



MUERTE TÉRMICA NO EXPONENCIAL DE ESPORAS BACTERIALES

Ramon E. Howe W.

Universidad De Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología,
Departamento de Matemática.
e-mail:ramonhowew@cwpanama.net

RESUMEN

En la presente investigación, motivada por la biología de los microorganismos, se logra explicar razonablemente, en el lenguaje matemático, que el máximo número de esporas activadas $A(t)$ se da cuando en un tiempo t , la proporción de esporas activadas a partir de un número inicial de esporas no activadas es mayor que la proporción de esporas muertas de un número inicial de esporas activadas. Este fenómeno se observa en la extrapolación de la porción exponencial en la curva de la muerte térmica a un punto en exceso del número inicial de esporas vivas, descubierto por microbiólogos científicos, en ciertas cepas bacteriales, e.g., *Bacillus stearothermophilus*.

PALABRAS CLAVES

Esporas bacteriales, muerte térmica, esporas activadas, esporas no activadas.

ABSTRACT

In this work, motivated by the biology of microorganisms, it is reasonably explained, using mathematical language, that the maximum number of activated spores $A(t)$ is given when in a given time t , the proportion of activated spores from an initial number of nonactivated ones is greater than the proportion of death spores from an initial number of those activated. This phenomenon is observed in the extrapolation of an exponential portion in the thermal death curve to a point in excess of the initial number of living spores reported by several microbiologist investigators for certain strain for bacterial spores, e.g., *Bacillus stearothermophilus*.

KEYWORDS

Bacterial spores, thermal death, activated spores, nonactivated spores.

INTRODUCCIÓN

Si una población P de bacterias se somete a una temperatura constante de calor, entonces existe una constante positiva k tal que el número de bacterias que continua con vida en el tiempo t es Pe^{-kt} . Los microbiólogos interpretan este fenómeno exponencial como la muerte térmica del microorganismo (Madigan *et al.*, 1998). Este conocimiento es atractivo para los microbiólogos aplicados, por ejemplo, en conexión con esterilización y procesamiento de alimentos (Marten 2000; Leroy *et al.*, 2002).

Dos trabajos pioneros de la cinética de primer orden sobre la muerte térmica no exponencial se le atribuye a Stanier *et al.* (1963) y a Shull *et al.* (1963).

El fenómeno no exponencial de la muerte térmica de ciertas esporas bacteriales, e.g. *Bacillus stearothermophilus*, (Stanier *et al.*, 1963) donde las desviaciones no son atribuidas a errores experimentales, resulta ser interesante.

Shull *et al.* (1963) presentan la existencia de una inesperada situación dada por ciertas cepas de esporas. Se trata de la extrapolación de la porción exponencial de la curva de la muerte térmica a un punto en exceso del número inicial de esporas vivas. Este sorprendente “pico” en la curva de la muerte térmica aún no tiene respuesta concluyente. Existen hipótesis que intentan explicar esta anomalía. La más reciente la explica en términos físico químicos, mediante la segunda Ley de la Termodinámica (Pross 2003).

En el presente trabajo construiremos un modelo estratégico para luego establecer una razonable proposición a la existencia de este punto máximo (“pico”).

1. MODELO

Una espora puede estar en uno de los tres estados mutuamente excluyentes: activada, no activada o muerta.

Una espora activada es aquella capaz de formar colonia cuando es alimentada adecuadamente; es decir, una espora que germina.

Una espora no activada es una espora latente capaz de pasar al estado activado bajo condiciones adecuadas de calor.

Es difícil determinar, por medio del microscopio, el estado en que se encuentra una espora. Sin embargo, es posible obtener en una población el número de esporas activadas mediante la aplicación de un nutriente apropiado y luego contar las colonias que germinan; una colonia para cada espora.

En vez de alimentar a toda la población, es deseable y práctico utilizar un procedimiento de muestreo (Madigan *et al.*, 1998). En virtud de que la población de esporas utilizadas en experimentos es del orden de magnitud de 1×10^5 , el uso de alguna técnica de muestreo es lo más conveniente. Más aún, el muestreo nos permite continuar un experimento tal que, si una población se somete al calor, podemos lograr estimaciones precisas de la población de esporas activadas en varios tiempos a través del experimento.

Cuando una población es sometida a una temperatura constante de calor, es frecuente hablar del número de esporas activadas respecto al tiempo como la curva de la muerte térmica.

Si la población inicial P_0 consta enteramente de esporas activadas, entonces la curva de la muerte térmica es una curva exponencial cuya ecuación es de la forma $P(t) = P_0 e^{-kt}$.

Si la población está compuesta de esporas activadas, y de esporas no activadas, entonces la curva de la muerte térmica exhibirá un retardo inicial seguido de una porción exponencial (posterior al retardo no habrán esporas en el estado no activado).

Si las esporas activadas y las esporas no activadas fuesen de igual resistencia calorífica respecto a la muerte y si la tasa de activación fuese muy grande, entonces la porción exponencial de la curva de la muerte térmica se extrapolará hacia el número inicial de esporas

vivientes. Para ciertas cepas de esporas, e.g., *thermophilus*, la porción exponencial de la curva de la muerte se extrapola hacia un punto por encima del número inicial de esporas vivientes (Shull *et al.*, 1963). Para ello, existen hipótesis que intentan explicar este fenómeno en términos físicos y químicos (Pross 2003).

En este trabajo se plantea una hipótesis matemáticamente razonable.

1.1 SUPUESTOS

Para la construcción del modelo se consideraron los supuestos siguientes:

- a) las esporas en una población dada son todas de una misma cepa;
- b) cuando se aplica calor a una población, la temperatura se mantiene fija;
- c) una spora no activada debe pasar al estado activado antes de morir;
- d) una spora activada nunca pasa al estado no activado;
- e) dada una población de esporas activadas A , entonces existe un número positivo k , la tasa constante de muerte (el cual depende de la temperatura y de la cepa de la spora pero no del número A), tal que el número de esporas que aún viven t unidades de tiempo después de iniciado el calentamiento es Ae^{-kt} ; y
- f) dada la población de esporas no activadas N , existe un número positivo α , tasa constante de activación, tal que $Ne^{-\alpha t}$ esporas se encuentran todavía en el estado no activado t unidades de tiempo después de iniciado el calentamiento.

1.2 CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO ESTRATÉGICO

Supongamos que se aplica calor a una población que consiste de $N(0)$ de esporas no activadas y $A(0)$ de esporas activadas. En virtud de tener una población no alimentada, el número total de esporas en los tres estados se mantiene constante.

Para la suposición (f), el número de esporas no activadas al tiempo t es

$$N(t) = N(0)e^{-\alpha t}, \quad 0 \leq t < \infty \quad (1)$$

Hallaremos una expresión analítica para el número $A(t)$ de esporas activadas al tiempo t .

Si denotamos el número de esporas vivientes al tiempo t por V , entonces

$$V(t) = N(t) + A(t), \quad 0 \leq t < \infty \quad (2)$$

Deseamos describir el comportamiento de $A(t)$ mediante una ecuación diferencial.

Sea t un número positivo, h un incremento positivo de t , y considerar $A(t+h)$. De las $A(t)$ esporas en estado activado al tiempo t , $A(t)e^{-kh}$ aún viven en el estado activado al tiempo $t+h$ en virtud del supuesto (e).

De las $N(t)$ esporas no activadas al tiempo t , $N(t)(1-e^{-\alpha h})$ se activarán y posiblemente mueran después al tiempo $t+h$ en virtud del supuesto (f).

Por tanto,

$$A(t+h) = A(t)e^{-kt} + N(t)(1-e^{-\alpha h}) - R(t, t+h), \quad (3)$$

donde $R(t, t+h)$ denota el número de esporas que están en el estado no activado al tiempo t que después pasan al estado activado y luego mueren en el intervalo de tiempo $[t, t+h]$.

Si se da el caso en que $N(t)(1-e^{-\alpha h})$ esporas que salen del estado no activado en el intervalo de tiempo $[t, t+h]$ son activadas instantáneamente al tiempo t , entonces sólo una porción $N(t)(1-e^{-\alpha h})(1-e^{-kh})$ de ellas morirán para el tiempo $t+h$.

Luego,

$$0 \leq R(t, t+h) \leq N(t)(1-e^{-\alpha h})(1-e^{-kh}) \quad (4)$$

La desigualdad (4) implica

$$\lim_{h \rightarrow 0^+} \frac{R(t, t+h)}{h} = 0,$$

y aplicando este resultado a la ecuación (3), tendremos

$$\lim_{h \rightarrow 0^+} \frac{A(t+h) - A(t)}{h} = -kA(t) + \alpha N(t) \quad (5)$$

Si suponemos que $A(t)$ es diferenciable sobre el intervalo $0 \leq t < \infty$, entonces por (1) y (5) tendremos

$$A'(t) + kA(t) = \alpha N(0)e^{-\alpha t}$$

o bien
$$A'(t) = \alpha N(0)e^{-\alpha t} - kA(t), \quad (6)$$

que representa el modelo estratégico deseado.

La solución de (6) es

$$A(t) = A(0)e^{-kt} + \alpha N(0) \frac{[e^{-\alpha t} - e^{-kt}]}{K - \alpha} \quad \text{cuando } \alpha \neq k \quad (7)$$

$$A(t) = [A(0) + kN(0)t]e^{-kt} \quad \text{cuando } \alpha = k \quad (8)$$

Si $N(0) = 0$ entonces, por (7) y (8), $A(t) = A(0)e^{-kt}$ el cual verifica el supuesto (e).

1.3 PROPOSICIÓN

La solución de (7) y (8) tiene un máximo para $t > 0$ si y solo si $\alpha N(0) > kA(0)$.

Demostración: La segunda derivada de (6) es

$$A''(t) = -\alpha^2 N(0)e^{-\alpha t} - kA'(t) = -\left\{ \alpha^2 N(0)e^{-\alpha t} + k[\alpha N(0)e^{-\alpha t} - kA(t)] \right\}$$

Luego el máximo de $A(t)$ se da si y solo si $\alpha N(0) > kA(0)$

1.3.1 INTERPRETACIÓN

El “pico” observado se “explica” cuando $\alpha N(0)$ es mayor que $kA(0)$; es decir, el máximo número de esporas activadas $A(t)$ se da cuando en un tiempo t la proporción de esporas activadas a partir de un número inicial de esporas no activadas es superior a la proporción de esporas muertas de un número inicial de esporas activadas.

2. LAS CONDICIONES INICIALES

Si, en una situación particular, son conocidas las constantes $\alpha, k, A(0)$ y $N(0)$, entonces $A(t)$ es dada por (7) y (8). La constante $A(0)$ se obtiene por el proceso descrito en la sección 1. Pero $\alpha, k, N(0)$ son difíciles de obtener en la práctica.

A continuación, presentamos un proceso teórico para determinar α, k y $N(0)$.

Si $\alpha \neq k$, entonces por (6) y (7) tendremos

$$\frac{d}{dt} [\ln A(t)] = \frac{A'(t)}{A(t)} = \frac{\alpha N(0)e^{-\alpha t} - kA(t)}{A(t)} = -k + \frac{\alpha N(0)e^{-\alpha t}}{A(t)}$$

o bien
$$\frac{d}{dt} [\ln A(t)] = -k + \frac{\alpha N(0)(k - \alpha)e^{-\alpha t}}{A(0)(k - \alpha)e^{-kt} + \alpha N(0)[e^{-\alpha t} - e^{-kt}]}$$

multiplicando por $e^{-\alpha t}$

$$\frac{d}{dt} [\ln A(t)] = -k + \frac{\alpha N(0)(k - \alpha)}{A(0)(k - \alpha)e^{(\alpha-k)t} + \alpha N(0)[1 - e^{(\alpha-k)t}]}$$

Consecuentemente, si $k > \alpha$ y $N(0) \neq 0$ entonces

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left\{ \frac{d}{dt} [\ln A(t)] \right\} = -\alpha \quad (9)$$

y
$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left\{ \frac{d}{dt} [\ln A(t)] \right\} = -k \quad \text{si } \alpha \geq k \quad (10)$$

Cuando $\alpha \geq k$, (10) asegura que $-k$ es la “pendiente límite” cuando $t \rightarrow \infty$ de la gráfica de $\ln A(t)$; en este caso, k puede ser estimada a partir de datos experimentales de $A(t)$.

Por otra parte, para obtener $N(0)$, basta determinar $V(0)$ puesto que $N(0) = V(0) - A(0)$ por la ecuación (2).

Por (1), (2) y (6) se deduce que $\frac{dV}{dt} = -kA(t)$.

Así, por $0 \leq t_0 < t_1 < \infty$,

$$V(t_1) - V(t_0) = -k \int_{t_0}^{t_1} A(t) dt \quad (11)$$

Para $t_0 = 0$ y considerando $t_1 \rightarrow \infty$,

Inferimos de (11) que

$$V(0) = k \int_0^{\infty} A(t) dt \quad (12)$$

Observar que $V(t_1) \rightarrow 0$ cuando $t_1 \rightarrow \infty$

Por (1), (2) y (7) u (8).

De (11) observamos que el número de muertes ocurridas en el intervalo de tiempo entre t_0 y t_1 es igual al producto de la tasa constante de muerte k por el área bajo la curva de $A(t)$ para el intervalo de tiempo considerado.

Si $\alpha \geq k$, entonces $V(0)$ puede ser estimado por medio de (10) y (12) una vez conocida la curva experimental para $A(t)$. La determinación de α se obtiene partiendo de

$$V(t_1) - V(t_0) = A(t_1) - A(t_0) + N(0) [e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_0}],$$

y por (11)

$$k \int_{t_0}^{t_1} A(t) dt = A(t_0) - A(t_1) + N(0) [e^{-\alpha t_0} - e^{-\alpha t_1}]$$

Deduciéndose que

$$\alpha = -\frac{1}{t_1} \ln \left[\frac{A(0) - A(t_1) + N(0) - k \int_0^{t_1} A(t) dt}{N(0)} \right] \quad (13)$$

y

$$N(0) = \frac{[A(t_0) - A(t_1)] \int_{t_0}^{t_2} A(t) dt - [A(t_0) - A(t_2)] \int_{t_0}^{t_1} A(t) dt}{[e^{-\alpha t_0} - e^{-\alpha t_2}] \int_{t_0}^{t_1} A(t) dt - [e^{-\alpha t_0} - e^{-\alpha t_1}] \int_{t_0}^{t_2} A(t) dt} \quad (14)$$

donde $0 \leq t_0 < t_1 < t_2 < \infty$.

Si $\alpha < k$, entonces (9) permite la determinación de α por medio de datos experimentales, y $N(0)$ puede ser obtenido de (14); finalmente, podemos utilizar (12) para determinar k .

CONCLUSIÓN

Se explica razonablemente el fenómeno de la porción exponencial “deformada” de la curva de la muerte térmica a un punto en exceso del número inicial de esporas bacteriales vivas, el cual se da cuando en un tiempo t la proporción de esporas activadas de un número inicial de esporas no activadas es mayor que la proporción de esporas muertas de un número inicial de esporas activadas.

El modelo expresa una posible verificación indirecta de los supuestos (c) y (f), los cuales son difíciles de verificar directamente.

La determinación de las condiciones iniciales involucra tanto rigor matemático como la derivación del modelo mismo.

El fenómeno investigado parece tener características de la microbiología matemática; pues, nos permite “ver” indirectamente cosas que no son fáciles de hacer con el microscopio, *e.g.*, estimar el número de esporas vivientes en un tiempo t . Este es un aspecto curioso del modelo matemático.

REFERENCIAS

Leroy, F., B. Degeest & L. De Vuyst. 2002. A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in food. *Int. J. Food Microbiol.* 73 (2-3): 251-259.

Madigan, M., J. Martinko & J. Parker. 1998. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8^{va} Edición, traducido de *Brocks Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc.

Nauta, M. J. 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assesment models. *Int. J. Food Microbiol.* 57(1-2): 9-18.

Pross, A. 2003. The Driving Force for Life's Emergence: Kinetic and Thermodynamic Considerations. *J. Theor. Biol.* 220(3): 393-406.

Shull, J.J., G. T. Cargo & R.R. Ernst. 1963. Kinetics of heat activation and thermal death of bacterial spores. *Appl. Microbiol.* 11: 485-487.

Stanier, R. Y, M. Doudoroff & E. A. Adelberg. 1963. *The Microbial World*, 2nd edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Recibido enero de 2006, aceptado mayo de 2006.