lineal múltiple para el valor D y su relación con las variables temperatura y quitosano. Donde apreciamos la pendiente marcada de la variabilidad del valor D con respecto a la variación en la temperatura y la variación de la pendiente del valor D con respecto a la temperatura y concentración de quitosano.

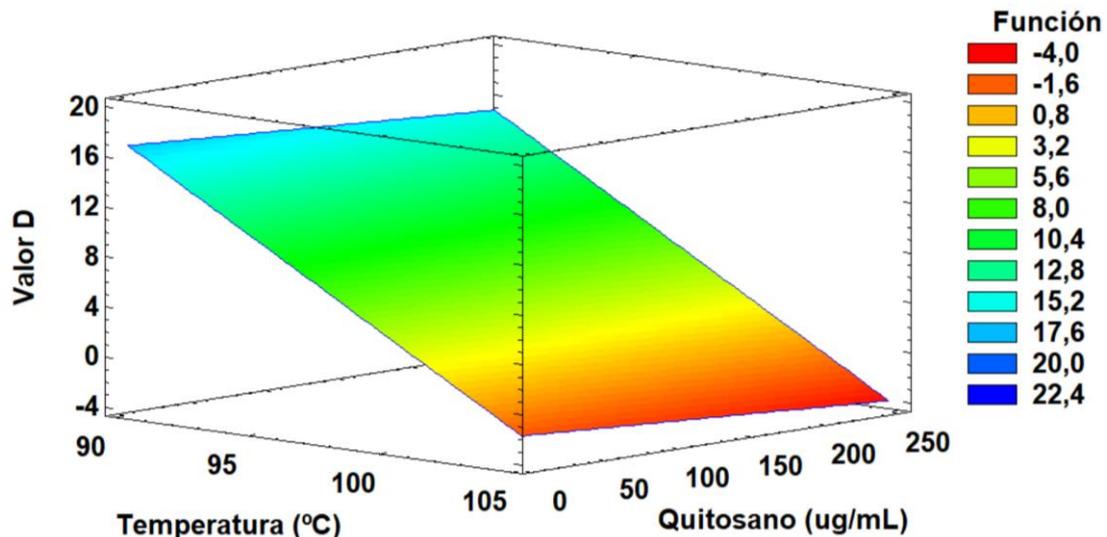


Figura 3. Superficie de respuesta del modelo ajustado del Valor D.

3.4 Discusión

Con respecto al quitosano es importante señalar que aun siendo cierto que para las temperaturas más altas (100 y 105 °C) de esta experimentación no hubo diferencia significativa alguna en la adición o no de quitosano, si tenemos en cuenta las temperaturas más bajas (90 y 95 °C), si se evidenció diferencia estadísticamente significativa en el uso de quitosano para el tratamiento. Por lo cual se podría trabajar con quitosano en dichas temperaturas donde si se evidenció eficiencia del tratamiento y evaluar tratamientos a mayores tiempos de exposición.

En el presente estudio, los resultados hacen evidente la incidencia directa de la temperatura sobre la supervivencia de la esporas, como ha sido descrito en otros estudios donde se ha establecido que el calentamiento a temperaturas más altas condujo a una penetración más rápida del calor y al hecho de que la inactivación de patógenos en los alimentos es una función del tiempo y la temperatura; los miembros sensibles de la población de esporas son destruidos a un ritmo relativamente más rápido (Bozkurt H, et al., 2013).

Al realizar la evaluación de resultados obtenidos en este estudio con respecto al valor D obtenido en los diferentes tratamientos realizados para

evaluar la termorresistencia de las esporas de *Bacillus cereus*, miramos que, generalmente, están dentro de los resultados ya publicados en artículos científicos. Se han publicado varios resultados a 95 °C del valor D en diferentes matrices. En leche se han publicado valores D a 95 °C entre 1.8 – 19.1 y de 2.7 – 15.3 para la formula infantil (Griffiths, 2010). Laurent Y, et al. (1999) reportaron valores D a 95 °C entre 8,23 – 8,43 en agua y de 11,54 a 29,52 en caldo de sal triptona (Leguerinel, I. et al., 2005).

El valor D también depende del tipo de cepa con la que se realice el estudio, como lo reportaron Hayrapetyan, H., et al. (2016) donde las esporas de la cepa ATCC 10987 con un Valor D de 19 a 95 °C mostraron una mayor resistencia al calor en comparación con la cepa NIZO 4080 que tuvo un valor D de 9 en igual temperatura. En otro estudio se evaluó la termorresistencia de 39 cepas de *B. cereus* de diferentes grupos filogenéticos y reportaron una correlación positiva entre la resistencia al calor de las esporas y las temperaturas de crecimiento de las cepas (Luu-Thi et al., 2014).

Los procesos de calentamiento empleados y las diferencias en la metodología utilizada para determinar la termorresistencia de las esporas de *Bacillus cereus* pueden haber contribuido a las diferencias entre los valores D obtenidos en el presente estudio y los que se pueden encontrar en la literatura científica. Otras posibles explicaciones para las diferencias en los valores D obtenidos en este estudio y los valores D publicados en diversos artículos de investigación, se pueden atribuir a varios factores extrínsecos e intrínsecos que se sabe que hacen que el patógeno sea más sensible o resistente al efecto letal del calor. También contribuyen a las diferencias la variabilidad de las sensibilidades a la letalidad por calor en la población de esporas, el medio de esporulación y la temperatura utilizados para la producción de esporas, la exposición previa al calor, al ácido, al frío o a otras tensiones, la composición y el pH del disolvente de calentamiento, la fijación de las esporas al disolvente de calentamiento, el medio de siembra y la presencia o ausencia de lisozima en el medio, y las condiciones de incubación (tiempo/temperatura) para la recuperación de las esporas sobrevivientes (Coroller L., et al., 2001; Juneja, 2002; Faille et al., 1997).

A partir de los valores de D obtenidos en la tabla 2 es posible concluir que un tratamiento convencional de cocción del arroz (95-100 °C, durante 12-17 min) puede no ser suficiente para inactivar la población total de esporas de *B. cereus* que puedan contaminar una matriz de arroz. Por ello, es necesario la aplicación de medidas adicionales de control (temperatura de refrigeración, adición de antimicrobianos, etc) para garantizar la inocuidad microbiana de los productos derivados del arroz.

La influencia del quitosano en la termorresistencia de las esporas de *B. cereus* fue significativa, permitiendo reducir los valores D de 22,91 a 17,75 min para 90 °C y de 5,32 min a 3,34 min a 95 °C. Estas reducciones de los valores D, también ha sido descritas en otros estudios (Tsai et al., 2006). Estos autores indicaron que en presencia de 80 ppm de LMWC (quitosano de bajo peso molecular) y quitosano (95 % desacetilación), con pH 6 y 7, los valores

D a 90 °C disminuyeron desde 7,47 y 10,17 min a 4,68 a 7,91 min, respectivamente. Los valores D a 100 °C de estas esporas disminuyeron desde 1,95 y 2,56 min en los controles a 0,89 a 0,93 y 0,72 a 0,80 min tras la adición de 80 ppm de LMWC y quitosano (95 % desacetilación) respectivamente (Tsai et al., 2006).

Con respecto a los valores D a 100 y 105 °C en arroz con quitosano, resultados que no fueron significativamente diferentes en comparación con el solo uso de la temperatura, surgen varias hipótesis; una de ellas es que a 100 y 105 °C el efecto de la temperatura sea de tal magnitud que la acción del quitosano pierda toda relevancia. Lo que también podría suceder, es que a esas temperaturas surjan reacciones químicas entre el quitosano y los componentes de la solución, lo cual podría disminuir su acción conjunta con la temperatura.

Respecto a los valores de z, estudios anteriormente publicados, obtuvieron resultados que concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio. Han sido reportados valores z de 8,62 a 12,45 °C en agua destilada (Laurent et al., 1999) y de 7,18 a 8,53 °C en tampón (González et al., 1999).

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos inciden directamente en la inactivación de las esporas de *Bacillus cereus*, como se pudo comprobar en este estudio. A mayor temperatura, se observa mayor inactivación de esporas y se reduce el tiempo de exposición para alcanzar la misma inactivación.

La adición de quitosano al tratamiento de termorresistencia de las esporas de *Bacillus cereus* tuvo un efecto significativo, ya que aumento la inactivación de las esporas para las temperaturas de 90 y 95 °C; sin embargo, el efecto no fue el mismo para 100 y 105 °C donde no hubo una diferencia significativa con respecto al tratamiento sin quitosano.

Las condiciones de cocción del arroz (95-100 °C durante 12-17 min) pueden no ser capaces de inactivar totalmente las esporas que puedan contaminar matrices como el arroz. El uso de aditivos antimicrobianos, conservantes naturales, como el quitosano, tienen un efecto positivo en la inactivación de esporas a menores temperaturas, lo cual supondría un menor gasto energético sin condicionar la calidad sensorial por el uso de temperaturas elevadas.

REFERENCIAS

- Bilung, L. M., Tahar, A. S., Shze, T. P., Jamie, S. V. F. A., Hashim, H. F., Apun, K., & Radu, S. (2016). Enumeration and molecular detection of *Bacillus cereus* in local indigenous and imported rice grains. *Agriculture & food security*, 5(1). doi:10.1186/s40066-016-0074-4.
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H., & Davidson, P. M. (2013). Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection*, 76(1), 79-84. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-327
- Carlin, F., Guinebretiere, M.-H., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A., & Christophe Nguyen-the. (2000). Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. *Food Microbiology*, 17(2), 153–165.
- Chen, D., Li, Y., Lv, J., Liu, X., Gao, P., Zhen, G., Zhang, W., Wu, D., Jing, H., Li, Y., Zhao, Y., Ma, X., Ma, H., & Zhang, L. (2019). A foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Norovirus* and *Bacillus cereus* at a university in the Shunyi District of Beijing, China 2018: a retrospective cohort study. *BMC infectious diseases*, 19(1), 910. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4570-6>
- Choi, C., Nam, J.P. & Nah, J.W. (2016). Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 1-10.
- Choma, C., Guinebretière, M. H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P. E., & Nguyen-The, C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 617-625. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00998.x
- Christiansson A (2011). Pathogens in milk | *Bacillus cereus*. In: Fuquay E-i-CJW (ed) *Encyclopedia of dairy sciences*, 2nd edn. Academic, San Diego, pp 24–30
- Coroller, L., Leguérinel, I., & Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 317-322. doi:10.1128/AEM.67.1.317-322.2001
- Coto, Rodrigo, Chaves, Carolina, Gamboa, María del Mar, & Arias, Maria Laura. (2012). Calidad bacteriológica y detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en arroz blanco cocido expendido en el área metropolitana de la provincia de San José, Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(3), 283-289. Recuperado en 26 de mayo de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222012000300011&lng=es&tlng=en.
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12):5926, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926
- Faille, C., Lebret, V., Gavini, F., & Maingonnat, J. -. (1997). Injury and lethality of heat treatment of *bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. *Journal of Food Protection*, 60(5), 544-547. doi:10.4315/0362-028X-60.5.544
- Fernández, A., Ocio, M. J., Fernández, P. S., Rodrigo, M., & Martínez, A. (1999). Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, 16(6), 607–613.
- Gilbert RJ, Stringer MF, Peace TC. (1974). The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene Camb*. 73(3),433-444. doi:10.1017/S0022172400042790
- González, I., López, M., Martínez, S., Bernardo, A., & González, J. (1999). Thermal inactivation of *bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 51(1), 81-84. doi:10.1016/S0168-1605(99)00109-9

- Griffiths, M. W. (2014). *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* spp. In *Pathogens and Toxins in Foods* (pp. 1–19). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Han, Y.S., Lee, S.H., Choi, K.H. & Park, I. (2010). Preparation and characterization of chitosan–clay nanocomposites with antimicrobial activity. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 71 (4), 464-467.
- Hayrapetyan, H., Abee, T., & Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control*, 60, 493–499.
- Hocking, Ailsa D (2003). *Bacillus Cereus* and Other *Bacillus* Species. In: Hocking AD (Ed) *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 6th Edition. Australian Institute of Food Science and Technology Inc., NSW Branch.
- Jaquette, C. B., & Beuchat, L. R. (1998). Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *Journal of food protection*, 61(12), 1629–1635. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.12.1629>
- Juneja, V. K. (2002). Thermal inactivation. *Control of Foodborne Microorganisms*, 13-53. Retrieved from www.scopus.com
- K.M. Vårum; O. Smidsrød, (2005). Structure-property relationships in chitosans, S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility* (2nd ed), Marcel Dekker, Inc., New York (2005), pp. 625-642
- Lake Rob, Andrew Hudson and Peter Cressey (2004). Risk profile of *Bacillus* spp. in rice. New Zealand Food Safety Authority.
- Laurent, Y., Arino, S., & Rosso, L. (1999). A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 48(2), 149-157. doi:10.1016/S0168-1605(99)00039-2
- Lee J, Kaletunc G. (2002). Calorimetric determination of inactivation parameters of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 93:178-189.
- Leguerinel, I., Spegagne, I., Couvert, O., Gaillard, S., & Mafart, P. (2005). Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1-3), 223-229. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.018
- Luu-Thi, H., Khadka, D. B., & Michiels, C. W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 183–188.
- Mafart, P., & Leguerinel, I. (1998). Modeling combined effects of temperature and pH on heat resistance of spores by a linear-Bigelow equation. *Journal of Food Science*, 63(1), 6–8.
- M.W. Griffiths; H. Schraft, (2017). *Bacillus cereus* food poisoning, C.E.R. Dodd, T. Aldsworth, R.A. Stein, D.O. Cliver, H.P. Riemann (Eds.), *Foodborne diseases*, Academic press, New York (2017), pp. 395-405
- Mujtaba, Morsi, Kerch, Elsabee, Kaya, Labidi, & Khawar. (2019). Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 889–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109>
- Pérez-Chabela, M.L., Totosaus A., Hernández-Alcántara, A.M. (2016). Determinación del tiempo de reducción decimal “d” de bacterias ácido lácticas probióticas. Vol. 1, No. 2, 129-133. (N.d.). Retrieved June 5, 2021, from Uanl.mx website: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/2/24.pdf>

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1457-1465.

Thirkell CE, Sloan-Gardner TS, Kaczmarek MC, Polkinghorne BG. (2019) An outbreak of *Bacillus cereus* toxin-mediated emetic and diarrhoeal syndromes at a restaurant in Canberra, Australia 2018. *Communicable Diseases Intelligence* 2018 - Sep 16; 43, 1-9. doi: 10.33321/cdi.2019.43.40.

Tsai, G.-J., Tsai, M.-T., Lee, J.-M., & Zhong, M.-Z. (2006). Effects of chitosan and a low-molecular-weight chitosan on *Bacillus cereus* and application in the preservation of cooked rice. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2168–2175.

V.K. Juneja, C.E. Golden, A. Mishrab, M.A. Harrison, T. Moh, M. Silverman, (2019). Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice, *International Journal of Food Microbiology*, 290 (2019), pp. 49-58

Vasan A, Mei Leong W, Ingham SC, Ingham BH. (2013). Thermal Tolerance Characteristics of Non-O157 Shiga Toxigenic Strains of *Escherichia coli* (STEC) in a Beef Broth Model System are similar to those of O157:H7 STEC. *Journal of Food Protection* 76:1120-1128

Webb MD, Barker GC, Goodburn KE and Peck MW (2019) Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 93:94-105. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.024

Wijnands, L. M., Dufrenne, J. B., & van Leusden, F. M. (2006). *Bacillus cereus*: characteristics, behaviour in the gastro-intestinal tract, and interaction with Caco-2 cells. Retrieved from <https://rivm.openrepository.com/handle/10029/260584>

Xie, D.F., Martino, V.P., Sangwan, P., Way, C., Cash, G. A., Pollet, E., et al. (2013). Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nano-biocomposites. *Polymer*, 54 (14), 3654-3662.