



Trabajo Fin de Máster

Máster en biología molecular y celular

**Influencia de genes relacionados con la respuesta al estrés en la cinética
de inactivación y germinación de esporos bacterianos**

**Influence of genes related to the stress response on the kinetics of
inactivation and germination of bacterial spores**

Autora:

Emma Pinilla Carrera

Directoras:

Elisa Gayán Ordás

Paula Gómara Utrilla

Facultad de ciencias

2022-2023

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1. Importancia de las bacterias esporuladas en la industria alimentaria..... | 5 |
| 1.2. Estructura de los esporos | 7 |
| 1.2.1. Exosporio | 8 |
| 1.2.2. Cubierta o “coat” | 8 |
| 1.2.3. Membrana externa..... | 9 |
| 1.2.4. Corteza o córtex | 9 |
| 1.2.5. Pared celular..... | 9 |
| 1.2.6. Membrana interna | 9 |
| 1.2.7. Protoplasto | 10 |
| 1.3. Mecanismo de resistencia de los esporos..... | 10 |
| 1.3.1. Resistencia de los esporos al calor húmedo..... | 11 |
| 1.3.2. Resistencia de los esporos a los productos químicos..... | 13 |
| 1.4. Germinación | 14 |
| 1.4.1. Germinación por nutrientes..... | 15 |
| 1.4.2. Germinación por agentes químicos..... | 16 |
| 1.4.3. Germinación por agentes físicos | 17 |
| 1.5. Efecto de las condiciones de esporulación en la resistencia y capacidad de germinación de los esporos | 18 |
| 1.5.1. Efecto en la resistencia de los esporos..... | 18 |
| 1.5.2. Efecto en la capacidad de germinación..... | 20 |
| 1.6. Respuesta al estrés osmótico en células vegetativas..... | 23 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 27 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1. Microorganismos..... | 29 |
| 3.1.1. Construcción del doble mutante mediante transducción con fagos | 30 |
| 3.1.2. Confirmación de las cepas mediante PCR | 31 |
| 3.2. Cultivos | 32 |
| 3.2.1. Elaboración de las curvas de esporulación | 33 |
| 3.2.2. Obtención de las suspensiones de esporos..... | 33 |
| 3.3. Cinética de inactivación de los esporos por calor | 34 |
| 3.4. Inactivación con dodecilamina..... | 35 |
| 3.5. Cinética de germinación..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.1. Curvas de germinación por densidad óptica | 37 |
| 3.5.2. Curvas de germinación por fluorimetría | 38 |
| 3.6. Análisis estadístico | 38 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 39 |
| 4.1. Curvas de esporulación de los mutantes de <i>B. subtilis</i> | 39 |
| 4.2. Resistencia al calor de los esporos mutantes de <i>B. subtilis</i> | 40 |
| 4.2.1. Cinética de inactivación de los esporos de <i>fur::erm, rsbS::erm, sigX::erm</i> y <i>rsiW::erm</i> | 40 |
| 4.2.2. Cinética de inactivación de los esporos de <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> con y sin GB | 45 |
| 4.2.3. Cinética de inactivación de los esporos de <i>des::kan</i> y <i>desK::kan/P_{Km}-desR</i> con distinta fluidez de membrana | 47 |
| 4.3. Inactivación con dodecilamina | 49 |
| 4.3. Cinética de germinación de los esporos mutantes de <i>B. subtilis</i> | 51 |
| 4.4.1. Germinación frente a nutrientes..... | 51 |
| 4.4.2. Germinación frente a CaDPA..... | 53 |
| 5. CONCLUSIONES | 56 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 59 |
| 7. ANEXOS | 64 |

RESUMEN

Los esporos bacterianos son los microorganismos más resistentes al calor y por tanto limitan la intensidad mínima a aplicar en los tratamientos industriales para conseguir alimentos seguros y estables. Además, estudios previos han demostrado que los esporos formados a una actividad de agua (a_w) reducida, especialmente con sal, son mucho más resistentes al calor que los producidos a a_w óptima, y que además germinan mucho más lento y heterogéneamente. Conocer las causas moleculares del comportamiento de los esporos producidos a baja a_w nos ayudará en un futuro en la mejora de los tratamientos tecnológicos. En este trabajo nos centramos en estudiar el impacto de las respuestas al estrés osmótico de las células vegetativas de *B. subtilis* 168 en la resistencia al calor y velocidad de germinación de los esporos de la progenie, mediante el uso de mutantes que permiten modificar sintéticamente la actividad de los factores SigB, SigW y SigX, la concentración intracelular de hierro y osmolitos y la fluidez de la membrana interna. Los resultados mostraron que los esporos con mayor actividad de SigB y menor actividad de SigX son más sensibles al calor, mientras que la ausencia del regulador Fur (que controla la homeostasis del hierro), el aumento del contenido en osmolitos y la reducción de la fluidez de la membrana incrementa la resistencia al calor. Por otro lado, la inhibición de SigX y Fur empeoraba la germinación frente a ciertos nutrientes y agentes químicos, y el incremento en el contenido en osmolitos la aceleraba ligeramente.

ABSTRACT

Bacterial spores are the most heat-resistant microorganisms and therefore limit the minimum intensity to be applied in industrial treatments to achieve safe and stable food. In addition, previous studies have shown that spores formed at reduced water activity (a_w), especially with salt, are much more resistant to heat than those produced at optimal a_w , and that they germinate much more slowly and heterogeneously. Knowing the molecular causes of the behavior of the spores produced at low a_w will help us in the future in the improvement of technological treatments. In this work we focus on studying the impact of osmotic stress responses of vegetative cells of *B. subtilis* 168 on heat resistance and germination speed of the spores of the progeny, through the use of mutants that allow synthetically modify the activity of the factors SigB, SigW and SigX, the intracellular concentration of iron and osmolytes and the fluidity of the inner membrane. The results showed that spores with higher SigB activity

and lower SigX activity are more sensitive to heat, while the absence of the Fur regulator (which controls iron homeostasis), increased osmolyte content and reduced membrane fluidity increases heat resistance. On the other hand, the inhibition of SigX and Fur worsened germination against certain nutrients and chemical agents, and the increase in osmolyte content accelerated it slightly.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las bacterias esporuladas en la industria alimentaria

La industria alimentaria actualmente tiene como objetivo garantizar la seguridad de todos los productos y alargar su vida útil, manteniendo lo máximo posible sus propiedades organolépticas. Las bacterias son el principal problema que nos encontramos para alcanzar estos objetivos, ya que son importantes agentes de alteración y algunos de ellos son patógenos, lo que conlleva aplicar tratamientos tecnológicos en los alimentos para minimizar su acción. Las bacterias pueden ser tanto aeróbicas como anaeróbicas según su necesidad de oxígeno, y pueden crecer en rangos de pH, temperatura y actividad de agua (a_w) variados según la especie e incluso la cepa. La a_w es la humedad en equilibrio de un producto y se mide de 0 a 1. En el ámbito de seguridad alimentaria se podría definir como el agua libre disponible para permitir el crecimiento bacteriano.

Algunas bacterias Gram positivas del filo Firmicutes, cuando se enfrentan a condiciones adversas, pueden formar en su interior un endosporo o espozo que se libera al exterior por un proceso denominado esporulación. A diferencia de las células vegetativas, los esporos no poseen actividad metabólica, pero si mejores propiedades de resistencia. La resistencia de los esporos frente al calor, desecación, acidez, deficiencias de nutrientes y oxígeno, radiaciones ultravioleta e ionizante y agentes desinfectantes es mucho mayor a la de las correspondientes células vegetativas (Murray et al., 2020). Esto les permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas durante períodos de tiempo indefinidos, y debido a su pequeño tamaño, se diseminan en la naturaleza con facilidad. Cuando el espozo se encuentra en condiciones ambientales idóneas, es capaz de convertirse de nuevo en una célula vegetativa mediante un proceso denominado germinación.

El control de los esporos bacterianos supone un gran desafío para la industria alimentaria debido a su ubicuidad, ya que se encuentran contaminando muchas materias primas

facilitando su acceso a la cadena alimentaria. Su elevada resistencia a la mayoría de los métodos de procesado y barreras de conservación permite que algunos de ellos puedan germinar en el alimento durante su almacenamiento.

Los géneros de bacterias esporuladas más comunes en los alimentos son *Bacillus* y *Clostridium*. La mayoría de ellos son importantes agentes de alteración, generando acidificación, gases, limosidad y otros efectos derivados de la producción de enzimas o gases. Estos defectos provocan un rechazo por parte del consumidor y supone pérdidas económicas importantes en la cadena alimentaria (Wells-Bennik et al., 2016). Algunos de estos esporulados, como *C. botulinum*, *C. perfringens* y *B. cereus*, pueden causar toxinfecciones alimentarias, ya sea por la producción de toxinas tras la germinación de los esporos en el alimento o bien por la germinación, colonización y producción de toxinas dentro del intestino (Wells-Bennik et al., 2016).

Si comparamos los tres microorganismos anteriormente nombrados, según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (“European Food Safety Authority” - EFSA), en el año 2021, el 28% de los brotes de origen alimentario fueron causados por toxinas bacterianas, siendo las toxinas de *B. cereus* las que provocaron un mayor número de casos. Mientras que *C. perfringens* destaca por el mayor número de hospitalizaciones y muertes (Informe de zoonosis de la unión Europea, EFSA, 2021). Aunque los casos de intoxicación por *C. botulinum* son afortunadamente escasos, éstos causan el mayor porcentaje de mortalidad debido a la gravedad de la enfermedad derivada de la neurotoxina que produce esta bacteria (Informe de zoonosis de la unión Europea, EFSA, 2021; Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), 2019).

Las estrategias utilizadas en la industria alimentaria para el control de los esporos bacterianos incluyen (i) el uso de condiciones de almacenamiento y de formulaciones que inhiban su germinación y/o crecimiento, (ii) la aplicación de tratamientos térmicos intensos que inactiven los esporos y la combinación de ambos. En cuanto al primero, se utilizan distintos métodos, generalmente combinados, como la reducción de la a_w , (mediante la adición de solutos como sal o azúcar o bien eliminando agua), la acidificación, la adición de compuestos antimicrobianos como los ácidos orgánicos, el descenso de la temperatura de almacenamiento y la ausencia de oxígeno (Wells-Bennik et al., 2016). Sin embargo, conseguir inhibir la germinación y crecimiento de los organismos esporulados con estas barreras resulta

complicado ya que no todas ellas se pueden aplicar en todos los alimentos. Esto se complica con la gran variabilidad en las condiciones crecimiento que hay entre especies esporuladas, existiendo algunas capaces de germinar y crecer en condiciones extremas. Por ejemplo, hay productos alimentarios que poseen un pH por debajo de 4,6, como vegetales y frutas, que ejercen una presión selectiva sobre la mayoría de los microorganismos presentes, pero existen bacterias esporuladas acidófilas como *Bacillus coagulans* o *Alicyclobacillus acidoterrestris* que pueden crecer en estos productos (Wells-Bennik et al., 2016).

En cuanto a los tratamientos de inactivación, el calor es la única tecnología que dispone la industria para inactivar los esporos y así conseguir alimentos estériles con una larga vida útil. Debido a la relevancia de *C. botulinum*, la intensidad mínima de los tratamientos térmicos a aplicar, es decir los parámetros de tiempo y temperatura, en todos los productos esterilizados no ácidos ($\geq 4,5$), tiene que ser suficiente para reducir el riesgo de supervivencia de los esporos de esta bacteria hasta 12 unidades logarítmicas. El tratamiento se conoce como cocción botulínica, y tiene que ser de una intensidad mínima de 121 °C durante 2,52 min o tratamientos de eficacia letal equivalente (Wells-Bennik et al., 2016). Aun así, puede ser que los alimentos estén contaminados con otras especies esporuladas alterantes más termorresistentes, y que por tanto se requieran intensidades de tratamiento mayores para garantizar también la estabilidad del producto, o combinar el tratamiento térmico con barreras que inhiban la germinación o crecimiento de las especies alterantes.

El inconveniente de los tratamientos térmicos de alta intensidad es que provocan una alteración de las propiedades nutricionales y sensoriales en la mayoría de los alimentos. Por ello, es necesario optimizar muy bien las condiciones de temperatura y tiempo a aplicar, con el fin de dar el tratamiento mínimo necesario para garantizar la seguridad y la estabilidad del producto con el mínimo impacto posible en la calidad. Aun así, para evitar afectar a las propiedades del alimento, se están buscando nuevas estrategias de inactivación que sean eficaces y no provoquen cambios desfavorables en los productos. Una de ellas consiste en inducir la germinación de los esporos, ya que al germinar, pierden sus propiedades de resistencia y por tanto son más fáciles de inactivar con tratamientos térmicos de intensidad moderada.

1.2. Estructura de los esporos

Los esporos se producen en el interior de las células vegetativas, un único esporo por célula, y se forman en un compartimento denominado esporangio, que puede llegar a deformar a la célula madre. El proceso de esporulación es muy complejo y se divide en varias etapas, desde la duplicación del material genético, compartmentación y formación de las capas que recubren al esporo, hasta la lisis de la célula madre para la liberación del esporo (Setlow, 2014).

La estructura del esporo tiene varias partes (Fig. 1A), que se explican a continuación desde la capa más externa a la más interna:

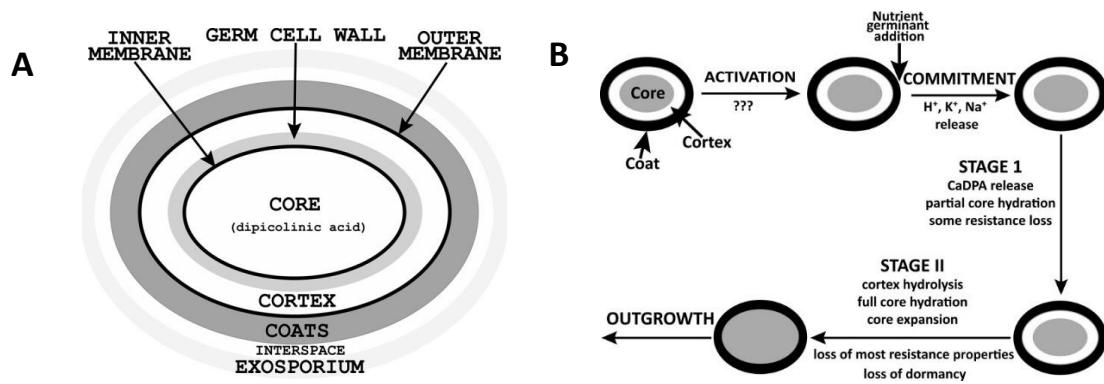


Figura 1: Estructura del esporo (A) y etapas de la germinación inducida por nutrientes en esporos de *Bacillus* spp. (B), (Imágenes publicadas por Setlow, (2014)).

1.2.1. Exosporio

Es una estructura que no presentan todas las especies, algunas solo presentan un esbozo, como es el caso de *B. subtilis*. El exosporio está compuesto principalmente por capas de proteínas, así como lípidos, carbohidratos y minerales en menor medida. El exosporio proporciona a los esporos sus propiedades adherentes e hidrófobas, que pueden tener un papel importante en la patogenicidad de algunas especies como *B. cereus* y *B. anthracis* (Leggett et al., 2012).

1.2.2. Cubierta o “coat”

La cubierta, también conocida como “coat”, se encuentra debajo del exosporio y está conformada por varias capas de proteínas que se pueden dividir en dos tipos según si son solubles o insolubles. La fracción insoluble se caracteriza por un alto contenido en enlaces cruzados disulfuro entre residuos de cisteína, cuyo número se cree que está relacionado con la resistencia de los esporos a agentes químicos. Estudios realizados por Gould et al. (1970), mostraron que los esporos de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. se sensibilizaban frente al peróxido de hidrógeno y la lisozima tras un tratamiento con disruptores químicos de los

enlaces disulfuro. Así, esta capa constituye una barrera de paso de moléculas grandes como la lisozima, pero es permeable a moléculas pequeñas como los aminoácidos, glucosa y sales minerales (Leggett et al., 2012). También se ha demostrado que el aumento del número de enlaces cruzados disulfuro en *B. subtilis* entre las proteínas el “coat” provocan una mayor resistencia al calor (Abhyankar et al., 2015).

1.2.3. Membrana externa

La membrana externa forma parte de la membrana citoplasmática de la célula madre y es fundamental para la formación del esporo, sin embargo, no hay evidencias de que proporcione resistencia frente al estrés (Setlow, 2006).

1.2.4. Corteza o córtex

Está formada en su mayoría por peptidoglicano con algunas modificaciones respecto al de las células vegetativas. El peptidoglicano de las células vegetativas está formado por cadenas de glicanos alternando entre N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) unidas mediante enlaces glucosídicos β -(1,4), aunque hay un pequeño porcentaje que están formando complejos con los ácidos teicoicos. En la corteza de los esporos, los residuos de NAM poseen modificaciones que les impiden formar enlaces cruzados entre las cadenas de glicanos provocando la formación de murálicos- δ -lactámicos y además hay una ausencia completa de ácidos teicoicos (Leggett et al., 2012). De hecho, en la mayoría de las especies los residuos de NAM tienen sus cadenas laterales acortadas en residuos individuales de L-alanina (Popham & Bernhards, 2016). La corteza es necesaria para la formación del esporo y para la reducción y mantenimiento del bajo contenido de agua del protoplasto, y por tanto está involucrada también en la resistencia a agentes químicos y físicos (Setlow, 2006).

1.2.5. Pared celular

También constituida por peptidoglicano, y aunque no forma parte de los mecanismos de resistencia de los esporos, es imprescindible para formar la pared celular de la célula vegetativa tras la germinación (Setlow, 2006).

1.2.6. Membrana interna

Tiene una composición mayoritariamente lipídica, similar a la membrana citoplasmática, y además contiene las proteínas necesarias para iniciar la germinación (Setlow, 2006). A diferencia de las células vegetativas, ésta se encuentra altamente comprimida y se expande

hasta 1,3-1,6 veces su tamaño durante la germinación (Cowan et al., 2004a). Estudios realizados por Laue et al., (2018) demostraron que parte de esta membrana se encuentra altamente comprimida en forma de túbulos o vesículas en la cara interior hacia el protoplasto. Los lípidos de la membrana interna (MI) están colocados ordenadamente y son poco móviles, lo que hace tener muy poca fluidez en comparación con la membrana citoplasmática de las células vegetativas (Hofstetter et al. 2012). Destaca por ser una barrera de permeabilidad muy fuerte frente a moléculas pequeñas, tales como agentes químicos que atacan al ADN como el ácido nitroso o el formaldehido y las proteínas. Estudios realizados por Korza et al., (2023), encontraron que el daño oxidativo a la MI de los esporos provocaba que la resistencia al calor húmedo disminuyera, al igual que las alteraciones en el contenido de fosfolípidos.

1.2.7. Protoplasto

Contiene el ADN, el ARN, los ribosomas y la mayor parte de las enzimas del esporo. Además, se caracteriza por tener un bajo contenido en agua, entorno a un 25 % de su peso en comparación del 75 % en las células vegetativas (Sunde et al., 2009), lo que explica parte de su elevada resistencia al calor y a los agentes químicos. Se cree que el bajo contenido de agua del protoplasto ayuda a mantener al esporo latente e inmoviliza a las proteínas solubles protegiéndolas así frente a estreses como el calor (Cowan et al. 2003). A su vez, contiene grandes cantidades de ácido piridina-2,6-dicarboxílico o ácido dipicolínico (“dipicolinic acid” - DPA), quelado por iones calcio (Ca-DPA), que contribuye a reducir el contenido de agua del protoplasto, de hecho, el contenido de DPA de los esporos puede llegar a constituir hasta el 10 % del peso seco de los esporos. En el núcleo también encontramos un grupo de pequeñas proteínas solubles en ácido (“small, acid-soluble spore proteins” - SASP), siendo las de tipo α y β las más abundantes, las cuales se unen al ADN proporcionándole una estructura y propiedades especiales que lo protegen frente al daño, aunque estas se degradan durante la germinación para permitir la transcripción del ADN (Setlow, 2006).

1.3. Mecanismo de resistencia de los esporos

Con el objetivo de cumplir todas las consideraciones anteriores relacionadas con la inactivación de los esporos, se han realizado numerosas investigaciones sobre los mecanismos de resistencia de los esporos frente al calor y agentes químicos esporicidas, que se resumen a continuación. En cuanto al calor, se hace referencia al mecanismo de inactivación del calor

húmedo, ya que los alimentos suelen estar constituidos mayoritariamente por agua, aunque el mecanismo de acción del calor húmedo es muy distinto al del calor seco (Setlow y Christie, 2021).

1.3.1. Resistencia de los esporos al calor húmedo

Los esporos bacterianos son extremadamente resistentes al calor, pudiendo llegar a ser hasta 10 veces más resistentes respecto a las correspondientes células vegetativas, y la resistencia entre esporos de cepas de distintas especies puede variar hasta más de 300 veces (Gayán et al., 2013). La resistencia al calor de los esporos, al igual que en las células vegetativas, se compara a través de los parámetros cinéticos que definen la velocidad de muerte a lo largo del tiempo. Normalmente, la inactivación de los esporos frente al tiempo a una temperatura constante se define con una tendencia exponencial. A partir de la relación lineal entre el logaritmo de esporos supervivientes respecto al tiempo de tratamiento, es decir, la gráfica de supervivencia (Fig. 2), se puede calcular el valor D_T . Este valor es el tiempo necesario a una temperatura determinada para reducir la población microbiana una unidad logarítmica, es decir, el 90% de la población. No obstante, en la práctica es frecuente observar desviaciones de la linealidad en las gráficas de supervivencia. El valor D_T se reduce con la temperatura de tratamiento siguiendo una relación exponencial. A partir de la relación lineal entre el logaritmo del D_T y la temperatura, es decir, la gráfica de termodestrucción (Fig. 2), se puede calcular el valor z . El valor z se define como el aumento de grados de temperatura necesario para reducir el valor D_T una unidad logarítmica (Wells-Bennik et al., 2016).

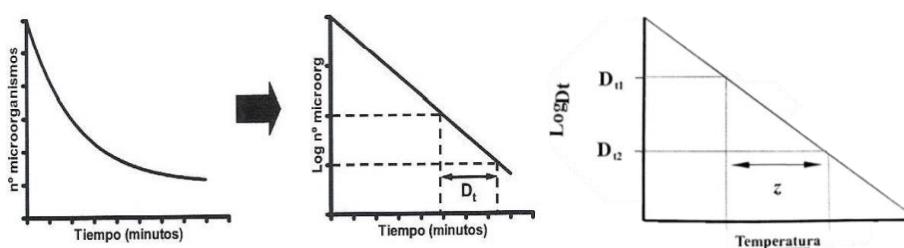


Figura 2: Inactivación microbiana. Gráfica de supervivencia y gráfica de termodestrucción (Imagen recuperada de Condón et al. (2018))

A pesar de que se han realizado numerosas investigaciones para identificar los mecanismos de resistencia al calor de los esporos, todavía no se conocen las moléculas o componentes que conducen a la muerte, aunque se han identificado algunas estructuras y propiedades que protegen a los esporos del calor. La inactivación de los esporos por calor no es un proceso

binario de “muerte” o “supervivencia”, si no que existen estadios intermedios en los que los esporos quedan dañados subletalmente, cuya posibilidad de reparación y convertirse en células viables está estrechamente relacionado con las condiciones de cultivo tras el tratamiento térmico (Williams & Russell, 1992). Aunque los esporos son estructuras inertes, están dotados de las enzimas y recursos energéticos necesarios para la reparación, los cuales se ponen en funcionamiento tras iniciarse la germinación. Si se acumula una cantidad de daños suficiente para sobrepasar a los mecanismos de reparación, el esporo acaba muriendo (Setlow, 2006). La naturaleza y tipo de estos daños todavía se desconoce.

La principal propiedad de los esporos que les protege frente al calor es el bajo contenido de agua del núcleo. Existe una relación inversamente proporcional entre el contenido del agua del protoplasto y la resistencia al calor de los esporos (Setlow, 2006). De hecho, se ha demostrado que el contenido de agua del protoplasto se correlaciona con la variabilidad en resistencia al calor entre esporos de distintas especies, aunque otros factores que se mencionan posteriormente también pueden contribuir a las diferencias observadas (Beaman y Gerhardt, 1986). Además, se ha demostrado que un mutante de *B. subtilis* incapaz de acumular DPA ($\Delta sleB \Delta spoVF$) es más sensible al calor que la cepa parental (Barbara et al., 2006).

Los niveles de cationes divalentes en el protoplasto también se han relacionado con la resistencia al calor, y generalmente una mayor mineralización está asociada a una mayor resistencia al calor, ya que a su vez también provoca una disminución en el contenido de agua. Además, estudios realizados por Alfredo et al., (1999) muestran que la desmineralización del esporo provoca una reducción de la resistencia al calor y que también afecta al proceso de germinación. Los tipos de minerales presentes en mayor medida también son un factor importante, el Ca^{2+} como ion prevalente incrementa más la resistencia que otros que tienen Mg^{2+} , K^+ , Na^+ o Mn^{2+} (Setlow, 2006).

En la destrucción de los esporos por el calor húmedo, a diferencia del calor seco, no interviene el daño en el ADN, ya que los esporos inactivados no poseen lesiones en el material genético (Barbara et al., 2006). Sin embargo, la ausencia de las proteínas SASP, tanto las de tipo α como las de tipo β , en *B. subtilis* mediante la formación de una cepa con delección de los genes *sspA* y *sspB* que codifican SASP α y β son más sensibles al calor que la cepa parental, lo que sugiere

que las proteínas SASP aportan protección contra el calor húmedo por un mecanismo desconocido e independiente de los daños en el ADN (Barbara et al., 2006; Setlow, 2006).

Se ha demostrado que las propiedades de MI pueden tener un papel muy importante en la resistencia de los esporos al calor. En concreto, se ha relacionado la variación de resistencia entre esporos de especies de *Bacillus* con el número de copias presentes en su genoma del operón *spoVA^{2mob}* dentro del transposón Tn1546 (Berendsen et al., 2016; Krawczyk Antonina et al., 2017). Entre los genes que han sido identificados en el operón *spoVA^{2mob}*, el gen que codifica 2Duf se cree que es el encargado de proporcionar resistencia al calor (Kanaan et al. 2021). 2Duf posee una estructura similar a las proteínas asociadas a la MI, aunque todavía no se ha demostrado que esta sea su localización (Kanaan et al. 2021). Recientemente se ha demostrado que 2Duf podría cambiar las propiedades de la MI protegiendo a las proteínas de esta frente al calor. Por otro lado, se ha demostrado que los esporos dañados por el calor pueden germinar con normalidad, pero acumulan menos ATP y FMNH₂. Por ello, se ha hipotetizado que el calor inactiva una o varias enzimas del metabolismo central, probablemente relacionadas con la fosforilación oxidativa que ocurre en la membrana, y que impide que se forme cantidad suficiente de ATP y FMNH₂. La presencia de 2Duf en la MI podría prevenir el daño en estas enzimas (Korza et al., 2023).

En relación con las capas más externas del esporo, la corteza, y en concreto el peptidoglicano, como ya hemos mencionado anteriormente, son fundamentales en la eliminación de agua del núcleo, proceso esencial para aumentar la resistencia al calor. La cubierta también puede influir en la resistencia al calor. Modificaciones en la composición del coat, así como el número de enlaces cruzados disulfuro, se ha relacionado con cambios en la resistencia al calor (Setlow y Christie, 2021). Además, los esporos que no poseen la cubierta, bien porque se ha eliminado químicamente o bien por el uso de mutantes que no pueden sintetizar la cubierta ($\Delta cotE$ $\Delta gerE$), son ligeramente más sensibles al calor.

1.3.2. Resistencia de los esporos a los productos químicos

Algunos productos químicos tienen la capacidad de inactivar esporos bacterianos, y estos se suelen aplicar en la industria alimentaria para la limpieza y desinfección de equipos y superficies. Algunos de estos agentes son el hipoclorito de sodio, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el hidróxido de sodio (Setlow y Christie, 2021).

Estos compuestos suelen producir daños en la MI, ya que por su impermeabilidad es la principal barrera de resistencia, y a su vez producen daños en otras estructuras causando la muerte del esporo. De hecho, estudios realizados por Setlow et al., (2013) muestran que el tratamiento con agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno puede producir daños significativos en las proteínas de germinación de los esporos localizadas en la MI, aunque estas no sean la diana principal de los agentes oxidantes. En el caso del peróxido de hidrógeno, se cree que la muerte de los esporos se produce por la inactivación de ciertas proteínas del núcleo, y a diferencia de lo que ocurre en células vegetativas, no produce daños en el ADN (Setlow y Christie, 2021). El hipoclorito de sodio actúa principalmente a nivel de la MI, modificando su permeabilidad (Young et al., 2003). Normalmente esa permeabilidad es muy baja y ejerce gran resistencia frente a los productos químicos que dañan el ADN (Setlow y Christie, 2021), el hipoclorito de sodio produce la secreción de DPA, Ca²⁺ e incluso de los ácidos nucleicos de los esporos (Bloomfield y Arthur, 1992).

Otro compuesto muy utilizado es el hidróxido de sodio, cuyo mecanismo de acción involucra la degradación de la corteza del esporo facilitando la difusión al protoplasto. Sin embargo, a diferencia de los agentes oxidantes, afecta a proteínas localizadas en las capas más externas (Bloomfield y Arthur, 1992). Además Setlow et al., (2002) demostraron que los compuestos químicos ácidos provocaban una disminución en la barrera de permeabilidad, mientras que los compuestos alcalinos, como el NaOH, mataban al esporo mediante la inactivación de las enzimas líticas del córtex, que son esenciales para la hidrólisis del córtex durante el proceso de germinación.

Aunque los compuestos químicos afectan especialmente a la MI, la corteza de los esporos ejerce cierta protección frente a estos ya que proporciona una barrera de permeabilidad. Por ello, los esporos sin coat son más susceptibles a sufrir daños por este tipo de agentes (Setlow, et al., 2002).

Además, si el ADN se encuentra saturado de las proteínas SASP tanto las de tipo α como las de tipo β, estas podrían aportar resistencia a otros procesos químicos como la desaminación de la citosina y la depurinación (Setlow, 2006).

1.4. Germinación

Como se ha mencionado anteriormente, la germinación es el proceso por el cual el esporo da lugar a la célula vegetativa, que posteriormente comenzará de nuevo su crecimiento exponencial, perdiendo a su vez sus propiedades de resistencia. En general, la germinación de los esporos se induce en presencia de determinados nutrientes cuando éstos se encuentran en un ambiente idóneo, aunque también pueden activarse por otros factores externos físicos o químicos. El mecanismo por el cual se inicia la germinación y las etapas del proceso depende de si la germinación se induce por nutrientes, agentes químicos o físicos, tal y como se resume en la Figura 1B.

1.4.1. Germinación por nutrientes

La germinación se induce cuando uno o varios nutrientes específicos (aminoácidos, azúcares, minerales y sus combinaciones) interaccionan de manera estereoespecífica con complejos de proteínas. Estos complejos se denominan receptores de germinación (GR, por sus siglas en inglés “germinant receptors”) y se localizan en la MI de los esporos agrupados en ciertas regiones, que se denominan germinosomas (Wen et al., 2019). Al restaurarse la movilidad lipídica de la MI durante la germinación, el germinosoma se dispersa y los GR se vuelven más accesibles a los agentes exógenos. Los GR tienen 3 subunidades y la pérdida de una de ellas provoca que el complejo deje de ser funcional (Setlow, Wang, y Li, 2017). En general el número de GR de la MI suele ser muy bajo en comparación con otras proteínas (Stewart y Setlow, 2013), y se cree que variaciones en el número de GR entre esporos podría contribuir a la heterogeneidad en la velocidad de germinación en poblaciones isogénicas (Setlow, 2014).

Cada microorganismo esporulado posee varios tipos de GR, aproximadamente entre 3 y 10, que son específicos de la especie e incluso de la cepa (Stewart y Setlow, 2013). Cada tipo de GR responde específicamente a uno o varios tipos de nutrientes. *B. subtilis* tiene 3 receptores, GerA, GerB y GerK. GerA desencadena la germinación cuando interacciona de forma específica frente a L-alanina o L-valina. GerB y GerK actúan conjuntamente y responden frente a una mezcla de L-asparagina, D-glucosa, D-fructosa y K⁺ (AGFK) (Stewart y Setlow, 2013). Otros nutrientes de bajo peso molecular que pueden inducir la germinación son los nucleósidos, principalmente inosina, e incluso iones, como Na⁺ y K⁺ (Stewart y Setlow, 2013).

La proteína GerD también se encuentra en el germinosoma. En concreto, es una lipoproteína de la MI que se expresa en paralelo con los genes de GR siendo esencial para el ensamblaje del germinosoma y para la rápida germinación de los esporos (Stewart y Setlow, 2013). Se cree

que GerD se encarga de transmitir la señal de inicio de la germinación una vez que los GR se unen a los nutrientes específicos (Setlow et al., 2017). Una vez los GR se unen específicamente a los nutrientes, se inicia la germinación de los esporos, que en *Bacillus* spp. se puede resumir en cinco eventos principales (Fig. 1B).

Activación: Es el periodo en el cual se induce el proceso de germinación cuando los esporos contactan con los nutrientes. Después de mezclar un nutriente germinante con esporos, hay un período de retraso que varía en duración desde unos pocos minutos hasta 24 h, y desconocemos lo que está sucediendo durante este período de retraso. Los esporos que tardan más tiempo en responder frente a los agentes germinantes se denominan esporos superlatentes (Setlow, 2014).

Compromiso de germinación o “commitment”: A partir de esta etapa, el proceso de germinación se vuelve irreversible, incluso si se eliminan los nutrientes del medio. De hecho, se desconoce de manera específica lo que ocurre en esta fase, aunque se ha visto que el esporo entra en la fase de compromiso tras la liberación de algunos minerales al medio.

Fase I: Liberación de componentes del esporo como el CaDPA (que se expulsa por los canales SpoVA), Na⁺, K⁺ y H⁺ y aumento de la actividad metabólica ya que el núcleo empieza a hidratarse (Setlow, 2014).

Fase II: El esporo se hincha, se expande el núcleo y recupera toda su hidratación, la cubierta se hidroliza debido a la activación de las enzimas líticas del córtex (CwlJ y SelB en el caso de *B. subtilis*) y los esporos pierden la resistencia frente al calor y los demás tratamientos tecnológicos (Setlow, 2014).

Crecimiento o “outgrowth”: Tras la hidratación completa del núcleo y recuperación de la movilidad lipídica de la MI, el protoplasto de la célula empieza a sintetizar nuevos componentes y se convierte en una célula metabólicamente activa que se prepara para la multiplicación (Setlow, 2014).

1.4.2. Germinación por agentes químicos

Se han identificado una serie de agentes químicos capaces de inducir la germinación, en ausencia de nutrientes, a través de distintos mecanismos. Cabe destacar el ácido dipicolínico quelado con calcio (CaDPA), el cual es capaz de desencadenar la germinación de los esporos

de la mayoría de las especies (Setlow et al., 2017). Este germinante funciona activando la enzima lítica del córtex CwlJ, sin necesidad de que intervengan los GR (Setlow et al., 2017).

Otro tipo de agentes químicos que inducen la germinación son los surfactantes catiónicos. Los más estudiados son el grupo de las alquilaminas, en especial la dodecilamina (Setlow et al., 2017). Inicialmente se propuso que la dodecilamina provocaba específicamente la liberación de DPA mediante la activación de los canales SpoVA localizados en la MI del esporo. Esto se debe a la presencia de proteínas codificadas por el operón SpoVA, que como ya hemos mencionado, funcionan facilitando el flujo de salida de DPA durante la germinación (Setlow et al., 2003). Recientemente se ha sugerido que la dodecilamina interacciona directamente con la MI provocando la muerte del esporo, y se ha propuesto como agente esporicida por su elevada eficacia frente a distintas especies (DeMarco et al., 2021).

Finalmente, se ha descrito que la germinación se puede inducir con enzimas que degradan el peptidoglicano, como la lisozima, en esporos carentes de la cubierta proteica, aunque una exposición prolongada a estas enzimas causa la muerte de las células (Setlow et al., 2017).

1.4.3. Germinación por agentes físicos

Los agentes físicos que pueden activar la germinación son el calor y las altas presiones hidrostáticas (APH). Los tratamientos térmicos subletales aumentan la velocidad de la germinación incrementando la respuesta de los GR frente a los germinantes. De hecho, algunas especies de *Bacillus*, como *B. cereus* no son capaces de germinar frente a determinados nutrientes si no son activados térmicamente. Se cree que esto se debe a que el calor provoca algún cambio conformacional en los GR (Setlow et al., 2017), pero esta hipótesis todavía no ha sido demostrada. Las condiciones de tiempo y temperatura óptimas para la activación de la germinación depende del nutriente que induce la germinación y de la cepa (Luu et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado que la presencia del gen *2duf* requiere tratamientos térmicos más intensos para la inactivación de los esporos (Korza et al., 2023).

El mecanismo por el cual las APH activan la germinación depende de la presión empleada. A presiones bajas (150-300 MPa), se acelera la germinación con nutrientes, lo que se cree que es debido a un cambio estructural en los GR. Por el contrario, a presiones de más de 500 MPa, se estimulan la apertura de los canales de liberación de CaDPA (Setlow et al., 2017).

1.5. Efecto de las condiciones de esporulación en la resistencia y capacidad de germinación de los esporos

Normalmente, cuando la esporulación se lleva a cabo en condiciones ambientales (temperatura, pH, a_w , contenido en nutrientes, oxígeno, etc.) fuera del rango óptimo, el proceso de esporulación tiende a alargarse y se reduce la eficiencia de esporulación (menor número de células son capaces de formar esporos) (Bressuire-Isoard et al., 2018). Además, estos cambios en las condiciones ambientales de esporulación influyen notablemente tanto en la resistencia de los esporos resultantes como en la cinética de germinación. Es más, investigaciones realizadas por el grupo de investigación A03_20 sugieren que la variabilidad en el comportamiento de esporos de *B. subtilis* obtenidos en distintas condiciones ambientales puede ser incluso superior a la variabilidad que existe entre cepas (datos no publicados). A continuación, se describe cómo afectan las condiciones de esporulación en la resistencia de los esporos y la capacidad de germinación.

1.5.1. Efecto en la resistencia de los esporos

El factor ambiental más estudiado en la resistencia al calor es la temperatura de esporulación. En general, los esporos esporulados a una temperatura subóptima son mucho más sensibles al calor, esto se muestra en estudios realizados por Freire et al. (2023), cuyos experimentos con esporos de *B. subtilis* incubados en temperaturas bajas poseían mayor sensibilidad al calor.

Por el contrario, el aumento de la temperatura de esporulación aumenta la resistencia al calor, aunque esto no ocurre en todas las especies (Freire et al., 2023). Este fenómeno se ha atribuido a cambios en el contenido de agua del núcleo del esporo, ya que éste disminuye al aumentar la temperatura de esporulación. A su vez, una temperatura de esporulación más alta contribuye a aumentar el grado de mineralización del núcleo y el contenido de DPA, que contribuyen a reemplazar las moléculas de agua (Bressuire-Isoard et al., 2018). Además, las variaciones en cuanto a la resistencia al calor inducido por la temperatura de esporulación se han asociado a cambios en la estructura y la composición de la MI, el peptidoglicano de la corteza y el coat (Freire et al., 2023).

Los cambios en la temperatura de esporulación también influyen en la resistencia a agentes químicos. En general, la resistencia a agentes químicos que actúan sobre la MI o en estructuras del interior del protoplasto aumenta con la temperatura de esporulación. Estos hechos se

confirman con los estudios de Baweja et al., (2008) donde se evaluó la resistencia a diferentes productos químicos como HCl, NaOH, H₂O₂ y formaldehído en esporos formados bajo diferentes condiciones de esporulación, concluyendo que los esporulados a mayor temperatura presentaban mayores resistencias a estos agentes químicos. Esto también se puede observar en estudios realizados por Young y Setlow, (2003), que mostraron que los esporos producidos a altas temperaturas sufrían cambios en la composición proteica de sus capas, provocando así una mayor resistencia al dióxido de cloro y al hipoclorito de sodio. Se cree que temperaturas de esporulación por debajo de las óptimas hacen que la MI sea más permeable haciendo que los esporos sean más sensibles a los agentes químicos, aunque también podrían influir otros factores como el menor contenido en agua o DPA (Bressuire-Isoard et al., 2018).

A su vez, el pH del medio de esporulación también influye notablemente en la resistencia de los esporos al calor. En general, un pH ácido reduce la resistencia de los esporos al calor debido al reemplazo de los cationes divalentes por protones provocando una protonación de las proteínas del núcleo sensibilizándolas al calor. Además, los grupos carboxílicos de la corteza también se protonan lo que conlleva un mayor contenido de agua en el protoplasto (Freire et al. 2023). Por el contrario, un pH alcalino aumenta la mineralización del núcleo y por lo tanto la resistencia al calor (Baril et al., 2012). En cuanto a la resistencia a agentes químicos, Baweja et al., (2008) mostraron que los esporos de *B. anthracis* formados a pH ácido son más sensibles al H₂O₂ en comparación con los esporos formados a pH alcalino, aunque no observaron los mismos resultados para otros agentes químicos.

El efecto de la a_w del medio de esporulación ha sido menos estudiado, aunque estudios recientes realizados en el grupo de investigación A03_20 indican que es un factor de gran importancia. Los esporos de *B. subtilis* que fueron producidos con baja a_w y con glicerol y sal como solutos, mostraron una mayor resistencia al calor húmedo, aunque determinaron que esa resistencia dependía del soluto y de la temperatura establecida. Esto provocaba que, con la sal como soluto, los esporos eran más resistentes a todas las temperaturas, mientras que con glicerol esa resistencia no se mantenía y disminuía con la temperatura de tratamiento. Con estos resultados, Freire et al. (2023) determinaron que, aunque se desconocen los mecanismos por los cuales la disminución de la a_w provoca una mayor resistencia al calor, el tipo de soluto utilizado influye en este mecanismo. Estas hipótesis se confirman con otros

estudios como Aouadhi et al. (2016) en la esporulación de *B. sporothermodurans*, aunque Jakobsen y Murrell (1977), no observaron cambios con la esporulación de *B. cereus* en medios con solutos y baja a_w . En cuanto a la resistencia frente a productos químicos, los esporos producidos a baja a_w , ya sea con sal o glicerol, demostraron ser más sensibles al hipoclorito de sodio, aunque no presentaba diferencias de resistencia frente a la dodecilamina en relación con el control (Freire et al. 2023).

Como consecuencia, estas variables afectarán a la posterior resistencia de los esporos a factores como el calor húmedo, productos químicos o radiaciones. Por ejemplo, los esporos de *Bacillus spp.* que han esporulado en condiciones que no son óptimas son mucho menos resistentes al calor húmedo que las que han esporulado en un rango óptimo de temperatura y pH (Bressuire-Isoard et al., 2018)

Además, los esporos producidos en baja concentración de oxígeno o anaerobiosis suelen tener mayor resistencia al calor que los que son formados con niveles óptimos de oxígeno. Los esporos producidos en un medio sólido también presentan cambios en la resistencia al calor, aunque no en otros factores, como pueden ser contenido de DPA, SASP o contenido de agua del núcleo (Bressuire-Isoard et al., 2018). Estudios realizados por Rose et al., (2007), muestran que los esporos de *B. subtilis* producidos en medio líquido tenían menor resistencia al calor y a varios productos químicos, y también presentaban diferencias en la composición de la MI.

1.5.2. Efecto en la capacidad de germinación

El efecto de la temperatura de esporulación también ha sido el factor más estudiado en la cinética de germinación, aunque los datos obtenidos en la literatura por diferentes autores son difíciles de comparar debido a que influyen muchas otras variables, tales como la cepa, el tipo de germinantes, la composición y propiedades físico-químicas del medio de germinación, y en ocasiones se han observado resultados opuestos (Bressuire-Isoard et al., 2018b). Algunos autores han demostrado que *Bacillus spp.* obtenidos a temperaturas de esporulación inferiores a las óptimas germinan más rápido que los obtenidos a temperaturas altas. Estudios como los de Isticato et al., (2020) muestran que esporos de *B. subtilis* producidos a 25 °C tenían una germinación más rápida que los producidos a 42 °C además de observar otros cambios en sus propiedades tanto funcionales como estructurales, los esporos producidos a 25 °C eran más hidrofóbicos y poseían un córtex más compacto y laminar, a diferencia de los producidos a 42 °C que eran menos hidrofóbicos y tenían un córtex más grueso y granular. Esto también

se confirma con estudios de Bressuire-Isoard et al., (2016), los esporos de *B. subtilis* germinaban más rápido si habían esporulado a 20 °C que a 37 °C, aunque lo atribuyeron directamente a la presencia de la proteína CotE que es importante en el ensamblaje del exosporio y vieron que con la eliminación de esta proteína la germinación se veía afectada. Además, esta se encontraba en proporciones diferentes en los esporos formados a distinta temperatura, estando más representada en las de 20 °C.

Sin embargo, otros autores han observado el comportamiento contrario, los esporos producidos a mayor temperatura germinan más rápido que los obtenidos a las temperaturas más bajas. Esto lo podemos comprobar con los estudios de Ramirez-Peralta et al., (2012) cuya investigación muestra que los esporos de *B. subtilis* producidos a 23 °C, poseían una germinación más lenta con respecto a los producidos a 37 °C. Esto lo asociaron principalmente a los receptores de germinación, cuyo nivel más bajo está asociado a una germinación menor, y estaban presentes en menor proporción en los esporos producidos a temperatura más baja. Esta hipótesis también fue confirmada por Garcia et al., (2010), que realizaron la esporulación de *B. weihenstephanensis* a diferentes temperaturas y obtuvieron que cuanta más temperatura de esporulación, más rápida era la germinación posterior, concluyendo que era la información localizada en su genoma lo que determinaba este comportamiento.

Además, las membranas de los esporos también ejercen un papel importante en la germinación, como pudieron observar Planchon et al., (2011), al ver que los esporos de *B. cereus* esporulados a 10 °C germinaban de manera más eficiente que los de 30 °C y que los primeros presentaban cambios en la composición de ácidos grasos localizados en la MI que desencadenaban cambios conformacionales en la membrana, provocando así un acceso diferente a las proteínas de membrana en el esporo. Además, definieron que la temperatura de esporulación modificaba la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la germinación.

En cuanto a la germinación inducida por agentes químicos, Ramirez-Peralta et al., (2012) mostraron que en la germinación con dodecilamina, los esporos de *B. subtilis* producidos a 23 °C eran más rápidos que los producidos a 37 °C, aunque obtuvieron resultados contrarios con la germinación con otros nutrientes como el CaDPA, esto se ha atribuido a diferencias en la estructura y composición de la MI de los esporos que sufría modificaciones dependiendo de la temperatura de esporulación.

El efecto del pH en la cinética de germinación ha sido mucho menos estudiado. Esto concuerda con la idea de que la velocidad de reactivación de la célula germinada viene determinada por los recursos que posee el esporo, que dependen notablemente de las condiciones de esporulación. Baweja et al., (2008) realizaron la germinación de esporos de *B. anthracis* esporulados a pH 5, 7 y 9 y no observaron diferencias significativas en cuanto a la velocidad de germinación con respecto al control. A su vez, Trunet et al., (2020), mostraron que los esporos de *B. weihenstephanensis* esporulados a pH 5,5 tenían una menor germinación que a pH 7. De hecho, detectaron menor proporción de proteínas SpoV en los de pH 5,5. El hecho de tener menor cantidad de estas proteínas podría provocar una liberación excesiva de CaDPA y por lo tanto una menor capacidad para germinar. Además, presentaron también niveles más bajos de proteínas del metabolismo general. Otros resultados que obtuvieron fue la menor abundancia de la enzima SleB lítica del córtex en los esporos producidos a pH 5,5, que es una enzima esencial para la hidrolisis de la corteza durante la germinación.

Se ha descrito también en algunos esporos que poseían un patrón de crecimiento y germinación diferentes un contenido mayor de ARN ribosómico y proteínas, que posiblemente se hayan creado durante el proceso de esporulación. Aunque no se ha asociado directamente con las diferentes condiciones de esporulación, se puede llegar a la conclusión de que una mayor carga molecular reunida en el interior del esporo está asociada directamente con la reactivación de este (Bressuire-Isoard et al., 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que la duración de la fase de “outgrowth” de esporos de *B. subtilis* frente a L- alanina depende de la cantidad acumulada durante la esporulación de la enzima L-alanina deshidrogenasa, la cual convierte la L-alanina en piruvato (Mutlu et al., 2018).

En cuanto al efecto de la a_w de esporulación en la germinación, no existen estudios al respecto, salvo los resultados obtenidos por el grupo de investigación A03_20 (datos no publicados). Los esporos de *B. subtilis* producidos a a_w reducida (0,98), bien sea por la adición de sal o glicerol, germinan a mucha menor velocidad y en menor proporción frente a nutrientes específicos como L-alanina y AGFK (Fig. 3). En cambio, en medios ricos en nutrientes como el caldo nutritivo, los esporulados a a_w 0,98 con sal germinan a más velocidad que los esporulados a a_w óptima, mientras que los obtenidos a la misma a_w con glicerol germinan peor. Además, todos los esporos producidos a baja a_w , bien con sal como con glicerol, tienen dificultades para germinar con CaDPA.

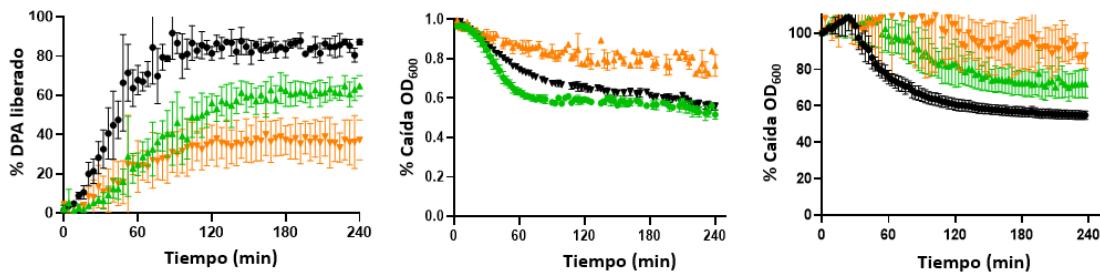


Figura 3: Germinación con baja a_w (negro), sal (verde) y glicerol (naranja), en L-alanina, caldo nutritivo y CaDPA respectivamente.

Por último, si el medio en el que se ha producido la esporulación es pobre en nutrientes, los esporos germinan más lentamente que los producidos en un medio rico en nutrientes (Hornstra et al., 2006). Esto se atribuyó a que los esporos poseen un menor número de receptores de germinación y GerD cuando esporulan en medios pobres en nutrientes. De hecho, se ha demostrado en *B. subtilis* que la sobreexpresión de los genes que codifican estos receptores provoca un aumento de la germinación de los esporos Bressuire-Isoard et al., (2018). Además, esporos de *B. subtilis* en medios enriquecidos de nutrientes como los aminoácidos y la glucosa presentan mayor expresión de operones Ger que causan variaciones en el número de proteínas receptoras de germinantes y que la sobreexpresión de estos provoca un aumento de la germinación de los esporos (Bressuire-Isoard et al., 2018).

En resumen, podemos afirmar que los cambios en el entorno de esporulación desencadenan profundas alteraciones en la composición y estructura de los esporos y determinan tanto su resistencia como su capacidad de germinación. Como los esporos son estructuras metabólicamente inertes, es predecible que los cambios de comportamiento derivan de adaptaciones metabólicas y fisiológicas de las células madre al encontrarse en condiciones de esporulación no óptimas, y que de alguna forma se reflejan en los esporos resultantes. Por ello, resulta muy interesante conocer las respuestas de adaptación de las células vegetativas y como éstas influyen en las propiedades de los esporos. Entre los factores ambientales mencionados, la reducción de la a_w del medio de esporulación tiene una gran relevancia en el campo de la seguridad alimentaria, ya que los esporos producidos a baja a_w son más resistentes al calor y resulta difícil inducir su germinación para posteriormente aplicar tratamientos de inactivación de intensidad moderada. Además, los esporulados en sal parecen germinar incluso a mayor velocidad en medios nutritivos como pueden ser los alimentos.

1.6. Respuesta al estrés osmótico en células vegetativas

La respuesta al estrés osmótico, principalmente frente al cloruro sódico, ha sido ampliamente estudiada en *B. subtilis* como organismo modelo para las bacterias Gram positivas. Se distinguen dos tipos de adaptación al estrés osmótico en función de su intensidad y tiempo de exposición: la respuesta frente a choques osmóticos con concentraciones de solutos suficientemente altas para inhibir el crecimiento e incluso inactivar las células si el estrés persiste y la respuesta frente a estreses osmóticos a concentraciones de solutos subinhibitorias, que permite que las células puedan seguir multiplicándose aunque el estrés persista. En este apartado, nos centramos en este último escenario, ya que para esporular en medios de baja a_w las células madre tienen que adaptarse y ser capaces de multiplicarse en este ambiente. Es importante destacar que los aumentos de salinidad externa ralentizan el crecimiento de *B. subtilis* y reducen la eficiencia de la esporulación, es decir, hay una menor proporción de células que inician la esporulación (Hoffmann y Bremer, 2016). Esto probablemente se deba a que, en medios de alta salinidad, las células vegetativas podrían no poseer los suficientes recursos energéticos y biosintéticos para completar la esporulación (Hoffmann y Bremer, 2016), aunque de acuerdo con nuestros resultados, aquellas que lo consiguen, dan lugar a esporos con ciertas ventajas como la supervivencia a tratamientos térmicos (Hoffmann y Bremer, 2016).

Las células vegetativas cuentan con una membrana semipermeable por la que puede pasar el agua de manera libre, pero no los iones, nutrientes o metabolitos. Las bacterias se adaptan a los cambios de osmolaridad de su entorno desencadenando flujos de agua entre el interior y el exterior de la célula para mantener una turgencia e hidratación determinada dentro de la fisiología aceptable de la célula. Una alta osmolaridad externa causa deshidratación, disminución en la turgencia y en casos extremos plasmólisis. Las bacterias pueden controlar los intercambios de agua entre el interior y exterior de la célula modulando la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos, ya sea desechándolos con la apertura de canales específicos o mediante su acumulación (Hoffmann y Bremer, 2016). Además, las células vegetativas ponen en marcha otros mecanismos de adaptación al estrés osmótico relacionados con las propiedades de la pared y membrana citoplasmática, estrés oxidativo, metabolismo y motilidad (Rath et al., 2020).

La primera respuesta de las células vegetativas de *B. subtilis* al encontrarse frente al estrés osmótico es la captación de K^+ a través de los sistemas de transporte KtrAB y KtrCD para

restaurar la presión osmótica interna. La alta concentración de K⁺ intracelular no es compatible con algunas de las funciones celulares, y por tanto *B. subtilis* reemplaza el K⁺ por solutos compatibles, también conocidos como osmolitos. Éstos son compuestos altamente solubles que no interfieren en la fisiología celular y que pueden ajustar el potencial osmótico intracelular. Estos solutos pueden sintetizarse, ya sea a partir de precursores o “de novo”, así como absorberse del medio a través de transportadores osmóticamente inducibles (OpuA, OpuB, OpuC, OpuD, OpuE) (Nagler et al., 2016). En general, los osmolitos más importantes para *B. subtilis* son la glicina betaina y la prolina. La prolina es el único osmolito que solo se puede sintetizar “de novo” a través de dos enzimas denominadas ProH y ProJ (Hahne et al., 2010), mientras que la glicina betaina se puede sintetizar a partir de su precursor colina, que se importa del exterior, a través de las enzimas GsbA y GsbB. La prolina se puede importar del medio principalmente a través del sistema OpuE, mientras que la glicina betaina se puede incorporar a partir de los transportadores OpuA, OpuC y OpuD. La colina se importa también a través de OpuC, y de su transportador específico OpuB (Hoffmann y Bremer, 2016).

La alta salinidad también induce cambios en la composición de la membrana citoplasmática. Principalmente, aumenta la proporción de los ácidos grasos saturados e insaturados y disminuye la de los ácidos grasos ramificados. Esto es debido a los cambios en la expresión de los genes involucrados en la degradación o síntesis de estos compuestos (Nagler et al., 2016). Estos cambios modifican las propiedades biofísicas de la membrana reduciéndose la fluidez de esta, reforzando así la barrera de permeabilidad para evitar la entrada de NaCl y para evitar la salida de los osmolitos útiles (Lopez et al., 2000). En relación con la estructura de la pared, no se ha visto que varíe la composición del peptidoglicano, aunque si un aumento en el espesor de ésta, de forma que al ser menos compacta disminuye el efecto de los cambios de osmolaridad y mejora la captación de osmolitos a través de la pared (López et al., 1998).

El hierro es un oligoelemento esencial en todas las especies bacterianas. En muchos ambientes, este no se encuentra biodisponible debido a su baja solubilidad y las bacterias han tenido que desarrollar sistemas para la síntesis de quelantes de hierro. Sin embargo, las células tienen que controlar rigurosamente el contenido de hierro intracelular, ya que un exceso en presencia de oxígeno estimula la formación de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, que son tóxicos y provocan daños en el ADN y las membranas celulares (Hoffmann et al., 2002). Por ello, *B. subtilis* posee la proteína Fur, que es un regulador transcripcional que

controla múltiples genes relacionados con la homeostasis del hierro (Nagler et al., 2016). En condiciones de alta salinidad, las células experimentan una limitación de este compuesto debido a la baja solubilidad del hierro en altas concentraciones de sal, lo que provoca una inducción del regulón Fur (Rath et al., 2020). Se ha demostrado que Fur induce la expresión de los genes *fhuD*, *fhuB*, *feuA*, *yfiY* e *yfmC*, que codifican transportadores de hierro exógeno cuando *B. subtilis* se enfrenta al estrés salino (Hoffmann et al., 2002).

Muchas de las respuestas de adaptación de *B. subtilis* se ponen en marcha a través de la activación de factores sigma alternativos que dirigen la actividad de la ARN polimerasa hacia la expresión de regulones específicos que se activan en determinadas condiciones de estrés (Nagler et al., 2016). El factor Sigma B (SigB) se activa cuando las células detectan ciertos estreses ambientales, tales como la hipersalinidad, cambios de temperatura y pH del medio, y proporciona resistencia a múltiples estreses de manera inespecífica (Hahne et al., 2010). En respuesta al estrés osmótico, *B. subtilis* activa en primer lugar la respuesta al estrés gobernada por el factor SigB, pero si el estrés persiste a concentraciones subinhibitorias, después predomina la actividad del factor Sigma A (SigA), que controla los genes esenciales para mantener el metabolismo basal y la división celular (Nagler et al., 2016). SigB controla la expresión de múltiples genes relacionados con la resistencia al estrés osmótico. SigB, junto a SigA, regula la expresión de los operones que dan lugar a OpuE y OpuD, que son los transportadores de glicina betaína y de prolina, respectivamente, mientras que la expresión de OpuA, OpuB y OpuC solo depende de SigA (Rath et al., 2020).

Además de SigB, existen otros factores sigma, cuyos regulones poseen una función extracitoplasmática como SigW, SigX o SigM. Diversos estudios han demostrado que las células expuestas a ambientes salinos inhiben la actividad de SigX y aumentan la de SigW y SigM, aunque en el último caso solo se observa de forma transitoria en estreses salinos prolongados (Nagler et al., 2016). También se ha observado que la actividad del factor SigD, que controla genes implicados en la regulación de la quimiotaxis y en la motilidad, se reduce en condiciones de alta salinidad (Nagler et al., 2016).

El sistema de sensor kinasa de dos componentes DegS/DegU está involucrado en la regulación de numerosos procesos celulares, entre los que destaca la transición de fase exponencial a estacionaria (Nagler et al., 2016). Además, este sistema está implicado en la detección y respuesta frente al estrés salino, y estudios realizados por Hoffmann et al., (2002) muestran

que la producción de varias enzimas degradativas extracelulares está regulada de manera dependiente por DegS/DegU a altas concentraciones salinas. Aun así, este sistema regula gran cantidad de genes y posee numerosas funciones como el desarrollo de biofilms o la motilidad flagelar, por ello, es complicado determinar específicamente la función de DegS/DegU durante la adaptación al estrés salino (Nagler et al., 2016).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido a la importancia que tiene el control de los esporos bacterianos para conseguir alimentos seguros y de mantener sus propiedades organolépticas, es de gran interés conocer su respuesta frente a los tratamientos térmicos de inactivación y la germinación. Uno de los principales problemas para predecir con precisión el comportamiento de los esporos es la gran variabilidad en resistencia al calor y velocidad de germinación que existe entre los esporos que contaminan los alimentos, que en parte deriva de las condiciones ambientales en las que se han formado. Estudios recientes del grupo A03_20 han demostrado que los esporos producidos a baja a_w , especialmente con sal, tienen una mayor resistencia al calor y germinan más lenta y heterogéneamente en distintos nutrientes como L-alanina, L-valina y AGFK. Sin embargo, se desconoce cuáles son las causas moleculares de este comportamiento. Debido a que los esporos son células ametabólicas, los cambios estructurales y moleculares que determinan el comportamiento de los esporos producidos a a_w reducida tienen que ser adquiridos durante la esporulación. Por otro lado, la célula madre, para mantenerse viable y multiplicarse hasta llegar a esporular en condiciones ambientales adversas, como la alta salinidad, necesita poner en marcha una serie de respuestas al estrés que pueden afectar a las propiedades del esporo. Aunque las respuestas de adaptación al estrés osmótico en células vegetativas de *B. subtilis* han sido ampliamente estudiadas, no se sabe si éstas podrían contribuir a la mayor termorresistencia y menor velocidad de germinación de los esporos de la progenie. Por ello, este trabajo se centró en estudiar el impacto que tienen las respuestas de adaptación más importantes para mantener la homeostasis celular frente a una salinidad elevada en las propiedades de los esporos.

Para ello, se diseñaron mutantes y condiciones ambientales de esporulación que permitieran poner en marcha las respuestas frente al estrés osmótico, sin necesidad de exponer a las células madre a la sal: el incremento de la actividad SigB y SigW, el descenso de la actividad

SigX, el aumento de la concentración de osmolitos intracelulares, el aumento de la concentración de hierro intracelular y el descenso de la fluidez de la MI. Para aumentar la actividad del factor SigB y SigW, se optó por usar mutantes que carecían de uno de los represores de la compleja cascada de activación de estos factores sigma, RsbS (*rsbS::erm*) y RsiW (*rsiW::erm*), respectivamente. Por otro lado, la inhibición de la actividad SigX, que junto con SigW realiza su actividad en el espacio extracitoplasmático y controla la fuerza aniónica de la membrana citoplasmática, se utilizó un mutante carente del gen que codifica a este factor (*sigX::erm*). Para aumentar los niveles de hierro intracelulares, se utilizó un mutante carente del regulador Fur (*fur::erm*), el cual controla la homeostasis celular de este mineral. También se diseñó un doble mutante “knock-out” que careciera de los represores OpcR y GbsR (*opcR::erm/gbsR::kan*) para aumentar la concentración de osmolitos en el protoplasto de los esporos. Ambos son los represores transcripcionales de los operones OpuC y OpuD, encargados de la importación de osmolitos como la glicina betaína (GB) y su precursor la colina. Además, GbsR es el represor del operón que codifica las enzimas GsbA y GsbB, que se encargan de la síntesis de GB. También se probó a suplementar el medio con GB, ya que este es uno de los osmolitos más abundantes en *B. subtilis*. Finalmente, para estudiar el efecto de la fluidez de la membrana interna, se utilizaron mutantes que permitieran controlar la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados. Uno de ellos carecía de la enzima desaturasa (*des::kan*), encargada de insaturar los ácidos grasos y por tanto de mantener la fluidez de membrana ante situaciones de estrés. Por otro lado, se utilizó la construcción *desK::kan/P_{Km}-desR* para inducir la formación de ácidos grasos insaturados. La expresión de Des depende del sistema de dos componentes DesK-DesR, compuesto por un sensor kinasa (DesK) y del activador de la transcripción del gen *des* (DesR). Esta cepa carece del sensor DesK para que la expresión del gen *des* sea insensible a los cambios extracelulares, y posee el gen *desR* bajo el control de un promotor inducible por kanamicina. Además de suplementar el medio de cultivo con kanamicina, se añadieron aminoácidos precursores de ácidos grasos ramificados iso o anteiso, cuya proporción también contribuye a modular la fluidez de la membrana.

Además de la construcción de las cepas, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la cinética de inactivación de los esporos bacterianos de estos mutantes frente al calor, y así poder identificar que respuestas celulares contribuirían a aumentar la resistencia de los esporos producidos a a_w reducida.
- Determinar la resistencia de los esporos a la dodecilamina, como agente químico de inactivación de los esporos.
- Estudiar la velocidad de germinación de los esporos bacterianos de los mutantes frente a diferentes estímulos nutritivos y no nutritivos, y así poder identificar que respuestas celulares contribuirían a reducir la velocidad de germinación de los esporos producidos a a_w reducida.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo, así como la descripción de su genotipo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Descripción específica de las cepas utilizadas. BGSC: *Bacillus Genetic Stock Centre*. BKK, BKE: *Genome - Scale deletion library with kanamycin or erythromycin and lincomycin, respectively*, (Koo, B.-M. et al., 2017).

| Nombre | Cepa | Descripción | Fuente |
|------------------------|------------------|---|------------|
| <i>B. subtilis</i> 168 | Wild type (WT) | Cepa parental | BGSC (1A1) |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>fur::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>fur</i> por el “cassette” de resistencia a la eritromicina y lincomicina | BKE23520 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>sigX::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>sigX</i> por el “cassette” de resistencia a la eritromicina y lincomicina | BKE2310 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>rsbS::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>rsbS</i> por el “cassette” de resistencia a la eritromicina y lincomicina | BKE04680 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>rsiW::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>rsiW</i> por el “cassette” de resistencia a la eritromicina y lincomicina | BKE01740 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>opcR::kan</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>opcR</i> por el “cassette” de resistencia a la kanamicina | BKK33840 |

| | | | |
|------------------------|--------------------------------------|--|--------------|
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>gbsR::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>gbsR</i> por el “cassette” de resistencia a la eritromicina y lincomicina | BKE31070 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>opcR</i> por el “cassette” de resistencia a la kanamicina y con reemplazo del gen <i>gbsR</i> por el cassette de resistencia a la eritromicina y lincomicina | Este trabajo |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>des::kan</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con reemplazo del gen <i>des</i> por el “cassette” de resistencia a la kanamicina | BKK19180 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>desK::kan/P_{Km}-desR</i> | <i>B. subtilis</i> 168 con modificación del sistema de dos componentes Desk-DesR. | Este trabajo |

3.1.1. Construcción del doble mutante mediante transducción con fagos

Se realizó la construcción del doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm* mediante transducción con fagos. Para ello, se incorporó en la cepa *opcR::kan* la mutación *gbsR::erm* de acuerdo al protocolo de transducción con fagos descrito por Rowan-Nash Aislinn et al., (2019) con algunas modificaciones.

Se realizó un cultivo del mutante *gbsR::erm* en caldo TY (LB suplementado con MgSO₄ 1M (Panreac, Barcelona, España) y MnSO₄ 0,1M (Panreac, Darmstadt, Alemania) y se incubó durante 3 h a 37 °C con una agitación de 130 rpm hasta que alcanzó suficiente turbidez. A 200 µL del cultivo se añadieron 100 µL de diluciones seriadas del stock de fagos (Bacillus Genetic Stock Center, SPP1-1P7, Ohio, Estados Unidos) y se incubaron 30 min a 37 °C en estático. El cultivo con los fagos se incubó en 3 ml de agar TY al 0,5 % sobre placas de TY con 1,5 % agar a 37 °C, 24 h. Se seleccionaron las placas óptimas y se vertieron 3 ml de caldo TY para recoger los fagos raspando la superficie. Los fagos se recuperaron mediante centrifugación a 5000 x g durante 10 min en la centrifuga (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Alemania). El sobrenadante se trató con 25 µg/ml de DNasa (ThermoScientific, Massachusetts, Estados Unidos) durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizó un cultivo del mutante *opcR::kan* en 2 ml de caldo TY y se incubó durante 3 h a 37 °C con una agitación de 130 rpm hasta que alcanzó suficiente turbidez. Para la transducción, se mezclaron 1 ml del cultivo con diferentes volúmenes de fagos *gbsR::erm* (0,1, 1, 10 y 100 µL). Se incubó con 9 ml de caldo TY a 37 °C durante 30 min en estático y se centrifugó a 5000 x g durante 10 min en la centrifuga. Se sembraron 100 µL en

superficie en placas de agar TY suplementado con 10 mM de citrato de sodio y los antibióticos kanamicina (5 µg/ml), eritromicina (1 µg/ml) y lincomicina (12,5 µg/ml) para seleccionar los clones transducidos tras 24 h a 37 °C.

3.1.2. Confirmación de las cepas mediante PCR

Todas las cepas se confirmaron por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un volumen final de 20 µl mediante la enzima Dream Taq DNA polimerasa (ThermoScientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y ajustando los parámetros de temperatura de annealing y tiempo de elongación correspondientes a cada par de oligonucleótidos (Tabla 2). Para calcular las temperaturas de annealing y comprobar la ausencia de estructuras secundarias entre los oligonucleótidos se emplearon las herramientas web Thermo Fisher Scientific Calculator (Allawi y SantaLucia, 1997) e “integrated DNA Technologies oligo analyzer” (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Fanalyzer>).

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR para la comprobación de las cepas “knock-out”, junto con sus correspondientes temperaturas de annealing y longitud del amplicón. Fw: oligonucleótido forward. Rv: oligonucleótido reverse.

| Gen | Primers | Temperatura annealing (°C) | Longitud del amplicón |
|-------------|--|----------------------------|-----------------------|
| <i>fur</i> | Fw: 5' – GCTGTTCGTGAAACGAAGCC – 3' Rv: 5' – CTTTACAGCGGAGCCTTCC – 3' | 54,4 | 1000 bp |
| <i>rsbS</i> | Fw: 5' – CCTTCTTAATGGCGTCGTCA – 3' Rv: 5' – CCCTGGTCTTCCGCTATGA – 3' | 53,1 | 899 bp |
| <i>sigX</i> | Fw: 5' – CGAGTCTGAATTGCCGAAG – 3' Rv: 5' – ACGATGTCTGATCCAAGGAC – 3' | 52,4 | 1033 bp |
| <i>opcR</i> | Fw: 5' – TTTCTCCTCAGCTCAACCGG – 3' Rv: 5' – CGATCATGACAGCCGCATAA – 3' | 52,7 | 1270 bp |
| <i>gbsR</i> | Fw: 5' – TGTCAAATGCTCTACGTGCG – 3' Rv: 5' – AGACCATTCCGTTTGCTGG – 3' | 53 | 1290 bp |

| | | | |
|------------|---|------|---------|
| <i>des</i> | Fw: 5' – CCGCACGAGACATGACAAT – 3' Rv: 5' – ACAGAGTAATGGAGGCAGTT – 3' | 54,4 | 1532 bp |
|------------|---|------|---------|

El resultado de la PCR se reveló por electroforesis en gel de agarosa 1 % en TAE 1X (Tris acetato-EDTA buffer 10X; Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) mediante la sonda fluorescente SYBR Safe® (Invitrogen).

Adicionalmente, las cepas construidas en este trabajo se confirmaron mediante secuenciación a través de la empresa STABVIDA, tras la purificación de las muestras mediante la utilización del kit GeneJet PCR Purification (ThermoScientific).

3.2. Cultivos

Los microorganismos se conservaron en crioviales a -80 °C y para su utilización se realizaron estrías en agar nutritivo suplementado con 0,6 % de extracto de levadura (“Nutrient Agar - Yeast Extract”, NAYE, Oxoid, Madrid, España), incubándose a 37 °C durante 24 h.

Una colonia individual de la estría se pasó a medio líquido (pre-cultivo) en caldo nutritivo suplementado con 0,6 % de extracto de levadura y, tras 12 h a 37 °C y 130 rpm de agitación, se pasó a cultivo en el medio correspondiente, detallado a continuación, en proporción 1/100.

Para las cepas *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm* los cultivos se realizaron en 20 ml del medio líquido 2xSG (2xSchaeffer's medium glucose; Nicholson y Setlow, 1990) constituido por 10 g/L peptona bacteriológica (Oxoid), 6 g/L lab lemco (Oxoid), 2 g/L KCl y 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O (Panreac) y suplementado con glucosa 50 % (p/v) (Panreac), 0,1 M MgCl₂ (Panreac), 1 M Ca(NO₃)₂ (Panreac) y 1 mM FeSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E. U.)

Para las cepas *des::kan*, *desK::kan/P_{km}-desR* y el doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm*, la esporulación se realizó en un medio mínimo (Spizizen minimal medium) descrito en Subtiwiki (Spizizen minimal medium, 2016). Para las cepas de fluidez, cada bote de cultivo se suplementó con kanamicina 10 µg/ml y con 150 µM de los aminoácidos L-valina y L-leucina para *des::kan* y L-isoleucina para *desK::kan/P_{km}-desR* (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos). El doble mutante, se esporuló en el medio mínimo suplementado con y sin glicina betaína (GB) 1 mM.

Todos los cultivos se incubaron a 37 °C, excepto las cepas *des::kan* y *desK::kan/P_{Km}-desR* que se incubaron a 30 °C, 130 rpm de agitación y hasta que alcanzaron el recuento máximo de esporos.

3.2.1. Elaboración de las curvas de esporulación

Para la determinación del punto óptimo de recogida de las suspensiones, se obtuvieron las curvas de esporulación de cada muestra por seguimiento del recuento de esporos a lo largo del tiempo de incubación. Se estableció como punto óptimo tras observar el máximo recuento de esporos estabilizado en el tiempo. El seguimiento se realizó mediante recuento tanto por microscopía por contraste de fases (Nikon Eclipse E400, Nikon Inc., Tokio, Japón), como por placa, antes y después de un tratamiento de pasteurización de 10 min a 75 °C en un termobloque (Accutherm Microtube Shaking Incubator, Labnet international, China).

Se sembraron 100 µl de cada muestra en placas de NAYE mediante homogeneización en masa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El número de unidades formadoras de colonia (UFC) por placa se determinó con un contador de colonias por análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido). El máximo porcentaje de esporulación se determinó relacionando los recuentos de las muestras pasteurizadas respecto a los recuentos sin tratamiento térmico.

3.2.2. Obtención de las suspensiones de esporos

Una vez determinado el punto óptimo de recogida, se recogieron las suspensiones de esporos de cada cepa. Para concentrar las suspensiones, se realizaron 4 lavados mediante centrifugaciones de 20 min, 4000 rpm a 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Alemania) y se resuspendieron con agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó una purificación por centrifugación en gradiente de densidad para eliminar los restos de células vegetativas. Para ello, los esporos se resuspendieron en 200 µL de Nycodenz al 20 % (Serumwerk, Bernburg, Alemania) y se depositaron sobre la superficie de un volumen de 2,5 ml de Nycodenz al 50 %. Tras centrifugar durante 45 min, 4000 rpm a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Adicionalmente, se realizaron dos lavados con agua destilada a 6000 rpm durante 2 min para eliminar los residuos de Nycodenz y se evaluó la pureza de las suspensiones por microscopía.

Posteriormente, las suspensiones se ajustaron a densidad óptica de 1 (OD_{600}) utilizando un lector de placas TECAN (Tecan Genius, Männedorf, Suiza) realizando las diluciones correspondientes con agua destilada y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.3. Cinética de inactivación de los esporos por calor

La determinación de la resistencia al calor de los esporos se realizó con un termorresistómetro (Condón y col, 1993) modificado (Equipo Mastía, Universidad Politécnica de Cartagena) (Conesa y col., 2009). Este equipo se basa en una cámara de tratamiento de 400 ml de volumen, una resistencia para calentar el medio hasta una temperatura establecida, una entrada a presión regulada con un manorreductor para trabajar a temperaturas superiores a la de la ebullición del agua a presión atmosférica, un sistema de agitación para garantizar una correcta homogeneización del medio, un sistema de refrigeración, un sonda de temperatura, un sistema de extracción de muestras (necesario para la toma de muestras en diferentes tiempos a lo largo del tratamiento) y un sistema de inyección del inóculo con el que se trabaja.

La cámara de tratamiento se llenó con un medio de tampón citrato-fosfato (McIlvaine) a pH 7 y se esterilizó a 120 °C durante 10 min. Posteriormente, la cámara de tratamiento se estabilizó a la temperatura establecida para realizar el tratamiento. Una vez alcanzada, se inocularon 0,2 ml de la suspensión deseada en la cámara de tratamiento mediante una jeringuilla esterilizada desechable (Terumo Europe España S.L., Madrid, España). Durante el tratamiento, se extrajeron a distintos tiempos muestras de 0,2 ml en placas de Petri estériles, que se sembraron por homogeneización en masa con NAYE y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante un contador de colonias por análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido). Tras el recuento de las placas, se elaboraron las gráficas de supervivencia, representando la fracción de los supervivientes frente al tiempo de tratamiento en minutos. La fracción de supervivientes se calculó como $\log(N_t/N_0)$, donde N_t y N_0 representan el número de supervivientes (UFC/placa) tras un determinado tiempo de tratamiento (t) y al inicio del tratamiento ($t=0$), respectivamente.

Las gráficas de supervivencia frente al calor presentaban un hombro antes de la fase de inactivación exponencial, y se optó por ajustar la cinética de inactivación al modelo “log-linear + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000). Este modelo (Ecuación 1) permite describir de forma independiente la longitud del hombro, a través del parámetro Sl expresado en minutos, y la velocidad de inactivación de la fase de caída exponencial, a través del parámetro K_{max} expresado en min^{-1} :

$$\log N_t = \log N_0 - \frac{K_{max} t}{\ln 10} + \log \left(\frac{e^{K_{max} Sl}}{1 + (e^{K_{max} Sl} - 1)e^{-K_{max} t}} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Los valores D_T , definido como el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico de la población microbiana, se estimaron con la siguiente fórmula:

$$D_T = Sl + \frac{2,303}{K_{max}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Del mismo modo, se calculó el valor $3D_T$, definido como el tiempo necesario para inactivar tres ciclos logarítmicos de la población microbiana:

$$3D_T = Sl + 3\left(\frac{2,303}{K_{max}}\right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Además, se calculó el valor z , definido como el número de grados que se necesita aumentar la temperatura para que el valor D_T se reduzca a la décima parte. Este parámetro se calcula a través de la inversa negativa de la pendiente de la gráfica de termodestrucción, la cual se obtiene representando el logaritmo del valor D_T frente a la temperatura de tratamiento.

El ajuste de los parámetros del modelo a las curvas de supervivencia se llevó a cabo a través del software GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Para evaluar la bondad del ajuste se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz del error cuadrático medio (RECM) con el mismo software.

3.4. Inactivación con dodecilamina

La inactivación con dodecilamina se determinó tras eliminar el “coat” de los esporos por un procedimiento químico, ya que esta estructura protege frente a este agente químico (Mokashi

et al., 2020) cambios en la estructura del “coat” podrían conducir a errores en la interpretación de los resultados.

En primer lugar, la extracción del coat se realizó a partir de las suspensiones concentradas de 10^9 UFC/ml que se resuspendieron en la solución de tratamiento compuesta por 100 mM NaCl (Panreac, Barcelona, España), 100 mM NaOH (Emsure, Darmstadt, Alemania), 100 mM DTT (1,4-dithiothreitol, Amersham biosciences) y 5 g/l SDS (dodecilsulfato sódico, Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Se incubaron las muestras con la solución de tratamiento durante 30 min a 65 °C con una agitación de 500 rpm en un termobloque (Accutherm Microtube Shaking Incubator, Labnet international, China). Posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada para eliminar la solución de tratamiento durante 5 min a 23 °C y 12000 rpm en una centrífuga (Centrifuge 5418R, Hamburg, Alemania). Finalmente, se realizaron una serie de diluciones seriadas y se sembraron e incubaron a 37 °C durante 24 h en placas de NAYE con diferentes concentraciones de lisozima (5 g/l, 10 g/l, 15 g/l y 20 g/l) y sin lisozima para confirmar la extracción del coat.

Las muestras de esporos sin coat a la misma concentración se trataron en un volumen final de 500 µl de una solución de tratamiento compuesta por 5 % DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos), 250 mM NaCl (Panreac, Barcelona, España), 25 mM Tris-HCl pH 9 (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y 20 mM dodecilamina diluida en DMSO (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

El ensayo se realizó a 45 °C, 500 rpm de agitación en termobloque (Accutherm Microtube Shaking Incubator, Labnet international, China) tomando muestra a tiempo inicial (t_0) y a las 3 h de tratamiento. A cada tiempo, se diluyó una alícuota de la suspensión tratada en SDS (dodecilsulfato sódico, 275 µg/ml) para inactivar la dodecilamina. Además, se realizaron 4 diluciones seriadas adicionales en agua destilada estéril, se sembraron 100 µl de las muestras en placas de NAYE por homogeneización en masa y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante un contador de colonias por análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido). Tras el recuento de las placas, se elaboraron las gráficas de inactivación, representando los ciclos logarítmicos de inactivación alcanzados. Para ello, se calculó la fracción de los esporos inactivados como Log (N_t/N_0), donde N_t y N_0 representan el número de supervivientes

(UFC/placa) tras un determinado tiempo de tratamiento (t) y al inicio del tratamiento (t=0), respectivamente.

3.5. Cinética de germinación

Se evaluó la cinética de germinación de las suspensiones de los esporos frente a distintos nutrientes y agentes químicos. Los nutrientes que se utilizaron fueron un medio de extracto de levadura al 1,2 % y 50 g/L de caldo nutritivo suplementado con ampicilina (“Nutrient broth - yeast extract”, NBYE, Oxoid, Madrid, España), L-alanina (100 mM), L-valina (100 mM) (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y una mezcla de L-asparagina (100 mM), D-glucosa (100 mM), D-fructosa (100 mM) y KCl (100 mM) (denominada AGFK; Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos), disueltos en agua destilada.

Como agente químico se utilizó dipicolinato cálcico (CaDPA). Por un lado, se preparó una disolución 50 mM de ácido dipicolínico disuelto en tampón HEPES (21,6 mM) a pH 7 (Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico; Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y, por otro lado, una disolución 0,05 M de CaCl₂ en agua destilada. Todas las soluciones de nutrientes y CaDPA se esterilizaron por filtración. Las cinéticas de germinación se monitorizaron tanto por densidad óptica como por fluorimetría con TbCl₃.

3.5.1. Curvas de germinación por densidad óptica

Esta técnica se basa en cuantificar la proporción de esporos que germinan mediante cambios en absorbancia a 600 nm. Los ensayos se llevaron a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 150 µl, con 75 µl de la suspensión de esporos ajustada a una densidad óptica OD₆₀₀ de 1, 15 µl del germinante a estudiar y 60 µl de tampón HEPES 54 mM pH 7.

Las placas se incubaron en un lector de placas (CLARIOstar plus BMG labtech, Madrid, España) programado para hacer lecturas de absorbancia a 600 nm a lo largo del tiempo (Abs_t, 240 min) cada 3 min y agitar la muestra 1 minuto antes de cada medida. El equipo se ajustó a 37 °C en el caso de la germinación con nutrientes y a 30 °C para la germinación inducida por CaDPA.

Como control, en cada ensayo se incluyó una muestra con esporos y agua destilada, sin agentes germinantes, para confirmar que los cambios de absorbancia observados se debían a la germinación y no a la precipitación de los esporos. Una vez obtenidos los datos, se calculó el

porcentaje de descenso de la absorbancia con respecto a los valores iniciales ($t=0$) a lo largo del tiempo:

$$\% \text{ caída Abs} = \frac{Abs_t}{Abs_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

3.5.2. Curvas de germinación por fluorimetría

Para verificar los cambios en la cinética de germinación de los mutantes con respecto a la cepa parental observados mediante espectrofotometría, se repitieron las curvas monitorizando la salida de DPA de los esporos con fluorimetría, utilizando TbCl_3 para su detección, basándose en la fluorescencia que emite el complejo Tb-DPA. Los ensayos se realizaron en placas multipocillo que se incubaron a 37 °C en el lector CLARIOstar plus. El equipo se programó para realizar medidas de fluorescencia a lo largo del tiempo (F_t , 240 min) cada 3 min, con una longitud de onda de excitación de 270 nm y una longitud de onda de emisión de 545 nm, y agitando la muestra 1 min antes de cada medida. En los pocillos se añadieron 150 μl de cada muestra, que contenían 25 μl de la suspensión de esporos ajustada a una densidad óptica OD_{600} de 1, 15 μl del germinante a estudiar, 60 μl del tampón HEPES pH 7 y 7,5 μl de TbCl_3 0,01M (Sigma Aldrich); los 150 μl finales se ajustaron con el volumen restante de agua destilada. En cada ensayo, se incluyó una muestra de esporos autoclavados para poder comparar el porcentaje de salida de DPA respecto al total que contenían los esporos (F_{Total}). Además, se midió la fluorescencia del blanco (F_{blanco}), conteniendo tampón HEPES pH 7 y TbCl_3 0,01 M en agua destilada. El porcentaje de salida de DPA, o el porcentaje de aumento de fluorescencia, a lo largo del tiempo para cada germinante se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ salida DPA} = \frac{(F_t - F_{\text{blanco}})}{(F_{\text{Total}} - F_{\text{blanco}})} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los resultados se ha llevado a cabo en el programa GraphPad Prism 8, comparando los correspondientes valores de la cepa parental con los respectivos mutantes. Para ello, se aplicó el test t-Student y se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un valor p-value < 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Curvas de esporulación de los mutantes de *B. subtilis*

Para conocer el punto óptimo de recogida de los esporos, es decir, cuando se alcanza el punto máximo del recuento, así como para estudiar el efecto de cada mutación en el rendimiento de esporulación, se elaboraron las curvas de esporulación tanto por recuento en placa tras un tratamiento de pasteurización (Fig. 4) como por recuento microscópico (Anexo I). Las curvas se han agrupado y comparado de acuerdo con el medio y la temperatura de esporulación utilizado en cada cepa. La cinética de esporulación del mutante *rsiW::erm* en 2xSG a 37 °C no se incluye porque ésta se obtuvo en estudios previos del grupo de investigación A03_20.

Como se observa en la Fig. 4A, tanto la cepa WT como los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm* alcanzaron el mayor rendimiento de esporulación a las 36 h de incubación a 37 °C. A las 72 h, los recuentos microscópicos cayeron entre un 37 % y un 70 % debido a que los esporos formados germinaban en el medio de esporulación (Anexo I), aunque esta caída no se observaba mediante el recuento en placa debido a la menor precisión de la técnica (Fig. 4A). Además, no se observaron diferencias en cuanto a la concentración de esporos en el tiempo de recogida de estos mutantes respecto a la WT (Anexo I). El punto óptimo de recogida de los esporos en el doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm* y su cepa parental en el medio mínimo de Spizizen con y sin GB se determinó a las 48 h (Fig. 4B), y tras 96 h los recuentos microscópicos se redujeron más de un 90 % (Anexo I). Las cepas presentaron una concentración final de esporos similar, aunque ligeramente inferior en WT, sobre todo con GB (Anexo I). Cabe destacar que la cepa WT esporulaba más lentamente en el medio mínimo que en el medio 2xSG (Fig. 4), pero a punto final se obtenía el mismo rendimiento de esporulación e incluso algo superior en el medio mínimo sin la presencia de GB (Anexo I). Por último, el punto máximo de esporulación en la cepa *des::kan* en el medio mínimo de Spizizen con kanamicina y L-valina o L-leucina fue a las 72 h mientras que en la cepa *desK::kan/P_{Km}-desR* en el medio mínimo de Spizizen con kanamicina y L-isoleucina fue a las 96 h (Fig. 4C). No se observaron diferencias en la concentración final de esporos de la cepa *des::kan* esporulada con L-valina o L-leucina y *desK::kan/P_{Km}-desR* presentaba un rendimiento de esporulación 50 % menor que la cepa *des::kan* (Anexo I). El hecho de que estos dos mutantes esporulaban más lentamente que el resto de cepas en el medio mínimo puede deberse a que éstos se

esporularon a 30 °C en vez de 37 °C, ya que la expresión de *des* en células vegetativas se reduce cuando la temperatura de crecimiento es superior a 30 °C (Cortezzo et al., 2003), junto con el efecto de las distintas mutaciones y pequeñas variaciones en la composición del medio.

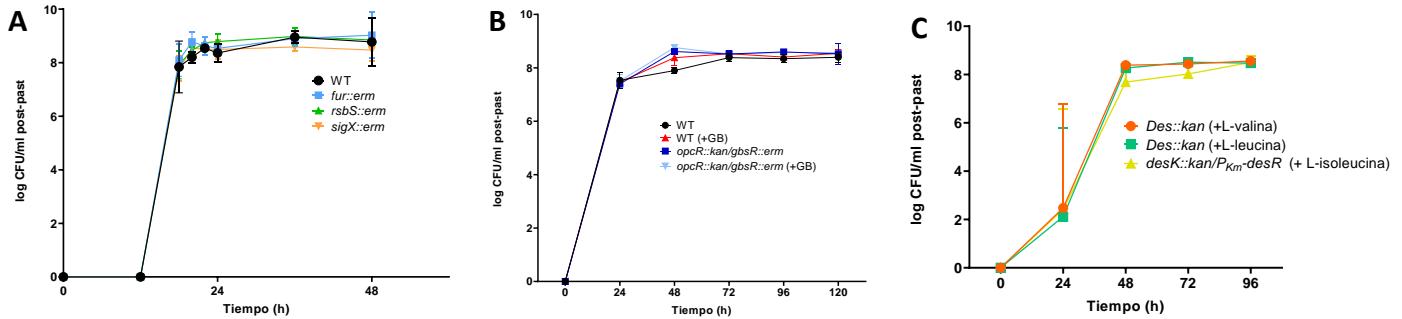


Figura 4: Curvas de esporulación de *B. subtilis* (WT) y los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm* y *sigX::erm* en 2xSG a 37 °C (A), *opcR::kan/gbsR::erm* en el medio mínimo de Spizizen con y sin GB a 37 °C (B) y *des::kan* en el medio mínimo de Spizizen con kanamicina y L- valina o L-leucina y *desK::kan/Pkm-desR* en el medio mínimo de Spizizen con kanamicina y L-isoleucina a 30 °C (C). Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas.

4.2. Resistencia al calor de los esporos mutantes de *B. subtilis*

4.2.1. Cinética de inactivación de los esporos de *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm*

Para realizar una primera exploración sobre las diferencias en resistencia al calor entre la cepa parental y los mutantes esporulados en medio 2xSG a 37 °C, se realizaron las curvas de supervivencia a 100,0 °C y a 105,0 °C (Fig. 5A y B). Como los esporos de las cepas *fur::erm*, *rsbS::erm* y *sigX::erm* y de la cepa *rsiW::erm* se obtuvieron en días distintos, junto con la correspondiente cepa parental, y se observaron diferencias en la resistencia al calor de la cepa parental esporulada en distintos lotes, en la Figura 5 se incluye la inactivación de la cepa parental obtenida en cada lote (una con los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm* y *sigX::erm* – WT, y otra con el mutante *rsiW::erm* – WT (*rsiW::erm*)). Como se observa, la mayoría de las gráficas de supervivencia no seguían la clásica cinética de inactivación log-lineal, sino que presentaba un hombro, es decir, los recuentos se mantenían invariables durante un tiempo antes de la fase de caída exponencial. Este fenómeno se ha asociado a la acumulación de daños subletales, hasta el punto en el que éstos superan la capacidad de reparación de las células y comienzan a morir (Condón et al., 1996; Feeherry et al., 1987).

Debido a la presencia de este hombro en las gráficas de supervivencia, se utilizó el modelo de Geerared et al. (2000) para obtener los parámetros cinéticos y así comparar la resistencia de las cepas. Este modelo permitió describir las gráficas de supervivencia a través de dos

parámetros (Tabla 3): SI, que representa la longitud del hombro y K_{\max} , que se define como la constante de inactivación de la fase de inactivación logarítmica. Además, se calculó el valor D_T y $3D_T$, tiempo para reducir uno y tres ciclos logarítmicos, respectivamente.

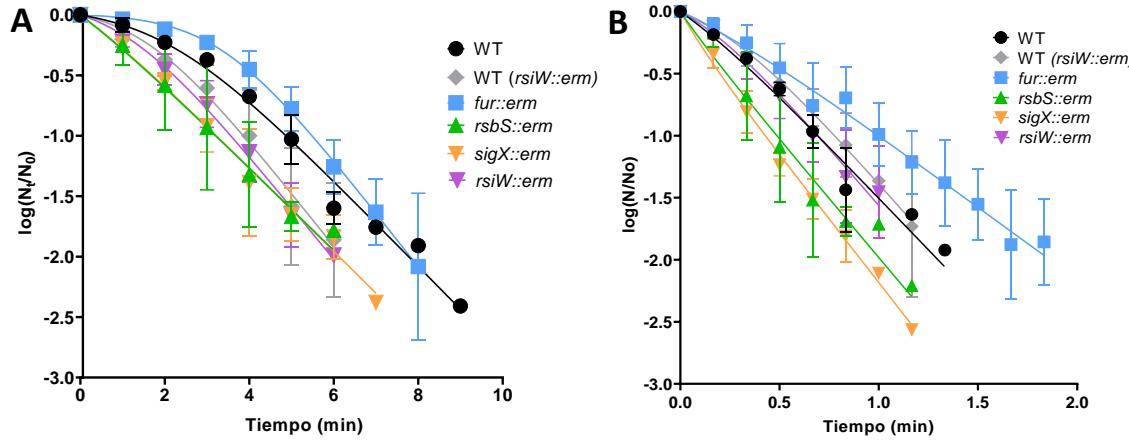


Figura 5: Gráficas de supervivencia a 100,0 °C (A) y 105,0 °C (B) de los esporos de *B. subtilis* (WT) y los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm*. Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas.

Tabla 3: Parámetros de resistencia y valores D_T y $3D_T$ obtenidos tras el ajuste del modelo de Geerared et al. (2000) a las curvas de supervivencia de los esporos de *B. subtilis* (WT) y los mutantes indicados a distintas temperaturas. Los datos muestran la media y desviación estándar de tres réplicas biológicas. Las diferencias significativas en los valores D_T y $3D_T$ entre cada uno de los mutantes y la cepa parental se muestran con un asterisco (*) si $p \leq 0,05$ o con dos (**) si $p \leq 0,01$.

| T (°C) | Cepa | SI (min) | K_{\max} (min ⁻¹) | D_T (min) | $3D_T$ (min) | R ² | RECM |
|--------|-------------------------|-------------|---------------------------------|----------------|---------------|----------------|-------|
| 100,0 | WT | 2,73 (0,27) | 1,04 (0,18) | 4,98 (0,28) | 9,48 (1,11) | 0,988 | 0,046 |
| | <i>fur::erm</i> | 3,29 (0,46) | 0,98 (0,15) | 5,67 (0,59) | 10,44 (1,18) | 0,995 | 0,026 |
| | <i>rsbS::erm</i> | 1,07 (1,38) | 1,13 (0,36) | 3,24 (1,08) * | 7,57 (1,46) | 0,993 | 0,016 |
| | <i>sigX::erm</i> | 1,05 (0,25) | 1,08 (0,4) | 3,35 (0,52) ** | 7,96 (1,98) | 0,997 | 0,020 |
| | WT (<i>rsiW::erm</i>) | 1,92 (0,82) | 1,14 (0,23) | 3,99 (0,86) | 8,14 (1,34) | 0,981 | 0,041 |
| | <i>rsiW::erm</i> | 1,51 (0,62) | 1,09 (0,06) | 3,63 (0,52) | 7,86 (0,36) | 0,992 | 0,019 |
| 105,0 | WT | 0,26 (0,06) | 6,28 (1,59) | 0,65 (0,04) | 1,42 (0,27) | 0,992 | 0,019 |
| | <i>fur::erm</i> | 0,22 (0,23) | 2,94 (0,42) | 1,01 (0,25) | 2,60 (0,39) * | 0,993 | 0,068 |
| | <i>rsbS::erm</i> | 0,13 (0,09) | 6,51 (1,65) | 0,50 (0,13) | 1,25 (0,32) | 0,989 | 0,035 |
| | <i>sigX::erm</i> | 0,05 (0,01) | 4,77 (0,33) | 0,48 (0,03) * | 1,45 (0,10) | 0,992 | 0,032 |

| | | | | | | | |
|-------|-------------------------|--------------|-------------|----------------|--------------|-------|-------|
| | WT (<i>rsiW::erm</i>) | 0,23 (0,086) | 4,36 (1,77) | 0,82 (0,11) | 1,98 (0,51) | 0,991 | 0,027 |
| | <i>rsiW::erm</i> | 0,22 (0,08) | 5,08(1,36) | 0,71 (0,14) | 1,67 (0,43) | 0,996 | 0,014 |
| 97,5 | WT | 4,71 (0,41) | 0,48 (0,12) | 9,69 (1,04) | 19,66 (3,89) | 0,995 | 0,004 |
| | <i>fur::erm</i> | 7,22 (1,13) | 0,59 (0,09) | 11,17 (0,93) | 19,07 (1,57) | 0,993 | 0,015 |
| | <i>rsbS::erm</i> | 4,17 (2,19) | 0,72 (0,1) | 7,38 (1,8) | 13,8 (1,14) | 0,985 | 0,023 |
| | <i>sigX::erm</i> | 4,04 (2,09) | 0,49 (0,03) | 8,69 (1,83) | 18 (1,42) | 0,988 | 0,020 |
| | WT (<i>rsiW::erm</i>) | 4,68 (1,68) | 0,54 (0,06) | 8,94 (1,68) | 17,46 (2,09) | 0,994 | 0,005 |
| | <i>rsiW::erm</i> | 3,63 (0,59) | 0,54 (0,03) | 7,89 (0,78) | 16,4 (1,21) | 0,989 | 0,014 |
| 102,5 | WT | 0,65 (0,02) | 1,79 (0,27) | 1,95 (0,22) | 4,56 (0,66) | 0,986 | 0,024 |
| | <i>fur::erm</i> | 1,15 (0,19) | 1,7(0,2) | 2,51 (0,09) * | 5,23 (0,31) | 0,989 | 0,027 |
| | <i>rsbS::erm</i> | 0,24 (0,19) | 2,37 (0,37) | 1,16 (0,41) ** | 3,2 (0,6) | 0,992 | 0,010 |
| | <i>sigX::erm</i> | 0,25 (0,3) | 2,04 (0,94) | 1,25 (0,1) | 4,24 (1,86) | 0,981 | 0,053 |
| | WT (<i>rsiW::erm</i>) | 0,68 (0,049) | 2,39 (0,26) | 1,65 (0,13) | 3,59 (0,33) | 0,996 | 0,010 |
| | <i>rsiW::erm</i> | 0,24 (0,23) | 2,32 (0,39) | 1,25 (0,06) * | 3,27(0,29) | 0,977 | 0,069 |

Como se muestra en la Figura 5 y Tabla 3, los valores D_T y $3D_T$ de la cepa parental se redujeron al aumentar la temperatura de 100,0 °C a 105,0 °C debido una reducción del tamaño del hombro y un aumento de la constante de inactivación. A 100,0 °C, los mutantes *rsbS::erm* y *sigX::erm* mostraron una mayor sensibilidad al calor respecto a la cepa parental debido principalmente a un menor hombro, mientras que la K_{max} de ambas cepas fue similar al de la cepa WT. Por esta razón, solo se observaron diferencias significativas entre los valores $D_{100,0}^{\circ C}$ y no entre los valores $3D_{100,0}^{\circ C}$, donde la constante de inactivación tiene más peso que la duración del hombro. A 105,0 °C, el hombro de *sigX::erm* desapareció, y aunque su K_{max} se redujo ligeramente con respecto a la de la cepa parental, este mutante también mostró un valor D_T inferior al de la cepa WT a esta temperatura. La cepa *fur::erm* resultó ser la más termorresistente, especialmente a la temperatura más elevada. A 105,0 °C, la K_{max} fue aproximadamente dos veces inferior al de la cepa parental, y como consecuencia sus valores

$3D_T$ fueron aproximadamente 1,2 min superiores. No se observaron diferencias en la cinética de inactivación entre la cepa *rsiW::erm* y su correspondiente cepa parental a ninguna de las temperaturas.

Debido a que la resistencia relativa entre las cepas dependía de la temperatura de tratamiento, se estudió la termodependencia de los valores D_T de todas las cepas. Para ello se obtuvieron las termorresistencias a dos temperaturas más, a 97,5 °C y 102,5 °C (Anexo II), y se estimaron los valores D_T tras el ajuste de las gráficas de supervivencia al modelo de Geeraerd et al. (2000) (Tabla 3). La gráfica de termodestrucción junto con los valores z estimados para cada cepa aparecen en la Fig. 6. Los mutantes *rsbS::erm* y *sigX::erm* presentaron valores z de hasta 1 °C inferior respecto a la cepa parental, aunque esta diferencia solo fue significativa para el mutante *rsbS::erm*, indicando que los valores D_T de ambos mutantes son más sensibles a los cambios de temperatura que los de la cepa parental. Por el contrario, el mutante *fur::erm* mostró valores z ligeramente superiores a los de la cepa WT, de forma que ambas cepas poseían valores $D_{97,5}^T$ similares y las diferencias se acentuaban al incrementar la temperatura de tratamiento. Por tanto, la carencia del gen *fur* protege al calor solo a temperaturas elevadas.

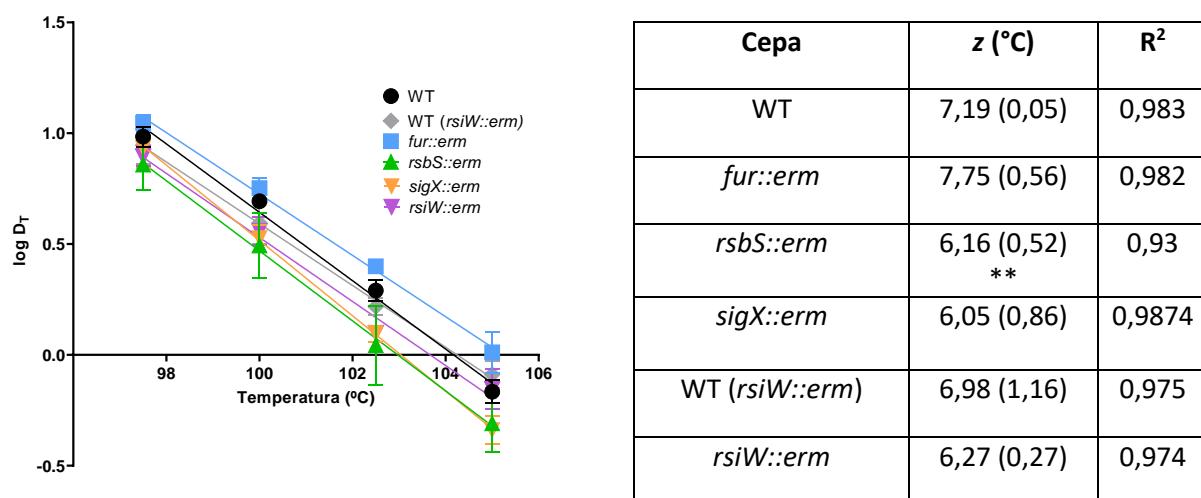


Figura 6: Gráfica de termodestrucción y los correspondientes valores z de los esporos de *B. subtilis* (WT) y los mutantes indicados. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas y la desviación estándar de la media. Las diferencias significativas entre los valores z de la tabla se muestran con un asterisco (*) si $p \leq 0,05$ o con dos (**) si $p \leq 0,01$.

El mutante *rsbS::erm* carece uno de los reguladores transcripcionales del factor SigB, y se ha demostrado que en su ausencia, se incrementan los niveles intracelulares de este factor sigma (Schumann, 2003). Es bien sabido que la ausencia del factor SigB en las células vegetativas de *B. subtilis* reduce la resistencia y capacidad de adaptación a varios tipos de estrés, incluyendo el estrés osmótico y térmico (Vries et al., 2005a). Vries et al., 2005b observaron que la ausencia

del gen *sigB* en *B. cereus* no afecta a la resistencia al calor de los esporos, pero hasta ahora no se había estudiado el efecto de su sobreexpresión, lo cual podría darse cuando las células esporulan en condiciones de estrés como la alta salinidad. Nuestros resultados indican, que al contrario que ocurre en las células vegetativas, el aumento de SigB reduce la resistencia de los esporos al calor. Por tanto, cuando las células esporulan en condiciones de baja a_w deben reducir los niveles de SigB, por un mecanismo todavía desconocido, para dar esporos más termorresistentes. Esto coincide con los estudios de transcriptómica realizados en células vegetativas de *B. subtilis* creciendo a altas concentraciones de sal, en donde SigB es el factor sigma predominante tras la exposición, pero después predomina la actividad del factor SigA (Nagler et al., 2016).

El gen *sigX* codifica el factor sigma relacionado con el estrés extracitoplasmático, ya que aumenta la fuerza aniónica de la membrana y es importante para el mantenimiento de la envoltura celular. Estudios realizados por Huang et al., (1997) mostraron que la ausencia del gen *sigX* en las células vegetativas de *B. subtilis* reduce notablemente la resistencia al calor, especialmente a temperaturas elevadas, algo que observamos también en nuestros resultados. Por tanto, aunque se ha visto que las células vegetativas de *B. subtilis* reducen la actividad de SigX cuando crecen en condiciones subinhibitorias de sal (Nagler et al., 2016), de alguna forma tienen que restablecer los niveles de este factor sigma en los esporos para que estos sean más resistentes cuando crecen a a_w baja, o puede ser que la pérdida de resistencia causada por la represión de SigX se compense por otro factor. Por el contrario, la ausencia de RsiW, el antisigma que regula los niveles de SigW, cuya actividad está relacionada con cambios en las propiedades de membrana y con la protección frente a antibióticos y el estrés alcalino (Asai, 2017) no cambió la resistencia al calor.

El gen *fur* tiene la función de regular la homeostasis del hierro, que como ya hemos mencionado, es importante a la hora de controlar la reacción de Fenton. La supresión del gen *fur* aumenta los niveles de hierro intracelular en las células vegetativas (Harvie et al., 2005). Aunque se desconoce si la eliminación del gen *fur* también aumenta el contenido de hierro en el protoplasto, nuestros resultados parecen indicar que el aumento de hierro en el esporo incrementa la resistencia al calor. Este hecho encajaría con observaciones previas sobre el efecto de la mineralización de los esporos en la inactivación térmica. Oomes y Brul, (2004) observaron que los esporos producidos en un medio con concentraciones elevadas de

metales, incluyendo el hierro, eran más resistentes al calor que los esporos que no eran producidos en ese medio. Sin embargo, al igual que ocurre con los mutantes *rsbS::erm* y *sigX::erm*, resulta complicado identificar que genes de cada regulón contribuyen a los cambios de resistencia ya que estos controlan multitud de genes relacionados con el estrés.

4.2.2. Cinética de inactivación de los esporos de *opcR::kan/gbsR::erm* con y sin GB

Con el fin de evaluar el efecto de los niveles de GB intracelulares en la resistencia a 100,0 °C y 105,0 °C, se estudió la inactivación de la cepa WT y del doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm*, carente de los dos represores transcripciones de los operones *opuB* y *opuC*, que codifican unos de los principales canales de importación de la GB y su precursor colina, entre otros compuestos osmoprotectores (Hoffmann y Bremer, 2017). Además, se estudió el efecto de la adición de GB al medio de esporulación a una concentración que permitiera incrementar los niveles de este osmolito en el esporo (Loshon et al., 2006). La esporulación de la cepa parental en el medio enriquecido con GB, no cambió la resistencia al calor a ninguna de las temperaturas (Fig. 7, Tabla 4). Sin embargo, la eliminación de *opcR* y *gbsR*, tanto en presencia como en ausencia de GB en el medio, consiguió incrementar los valores D_T de la cepa parental debido a un alargamiento de la fase del hombro y también a un ligero descenso de K_{max} (Tabla 4). La presencia de GB durante la esporulación de la cepa *opcR::kan/gbsR::erm* incrementó aún más los valores D_T que su ausencia con respecto a la cepa parental a 100,0 °C, pero a 105,0 °C *opcR::kan/gbsR::erm* presentó la misma resistencia independientemente de la adición de osmolitos. Como consecuencia, el mutante *opcR::kan/gbsR::erm* mostró valores z ($7,22 \pm 0,24$ °C) inferiores a los de la cepa parental ($7,92 \pm 0,07$ °C) cuando se esporularon en presencia de GB, mientras que no se vieron diferencias entre las dos cepas cuando se esporularon sin GB ($8,08 \pm 0,53$ °C y $8,05 \pm 0,32$ °C, respectivamente).

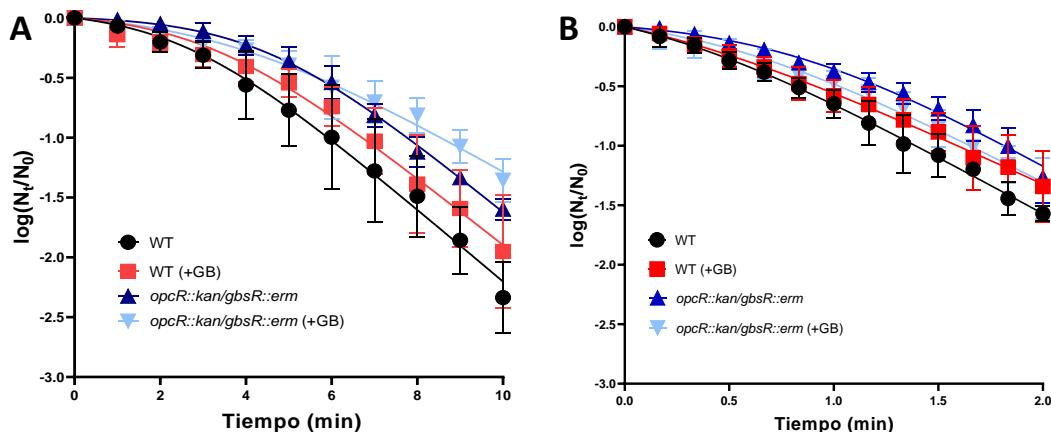


Figura 7: Gráficas de supervivencia a 100,0 °C (A) y 105,0 °C (B) de los esporos de *B. subtilis* (WT) y *opcR::kan/gbsR::erm* esporulados con o sin GB. Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas.

Tabla 4: Parámetros de resistencia y valores D_T y $3D_T$ obtenidos tras el ajuste del modelo de Geerared et al. (2000) a las curvas de supervivencia de los esporos de *B. subtilis* (WT) y *opcR::kan/gbsR::erm*, esporulados con o sin GB, a distintas temperaturas. Los datos muestran la media y desviación estándar de tres réplicas biológicas. Las diferencias significativas en los valores D_T y $3D_T$ entre cada uno de los mutantes y la cepa parental (esporulada sin GB) se muestran con un asterisco (*) si $p \leq 0,05$ o con dos (**) si $p \leq 0,01$.

| T (°C) | Cepa | SI (min) | K _{max} (min ⁻¹) | D _T (min) | 3D _T (min) | R ² | RECM |
|--------|----------------------------------|-------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|-------|
| 100,0 | WT | 3,17 (1,12) | 0,91 (0,26) | 5,81 (1,27) | 12,15 (2,21) | 0,981 | 0,098 |
| | WT (+GB) | 3,48 (0,9) | 0,67 (0,11) | 6,92 (0,99) | 13,82 (1,75) | 0,987 | 0,076 |
| | <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> | 4,51 (0,57) | 0,68 (0,06) | 7,89 (0,34)* | 14,63 (0,49) * | 0,992 | 0,045 |
| | <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> (+GB) | 4,52 (1,12) | 0,58 (0,06) | 8,49 (0,83) * | 16,44 (0,09) * | 0,983 | 0,091 |
| 105,0 | WT | 0,46 (0,17) | 2,82 (1,2) | 1,37 (0,2) | 3,55 (0,82) | 0,985 | 0,028 |
| | WT (+GB) | 0,44 (0,23) | 1,98 (0,31) | 1,62 (0,28) | 3,98 (0,55) | 0,989 | 0,017 |
| | <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> | 0,83 (0,07) | 2,19 (0,15) | 1,88 (0,14) * | 3,99 (0,28) | 0,992 | 0,011 |
| | <i>opcR::kan/gbsR::erm</i> (+GB) | 0,48 (0,42) | 1,99 (0,67) | 1,72 (0,20) * | 4,20 (0,82) | 0,98 | 0,018 |

Es bien sabido que cuando las células vegetativas de *B. subtilis* se someten a un estrés osmótico subletal, es decir que permita la división celular, durante un tiempo prolongado, acumulan en el citoplasma grandes cantidades de osmolitos, siendo la GB uno de los más abundantes (Lee et al., 2013). Estos compuestos sirven para atraer y retener agua en el interior celular, pero también algunos de ellos han demostrado tener la función de mantener la estabilidad, solubilidad y por tanto la función de las proteínas frente a estreses proteotóxicos como es el calor (Hoffmann y Bremer, 2017). Se ha demostrado que la acumulación de osmolitos facilita el crecimiento de *B. subtilis* a los límites mínimos y máximos de temperaturas de crecimiento (Holtmann y Bremer, 2004). Además, los osmolitos contribuyen a aumentar la resistencia al calor a temperaturas letales moderadas en algunos microrganismos como *Escherichia coli* (Caldas et al., 1999). Nuestros resultados indican que la resistencia al calor de los esporos aumenta ligeramente al eliminar los represores GbsR y OpcR, y por tanto al incrementar los niveles de OpuC y OpuD así como los de las enzimas GbsA y GbsB involucradas

en la síntesis de GB, pero no con la adición de GB al medio. Loshon et al. (2006) observaron que el nivel de acumulación de GB en el interior de los esporos al esporular en un medio mínimo suplementado con este compuesto era mucho mayor cuando estos esporulaban también con 0,4 M de NaCl que sin la adición de la sal, y por tanto es posible que en nuestras condiciones experimentales los niveles de GB acumulados al suplementar el medio con este compuesto no fueran suficientes para incrementar la resistencia al calor. Sin embargo, los mismos autores demostraron que el incremento en más de 10 veces del contenido de GB en el interior del esporo al esporular en presencia de GB y 0,4 M de NaCl no aumentaba su resistencia al calor (Loshon et al., 2006). Por ello, sería interesante estudiar los niveles de GB en la cepa *opcR::kan/gbsR::erm*, en presencia y ausencia de GB y como éstos se correlacionan con la resistencia al calor, ya que en este punto no sabemos si la mayor resistencia al calor del doble mutante con respecto a la cepa parental se debe a los aumentos de osmolitos o efectos secundarios que podrían tener las mutaciones en las propiedades de los esporos.

4.2.3. Cinética de inactivación de los esporos de *des::kan* y *desK::kan/P_{Km}-desR* con distinta fluidez de membrana

Para modificar la fluidez de la MI de los esporos, se utilizó una cepa carente del gen *des* (*des::kan*), que codifica la enzima desaturasa encargada de la insaturación de los ácidos grasos (Cortezzo et al., 2003). Además, se utilizó otra cepa (*desK::kan/P_{Km}-desR*) en la que la transcripción del gen *desR*, que da lugar al activador transcripcional del gen *des*, dependía del promotor del gen de resistencia a la kanamicina, de forma que cuando esta cepa crece en presencia de este antibiótico produce altas cantidades de ácidos grasos insaturados tanto en las células vegetativas como en los esporos (Altabe et al. 2003; Cortezzo et al., 2003). Para evitar que la presencia de kanamicina pudiera contribuir a los cambios de resistencia al calor, ambas cepas se esporularon en presencia de este antibiótico. Como los estudios realizados por Klein et al., (1999) demostraron que los cambios producidos en la fluidez de la membrana al modificar la expresión del gen *des* podían ser contrarrestados con la producción de ácidos grasos ramificados iso (que aportan rigidez a la membrana) o anteiso (que fluidifican la membrana), y que estos son muy abundantes en la MI de los esporos (Cortezzo et al., 2003), optamos también por controlar la proporción de ácidos grasos ramificados iso y anteiso durante la esporulación añadiendo al medio los precursores L-leucina/valina o L-isoleucina, respectivamente (Webber et al., 2001). La Figura 8 muestra la cinética de inactivación por calor

a 100,0 °C y 105,0 °C del mutante *des::kan* esporulado en presencia de L-valina o L-leucina y del mutante *desK::kan/P_{Km}-desR* esporulado en presencia de L-isoleucina, mientras que la Tabla 5 muestra los parámetros de resistencia y valores D_T y 3D_T obtenidos tras el ajuste de las curvas al modelo de Geeraerd et al. (2000).

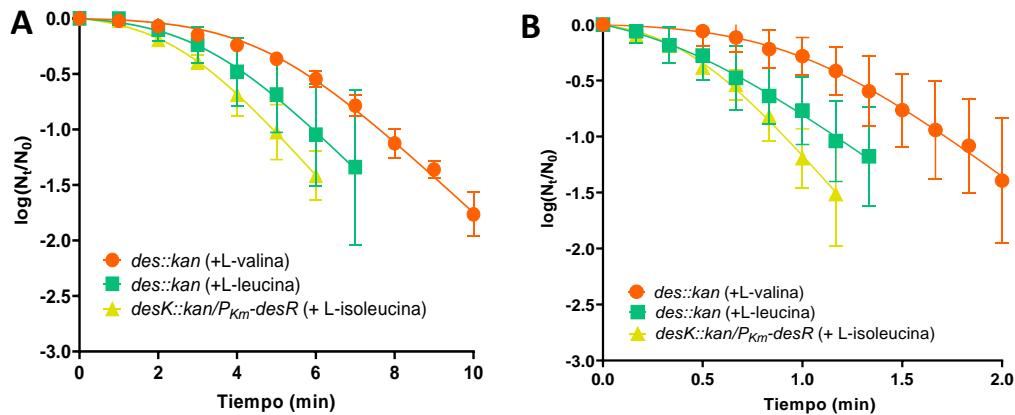


Figura 8: Gráficas de supervivencia a 100,0 °C (A) y 105,0 °C (B) de los esporos de *des::kan* esporulado en presencia de L-valina o L-leucina y de *desK::kan/P_{Km}-desR* esporulado en presencia de L-isoleucina. Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas.

Tabla 5: Parámetros de resistencia y valores D_T y 3D_T obtenidos tras el ajuste del modelo de Geerared et al. (2000) a las curvas de supervivencia de los esporos de *des::kan*, esporulado en presencia de L-valina o L-leucina, y de *desK::kan/P_{Km}-desR*, esporulado en presencia de L-isoleucina, a distintas temperaturas. Los datos muestran la media y desviación estándar de tres réplicas biológicas. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los valores D_T y 3D_T de ambas cepas se indican con letras distintas.

| T (°C) | Cepa | SI (min) | K _{max} (min ⁻¹) | D _T (min) | 3D _T (min) | R ² | RECM |
|--------|--|-------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|-------|
| 100,0 | <i>des::kan</i> (+L-valina) | 4,59 (0,34) | 0,72 (0,1) | 7,82 (0,36) <i>a</i> | 14,28 (1,35) <i>a</i> | 0,992 | 0,026 |
| | <i>des::kan</i> (+L-leucina) | 3,56 (1,24) | 0,93 (0,05) | 6,03 (1,38) <i>ab</i> | 10,98 (1,67) <i>ab</i> | 0,992 | 0,017 |
| | <i>desK::kan/P_{Km}-desR</i> (+L-isoleucina) | 2,68 (0,36) | 1,02 (0,08) | 4,95 (0,55) <i>b</i> | 9,87 (0,94) <i>b</i> | 0,993 | 0,008 |
| 105,0 | <i>des::kan</i> (+L-valina) | 1,05 (0,25) | 3,2 (0,44) | 1,78 (0,33) <i>a</i> | 3,24 (0,52) <i>a</i> | 0,99 | 0,048 |
| | <i>des::kan</i> (+L-leucina) | 0,47 (0,31) | 3,3 (0,44) | 1,17 (0,3) <i>ab</i> | 2,58 (0,35) <i>ab</i> | 0,986 | 0,021 |
| | <i>desK::kan/P_{Km}-desR</i> (+L-isoleucina) | 0,42 (0,08) | 4,6 (1,29) | 0,95 (0,12) <i>b</i> | 2,19 (0,45) <i>b</i> | 0,987 | 0,017 |

La cepa *des::kan* mostró tener una resistencia ligeramente superior al esporular en presencia de L-valina respecto a la esporulación en presencia de L-leucina, aunque las diferencias no son significativas debido a la gran variabilidad observada entre las muestras esporuladas con L-

leucina. La presencia de uno de estos dos aminoácidos en el medio, junto a la carencia de la enzima desaturasa, proporciona rigidez a la membrana interna de los esporos. La cepa *desK::kan/P_{Km}-desR* esporulada en presencia de L-isoleucina, para incrementar la proporción de ácidos grasos ramificados anteiso, y de kanamicina, para inducir la expresión de la desaturasa, y así incrementar la fluidez de la MI de los esporos, mostró valores de D_T y 3D_T 1,7 y 1,4 veces inferiores, respectivamente, que la cepa *des::kan* crecida con L-valina, tanto a 100,0 °C como a 105,0 °C. Estas diferencias se debían a que la cepa *des::kan* tenía una longitud de hombro mucho más larga que la otra cepa a ambas temperaturas, e incluso una menor K_{max} a 100,0 °C (Tabla 5). Los valores z de *des::kan*, esporulado con L-valina ($7,77 \pm 0,76$ °C) o L-leucina ($7,03 \pm 0,40$ °C), y de *desK::kan/P_{Km}-desR* ($6,98 \pm 0,14$ °C) fueron similares.

Se ha demostrado por varios autores (Lechowich y Ordal, 1962; Condon et al., 1992) que la temperatura de esporulación es un factor importante a la hora de determinar la posterior resistencia al calor, y que esto es probable que sea en parte consecuencia del cambio en la composición lipídica de la membrana y por lo tanto de su fluidez. A una temperatura de esporulación más alta, la rigidez de la membrana aumenta y por lo tanto la resistencia al calor también aumenta (Nguyen Thi Minh et al., 2011). Nuestros resultados también muestran que al aumentar la rigidez de la MI cambiando sintéticamente la composición lipídica (sin cambiar la temperatura de esporulación) incrementa la supervivencia frente al calor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cambios en las propiedades de la MI de los esporos de *B. subtilis* no solo dependen de la composición de ácidos grasos, sino también de los niveles de ciertas proteínas que se anclan a la MI y cuyo nivel de expresión se ha relacionado con la resistencia al calor (Kanaan et al., 2022). Durante la adaptación de las células vegetativas de *B. subtilis* a condiciones de alta salinidad, la membrana citoplasmática sufre una diminución en la fluidez para evitar la salida de osmolitos, y esto provoca un aumento de la resistencia al calor (Lopez et al., 2000b). Aunque esto concuerda con nuestros resultados y con la mayor resistencia al calor de los esporos producidos a baja a_w con sal (Freire et al, 2023), todavía no se ha estudiado la composición de ácidos grasos y la fluidez de la MI en los esporulados en alta salinidad.

4.3. Inactivación con dodecilamina

Como ya hemos mencionado, la dodecilamina es un agente químico que se puede utilizar para inactivar los esporos debido al daño que produce en la MI alterando su permeabilidad

(DeMarco et al., 2021). Para ver si los cambios en la sensibilidad al calor de los mutantes carentes de los reguladores transcripcionales *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *fur::erm* se podría relacionar con cambios en las propiedades de la membrana interna, las cuales parecen ser muy importantes a la hora de determinar la resistencia al calor (Kanaan et al., 2022), se estudió la inactivación con dodecilamina tras 180 minutos de exposición. Además, se incluyó en el estudio las cepas *des::kan* y *desK::kan/P_{Km}-desR* con el fin de validar que la resistencia a la dodecilamina depende de la fluidez de la membrana (Fig. 9).

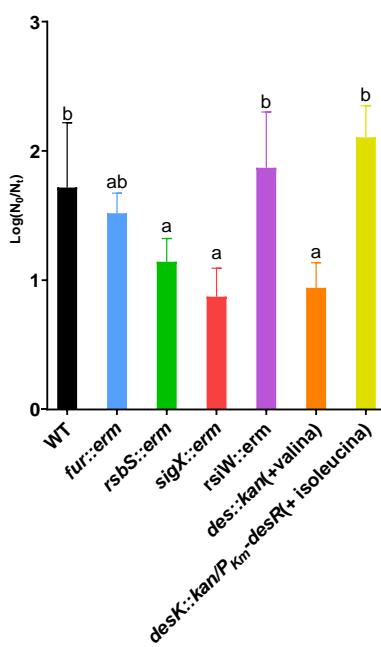


Figura 9: Ciclos de inactivación de *B. subtilis* (WT) y los mutantes indicados tras 180 minutos de exposición a la dodecilamina. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas y las barras de error son la desviación estándar de la media. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las cepas se indican con letras distintas.

En la Fig. 9 se observa que, al igual que ocurría con el calor, la cepa *des::kan* era mucho más resistente que el mutante *desK::kan/P_{Km}-desR*, lo que indica que a mayor fluidez de la MI mayor es la sensibilidad a la dodecilamina. Cortezzo et al., (2004) observó que no existían diferencias en la resistencia entre *des::kan* y *desK::kan/P_{Km}-desR* frente a agentes oxidantes y agentes químicos que actúan sobre la MI o que tienen que atravesarla para ejercer su efecto. Esto podría deberse a que en este trabajo solo se controló la expresión del gen *des* pero no la composición de ácidos grasos ramificados iso y anteiso que son muy abundantes en la MI del esporo y pueden ejercer una función importante en la permeabilidad de la MI.

Al comparar la resistencia de la cepa parental con los mutantes *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *fur::erm* esporulados en 2xSG, obtuvimos que las cepas *rsbS::erm* y *sigX::erm* eran más resistentes a la

dodecilamina respecto a la WT, probablemente debido a que sus MI eran más impermeables frente a este agente y por tanto más rígidas. Por ello, la menor resistencia al calor de *rsbS::erm* y *sigX::erm* no se debía completamente a cambios en la fluidez de su MI. No observamos diferencias con el mutante *rsiW::erm* indicando que este no produce cambios importantes en las propiedades de la MI de los esporos, aunque según el estudio de Helmann, (2016), este factor sí que se relaciona con la adaptación de la membrana citoplasmática de las células vegetativas frente a ciertos estreses.

4.3. Cinética de germinación de los esporos mutantes de *B. subtilis*

4.4.1. Germinación frente a nutrientes

Con el fin de examinar la capacidad de germinación de los esporos mutantes frente a distintos nutrientes, primero se obtuvieron las curvas de germinación frente a CNYE, L-alanina, L-valina y AGFK a 37 °C mediante espectrofotometría. En cuanto a los mutantes, *sigX::erm* y *fur::erm*, no se observaron diferencias en la velocidad de germinación con respecto a la cepa WT en CNYE, L-alanina y L-valina (Anexo III), pero si germinaban más lentamente frente a AGFK (Fig. 10A). Estos resultados se confirmaron mediante la cuantificación de la liberación de DPA mediante fluorimetría con TbCl₃ así como el recuento de esporos germinados a punto final mediante microscopía (Fig. 10B y 10C). Aunque el mutante *rsbS::erm* mostró una caída de absorbancia ligeramente superior a la de la cepa parental solo frente a AGFK (Fig. 10A), no se observaron diferencias en la cinética determinada por la fluorescencia de Tb-DPA (Fig. 10B) ni en el recuento microscópico (Fig. 10C). Finalmente, el mutante *rsiW::erm* parecía germinar más rápidamente que la cepa parental con L-alanina (Fig. 10D), pero no frente al resto de nutrientes (Fig. 10A, 10B, Anexo III). De hecho, los recuentos microscópicos de los esporos germinados demostraron que este mutante presentaba aproximadamente un 30% más de esporos germinados (datos no mostrados).

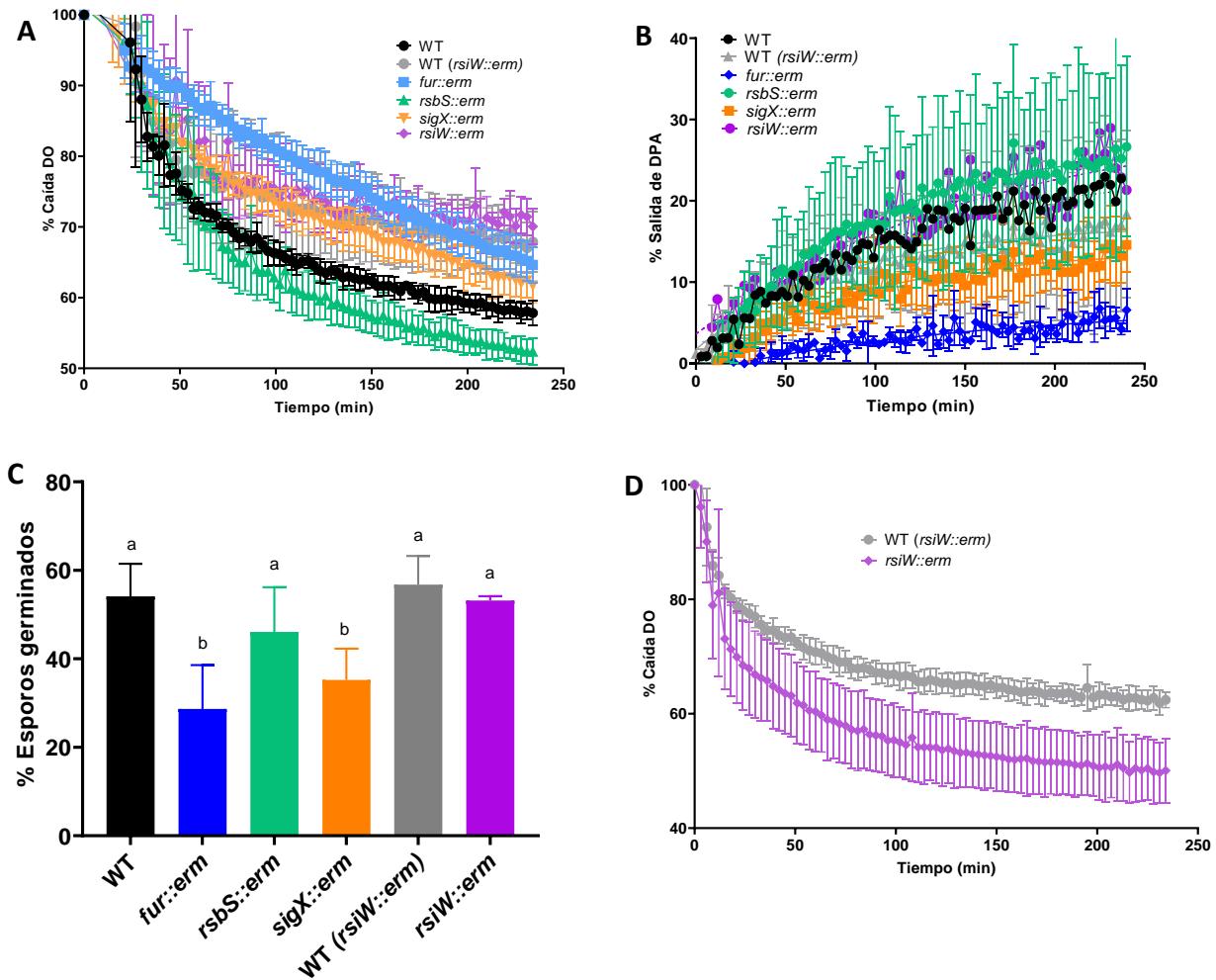


Figura 10: Cinética de germinación de los esporos de la cepa parental de *B. subtilis* (WT) y de los mutantes *rsbS::erm*, *sigX::erm*, *fur::erm* y *rsiW::erm* en AGFK determinada mediante la caída de absorbancia a 600 nm (A) y mediante fluorometría con $TbCl_3$ (B) a 37 °C. La Figura C muestra el porcentaje de esporos germinados observados en el microscopio tras 240 min de incubación. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las cepas se indican con letras distintas. La Figura D muestra la cinética de germinación de los esporos de la cepa parental de *B. subtilis* (WT) y del mutante *rsiW::erm* en L-alanina determinada mediante la caída de absorbancia a 600 nm. Los datos muestran la tendencia promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error la desviación estándar de la media.

El doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm* mostró diferencias en la cinética de germinación frente a CNYE, L-alanina y L-valina (pero no en AGFK, Anexo III), en donde presentaba una velocidad de germinación superior a la cepa parental, tanto esporulada con cómo sin GB (Fig. 11). Sin embargo, al realizar los recuentos de los esporos germinados a tiempo final por microscopía, no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas en las muestras de L-alanina y L-valina (Fig. 11D). En las cepas relacionadas con cambios en la fluidez de la membrana (*des::kan* y *desK::kan/P_{Km}-desR*), las diferencias en la cinética de germinación en todos los nutrientes fueron muy sutiles (Anexo III)

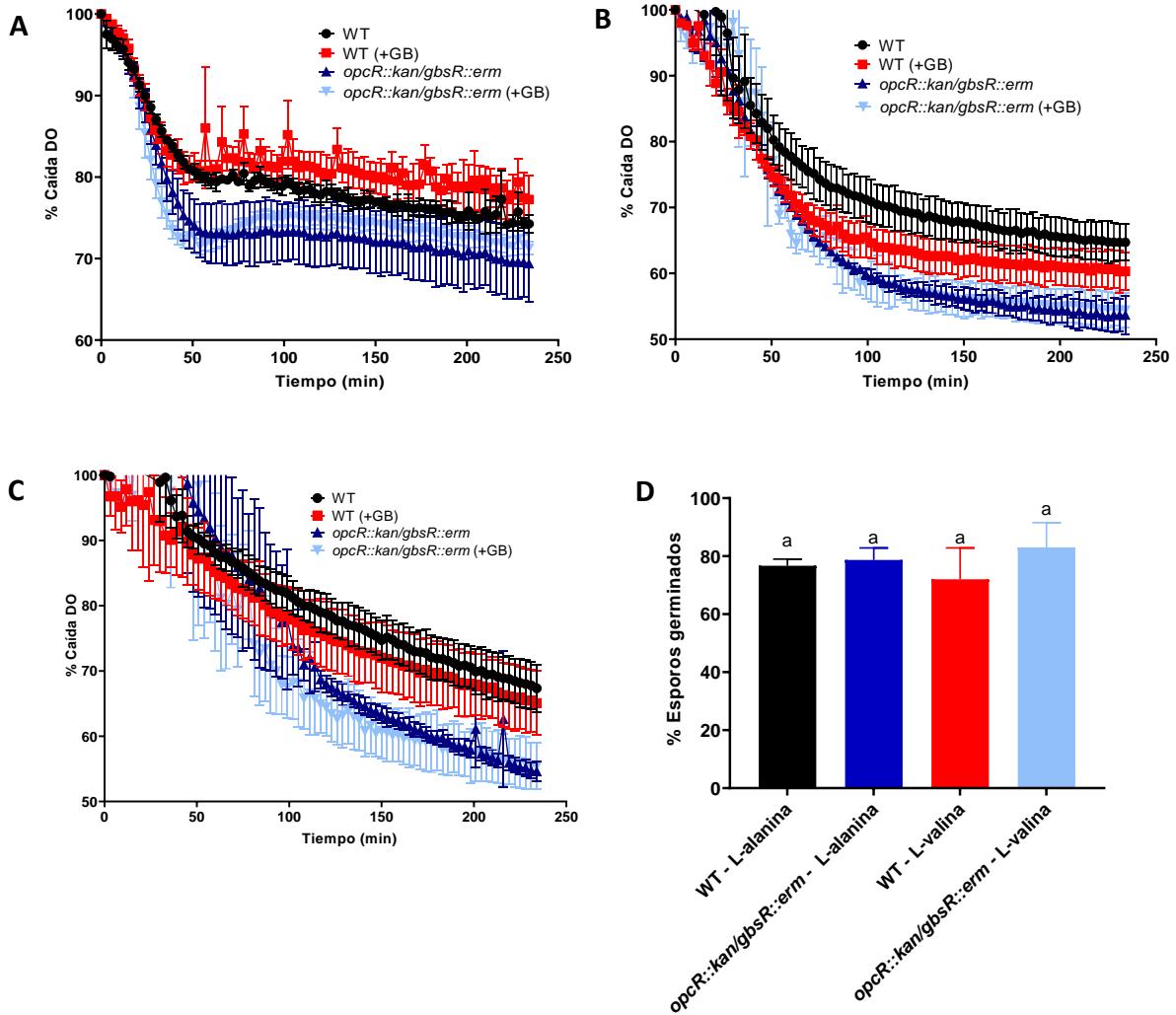


Figura 11: Cinética de germinación de los esporos de la cepa parental de *B. subtilis* (WT) y del mutante *opcR::kan/gbsR::erm* esporulados con y sin GB en CNYE (A), L-alanina (B) y L-valina (C) determinada mediante la caída de absorbancia a 600 nm a 37 °C. La Figura D muestra el porcentaje de esporos germinados observados en el microscopio tras 240 min de incubación. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las cepas se indican con letras distintas Los datos muestran la tendencia promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error la desviación estándar de la media.

4.4.2. Germinación frente a CaDPA

Por otro lado, se evaluó la germinación de los mutantes frente al agente químico CaDPA mediante espectrofotometría. Como ya hemos mencionado, este germinante induce la germinación activando la enzima lítica del córtex CwlJ, sin necesidad de que intervengan los GR (Setlow et al., 2017). En las cinéticas de germinación obtenidas con CaDPA (Fig. 12) destaca, por un lado, que la caída de absorbancia en el mutante *sigX::erm* era mucho más lenta que en la cepa parental (Fig. 12A). Por otro lado, el mutante *des::kan* esporulado con L-valina, pero no con L-leucina, respondía peor frente a CaDPA que la cepa *desK::kan/P_{Km}-desR* (Fig. 12C). Sin embargo, los recuentos realizados por microscopía a tiempo final de las cepas relacionadas con la fluidez no mostraron diferencias significativas (Anexo IV).

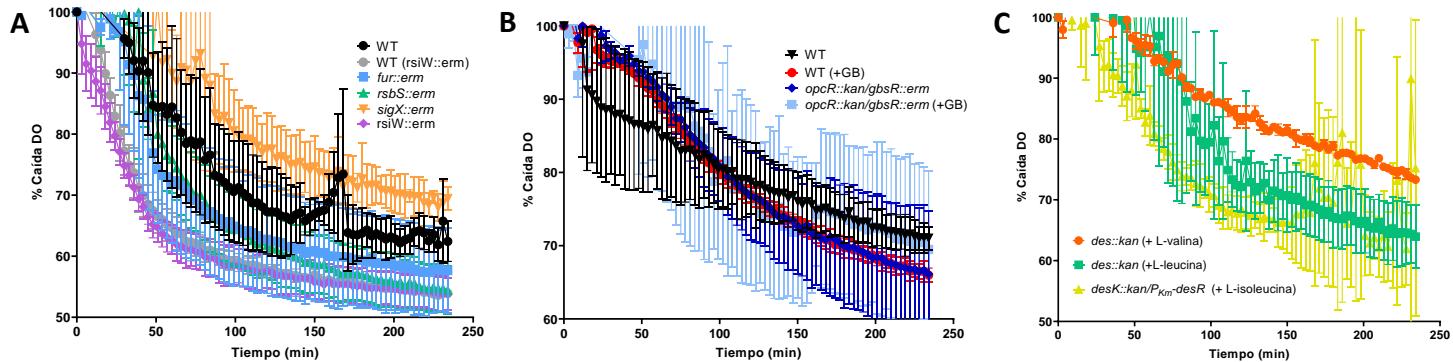


Figura 12: Cinética de germinación de *B. subtilis* (WT) y los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm* (A), *opcR::kan/gbsR::erm*, esporulado con y sin GB (B), y *des::kan*, esporulado en presencia con L-valina o L-leucina y *desK::kan/P_{Km}-desR*, esporulado en presencia de L-isoleucina, (C) frente al agente químico CaDPA a 30 °C, obtenidas midiendo el descenso de la absorbancia a 600 nm. Los datos muestran la tendencia promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error la desviación estándar de la media.

Todos estos resultados indican que el aumento de la actividad SigB, al eliminar el gen *rsbS*, no modifica la germinación frente a ningún agente (Fig. 10A, 12A, Anexo III), mientras que altera la resistencia al calor y a la dodecilmamina (Fig. 5, 9). Esto concuerda con los resultados de Vries et al., (2005b) que observaron que la eliminación del gen *sigB* en *B. cereus* no afecta a la cinética de germinación. Además, Horsburgh et al., (2001) describieron que el factor SigB no se expresaba durante la fase de “outgrowth” y por tanto no era relevante durante este proceso.

Los factores SigW y SigX relacionados con la respuesta al estrés en la región extracitoplasmática, regulan gran variedad de genes involucrados en la adaptación de la pared celular y la membrana citoplasmática a estreses de distinta naturaleza (Helmann, 2016). De hecho, se ha demostrado, que la supresión de los genes *sigW* y *sigX* altera la homeostasis de la membrana citoplasmática (Luo et al., 2010). Por otro lado, se ha propuesto que cambios en las propiedades de la MI de los esporos, la cual posee igual composición que la membrana citoplasmática las células vegetativas, podría afectar a la germinación (Cowan et al., 2004b). La carencia del factor SigX redujo la velocidad de germinación frente a AGFK (Fig. 10A), pero no frente al resto de nutrientes, con una proporción similar frente al CaDPA (Fig. 12A). Por tanto, la menor velocidad de germinación de *sigX::erm* con AGFK podría deberse en parte a una deficiencia en la hidrólisis del córtex tras la activación de los receptores de germinación específicos, GerB y GerK (Stewart y Setlow, 2013). El hecho de que solo mostrara deficiencias en la germinación con AGFK y no con L-alanina o L-valina, que activan la germinación a través de GerA (Stewart y Setlow, 2013), podría ser debido a que los cambios producidos por la

ausencia de SigX solo interfieren en la traducción de la señal de inicio de la germinación de GerB y GerK, y no de GerA. Por otro lado, los posibles cambios en la MI producidos por *rsiW::erm*, parecen no ser tan relevantes como para alterar la germinación (Fig. 10, 12A), al igual que ocurría con la inactivación con dodecilamina (Fig. 9).

El mutante *fur::erm* presentaba defectos en la germinación frente a AGFK (Fig. 10A), pero no frente al resto de nutrientes (Anexo III) ni frente a CaDPA (Fig. 12A). Por tanto, estos resultados indican que la germinación más lenta de *fur::erm* con AGFK no se debe a problemas en la hidrólisis del córtex, y que la mayor dificultad de este mutante para germinar en AGFK se deba a diferencias en los niveles o la actividad de los receptores de germinación GerB y GerK, que actúan de manera conjunta para activar la germinación con AGFK (Stewart y Setlow, 2013). Este mutante presuntamente acumula niveles intracelulares de hierro más elevados que la cepa WT. Estudios realizados por Gupta et al., (1971) demostraron que algunos iones del protoplasto, como el manganeso o el hierro, pueden inhibir la germinación, con lo que podemos deducir que este último podría afectar de alguna manera a la expresión o actividad de los receptores de germinación GerB y GerK, resultando en una menor velocidad en la germinación con AGFK. Sin embargo, debido a que el regulón Fur está constituido por 65 genes, es posible que otros cambios no relacionados con la acumulación del hierro, podrían intervenir.

Aunque no se apreciaban diferencias en cuanto a la germinación por CaDPA en el doble mutante *opcR::kan/gbsR::erm* (Fig. 12C), esta cepa mostraba una velocidad de germinación mayor frente al CNYE, L-alanina y L-valina respecto a la cepa parental, tanto con como sin GB (Fig. 11). Esto indica que la mayor velocidad de germinación de *opcR::kan/gbsR::erm* no se debe a una mayor velocidad en la hidrólisis del córtex. Francis y Song (2016) observaron en *C. difficile* que sus esporas en presencia de osmolitos extracelulares durante la germinación liberaban el DPA más lentamente sin afectar a la hidrólisis del córtex, aunque el bloqueo de DPA por parte de los osmolitos no era permanente y tras cierto tiempo el DPA escaparía del protoplasto.

La fluidez de la membrana interna, en parte gobernada por la movilidad lipídica, que a su vez depende de la composición en ácidos grasos se cree que es un factor muy importante en la germinación, ya que determina la accesibilidad de los agentes exógenos a los GR así como el control de la apertura de los canales SpoVA (Setlow. et al., 2017). Sin embargo, nuestras cepas relacionadas con cambios en la fluidez de la membrana, no mostraron diferencias significativas

en la germinación frente a los nutrientes (Anexo III). En definitiva, la mayor rigidez de la membrana causada por cambios en la composición de ácidos grasos, no afecta a la germinación con nutrientes, y por tanto las variaciones en germinación observadas en los mutantes *sigX::erm* y *fur::erm* con respecto a la cepa parental no parecen estar relacionadas con este aspecto, a pesar de que la inactivación con dodecilamina parece indicar que estas cepas poseen modificaciones en ciertas propiedades de la membrana.

5. CONCLUSIONES

- 1- Aunque las células vegetativas cuando se enfrentan al estrés salino tienden a aumentar la actividad de SigB y SigW y reducir la de SigX, la sobreexpresión de SigB y represión de SigX de forma sintética durante la esporulación reduce la resistencia de los esporos frente al calor, especialmente a las temperaturas más altas. Por el contrario, cambios en la actividad de SigW no afecta a la inactivación térmica. Por tanto, la mayor termorresistencia de los esporos producidos a baja a_w no se debe a cambios en estos factores sigma.
- 2- La ausencia del regulador Fur, el cual se reprime cuando las células vegetativas crecen a una salinidad elevada, incrementó la resistencia al calor a partir de 100,0 °C. Igualmente, el aumento de la concentración de osmolitos a través del control genético de unos de los principales sistemas de transporte y síntesis de GB también incrementó la resistencia al calor a temperaturas elevadas. Por tanto, el aumento en la concentración del hierro y la acumulación de osmolitos en el protoplasto podría contribuir a la mayor resistencia al calor de los esporos producidos a baja a_w .
- 3- La fluidificación de la membrana interna mediante cambios en la composición de ácidos grasos reduce la resistencia al calor de los esporos. Esto concuerda con el hecho de que las células vegetativas cuando crecen a altas concentraciones de sal tienden a aumentar la rigidez de la membrana citoplasmática y su resistencia al calor. Sin embargo, para verificar que la esporulación a baja a_w produce cambios en la membrana interna que contribuyen a la mayor termorresistencia de los esporos, se necesita analizar en detalle las propiedades y composición de la misma.
- 4- La menor resistencia al calor de los mutantes *rsbS::erm* y *sigX::erm* coincide con una mayor resistencia a la dodecilamina. Sin embargo, ambos fenotipos no dependen solo de los cambios producidos en la fluidez de la membrana, ya que una mayor rigidez de la membrana interna incrementa la resistencia a ambos agentes.

- 5- La germinación de los mutantes *fur::erm* y *sigX::erm* frente a AGFK empeora con respecto a la cepa parental, y en el caso de *sigX::erm* también frente a CaDPA. Por tanto, ambos factores podrían contribuir a la menor velocidad de germinación frente a ambos agentes en los esporos obtenidos a baja a_w . Por el contrario, el aumento de la concentración de osmolitos a través del control genético de unos de los principales sistemas de transporte y síntesis de GB incrementa el porcentaje de germinación.
- 6- Los cambios en la fluididad de membrana inducidos por variaciones en la composición lipídica no afectan a la germinación, y por lo tanto la menor velocidad de germinación de los mutantes *fur::erm* y *sigX::erm* no se debe a cambios en las propiedades de la membrana interna.

CONCLUSIONS

- 1- Although vegetative cells when faced with salt stress tend to increase SigB and SigW activity and reduce SigX activity, overexpression of SigB and repression of SigX synthetically during sporulation reduces the resistance of spores to heat, especially at higher temperatures. In contrast, changes in SigW activity do not affect thermal inactivation. Therefore, the higher thermoresistance of the spores produced at low a_w is not due to changes in these sigma factors.
- 2- The absence of the Fur regulator, which is repressed when vegetative cells grow at high salinity, increased heat resistance from 100.0 °C. Likewise, the increase in the concentration of osmolytes through the genetic control of one of the main transport and synthesis systems of GB also increased the resistance to heat at elevated temperatures. Therefore, the increase in iron concentration and the accumulation of osmolytes in the protoplast could contribute to the greater heat resistance of the spores produced at low a_w .
- 3- Fluidification of the inner membrane by changes in the fatty acid composition reduces the heat resistance of the spores. This is consistent with the fact that vegetative cells when grown at high salt concentrations tend to increase the rigidity of the cytoplasmic membrane and its resistance to heat. However, to verify that sporulation at low a_w produces changes in the inner membrane that contribute to the greater thermoresistance of the spores, it is necessary to analyze in detail the properties and composition of the same.
- 4- The lower heat resistance of the *rsbS::erm* and *sigX::erm* mutants coincides with a higher dodecylamine resistance. However, both phenotypes do not depend only on changes in

membrane fluidity, since greater rigidity of the inner membrane increases resistance to both agents.

- 5- The germination of mutants *fur::erm* and *sigX::erm* against AGFK worsens with respect to the parental strain, and in the case of *sigX::erm* also against CaDPA. Therefore, both factors could contribute to the lower germination rate against both agents in the spores obtained at low a_w . On the contrary, the increase in the concentration of osmolytes through the genetic control of one of the main transport and synthesis systems of GB increases the percentage of germination.
- 6- Changes in membrane fluidity induced by variations in lipid composition do not affect germination, and therefore the lower germination rate of the *fur::erm* and *sigX::erm* mutants is not due to changes in the properties of the inner membrane.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abhyankar, W., Pandey, R., Ter Beek, A., Brul, S., de Koning, L.J. y de Koster, C.G. (2015). "Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation". *Food Microbiology*, 45, pp. 54-62.
- Alfredo, P., Sala Francisco, J. y Condón Santiago (1999). "Heat Resistance of Native and Demineralized Spores of *Bacillus subtilis* Sporulated at Different Temperatures". *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), pp. 1316-1319 DOI: 10.1128/AEM.65.3.1316-1319.1999.
- Allawi, H.T. y SantaLucia, J. (1997). "Thermodynamics and NMR of internal G-C T mismatches in DNA". *Biochemistry*, 36(34), pp. 10581-10594.
- Asai, K. (2017). "Anti-sigma factor-mediated cell surface stress responses in *Bacillus subtilis*". *Genes & genetic systems*, 92(5), pp. 223-234.
- Barbara, S., Swaroopa, A., Ryan, K., Koziol-Dube Kasia y Peter, S. (2006). "Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β-Type Small Acid-Soluble Proteins". *Journal of Bacteriology*, 188(11), pp. 3740-3747 DOI: 10.1128/JB.00212-06.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguérinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F. y Mafart, P. (2012). "Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH". *Food Microbiology*, 30(1), pp. 29-36.
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M. y Chaudhury, N.K. (2008a). "Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions". *Archives of Microbiology*, 189, pp. 71-79.
- Beaman, T.C. y Gerhardt, P. (1986ab). "Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation". *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), pp. 1242-1246.
- Berendsen, E.M., Koning, R.A., Boekhorst, J., De Jong, A., Kuipers, O.P. y Wells-Bennik, M.H. (2016). "High-level heat resistance of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a spoVA operon in a Tn 1546 transposon". *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1912.
- Bloomfield, S.F. y Arthur, M. (1992). "Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T". *Journal of applied microbiology*, 72(2), pp. 166-172.
- Bressuire-Isoard, C., Barnard, I., Henriques, A.O., Carlin, F. y Broussolle, V. (2016). "Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores". *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), pp. 232-243.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V. y Carlin, F. (2018ab). "Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms". *FEMS microbiology reviews*, 42(5), pp. 614-626.
- Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A. y Richarme, G. (1999). "Thermoprotection by glycine betaine and choline". *Microbiology*, 145(9), pp. 2543-2548.
- Condón, S., Bayarte, M. y Sala, F.J. (1992). "Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*". *The Journal of applied bacteriology*, 73(3), pp. 251-256.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J. y Sala, F.J. (1996). "Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*". *Letters in applied microbiology*, 22(2), pp. 149-152.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B. y Setlow (2004). "Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress". *Journal of applied microbiology*, 97(4), pp. 838-852.
- Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B. y Setlow, P. (2004a). "Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), pp. 7733-7738.
- Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mansilla, M.C., Altabe, S., Aguilar, P.S. y De Mendoza, D. (2002). "Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase". *Molecular microbiology*, 45(5), pp. 1379-1388.

DeMarco, A.M., Korza, G., Granados, M.R., Mok, W. y Setlow (2021). "Dodecylamine rapidly kills spores of multiple Firmicute species: properties of the killed spores and the mechanism of the killing". *Journal of applied microbiology*, 131(6), pp. 2612-2625.

Feeherry, F.E., Munsey, D.T. y Rowley, D.B. (1987). "Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores". *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), pp. 365-370.

Francis, M.B. y Sorg, J.A. (2016). "Dipicolinic acid release by germinating *Clostridium difficile* spores occurs through a mechanosensing mechanism". *Msphere*, 1(6), pp. 306.

Garcia, D., van der Voort, M. y Abeel, T. (2010). "Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures". *International journal of food microbiology*, 140(2-3), pp. 146-153.

Gupta, K.G., SIDHU, R. y Yadav, N.K. (1971). "Effect of monovalent and divalent ions upon the germination of *Bacillus* spores in the presence of nisin". *Journal of Food Science*, 36(6), pp. 896-898.

Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M. y Becher, D. (2010). "A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation". *Journal of Bacteriology*, 192(3), pp. 870-882.

Harvie, D.R., Vílchez, S., Steggles, J.R. y Ellar, D.J. (2005). "Bacillus cereus Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence". *Microbiology*, 151(2), pp. 569-577.

Helmann, J.D. (2016). "Bacillus subtilis extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope". *Current opinion in microbiology*, 30, pp. 122-132.

Hoffmann, T. y Bremer, E. (2017). "Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*". *Biological chemistry*, 398(2), pp. 193-214.

Hoffmann, T. y Bremer, E. (2016). "Management of osmotic stress by *Bacillus subtilis*: genetics and physiology". *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria*, , pp. 657-676.

Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U. y Bremer, E. (2002). "High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*, 184(3), pp. 718-727.

Holtmann, G. y Bremer, E. (2004). "Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters". *Journal of Bacteriology*, 186(6), pp. 1683-1693.

Holtmann, G., Brigulla, M., Steil, L., Schütz, A., Barnekow, K., Völker, U. y Bremer, E. (2004). "RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature". *Journal of Bacteriology*, 186(18), pp. 6150-6158.

Höper, D., Völker, U. y Hecker, M. (2005). "Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*, 187(8), pp. 2810-2826.

Hornstra, L.M., de Vries, Y.P., de Vos, W.M. y Abeel, T. (2006). "Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3746-3749.

Horsburgh, M.J., Thackray, P.D. y Moir, A. (2001). "Transcriptional responses during outgrowth of *Bacillus subtilis* endospores". *Microbiology*, 147(11), pp. 2933-2941.

Huang, X., Decatur, A., Sorokin, A. y Helmann, J.D. (1997). "The *Bacillus subtilis* sigma (X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature". *Journal of Bacteriology*, 179(9), pp. 2915-2921.

Isticato, R., Lanzilli, M., Petrillo, C., Donadio, G., Baccigalupi, L. y Ricca, E. (2020). "Bacillus subtilis builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth". *Environmental microbiology*, 22(1), pp. 170-182.

Kanaan, J., Murray, J., Higgins, R., Nana, M., DeMarco, A.M., Korza, G. y Setlow (2022). "Resistance properties and the role of the inner membrane and coat of *Bacillus subtilis* spores with extreme wet heat resistance". *Journal of applied microbiology*, 132(3), pp. 2157-2166.

Klein, W., Weber, M.H. y Marahiel, M.A. (1999). "Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures". *Journal of Bacteriology*, 181(17), pp. 5341-5349.

Korza, G., DePratti, S., Fairchild, D., Wicander, J., Kanaan, J., Shames, H., Nichols, F.C., Cowan, A., Brul, S. y Setlow, P. (2023). "Expression of the 2Duf protein in wild-type *Bacillus subtilis* spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide". *Journal of applied microbiology*, 134(3), pp. Ixad040.

Krawczyk Antonina, O., de, J.A., Jimmy, O., Siger, H., Wells-Bennik Marjon, H.J., Kuipers Oscar, P. y Eijlander Robyn, T. (2017). "Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA2mob Operon in Foodborne Strains of *Bacillus subtilis*". *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), pp. 3122 DOI: 10.1128/AEM.03122-16.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G.O., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A. y Borchert, S. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature*, 390(6657), pp. 249-256.

Laue, M., Han, H., Dittmann, C. y Setlow, P. (2018). "Intracellular membranes of bacterial endospores are reservoirs for spore core membrane expansion during spore germination". *Scientific Reports*, 8(1), pp. 11388.

Lechowich, R.V. y Ordal, Z.J. (1962). "The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores". *Canadian journal of microbiology*, 8(3), pp. 287-295.

Lee, C., Wu, T. y Shaw, G. (2013). "Involvement of OpcR, a GbsR-type transcriptional regulator, in negative regulation of two evolutionarily closely related choline uptake genes in *Bacillus subtilis*". *Microbiology*, 159(Pt_10), pp. 2087-2096.

Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P. y Maillard, J. (2012). "Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance". *Journal of applied microbiology*, 113(3), pp. 485-498.

Lopez, C.S., Heras, H., Garda, H., Ruzal, S., Sánchez-Rivas, C. y Rivas, E. (2000a). "Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress". *International journal of food microbiology*, 55(1-3), pp. 137-142.

López, C.S., Heras, H., Ruzal, S.M., Sánchez-Rivas, C. y Rivas, E.A. (1998). "Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium". *Current microbiology*, 36, pp. 55-61.

Loshon, C.A., Wahome, P.G., Maciejewski, M.W. y Setlow, P. (2006ab). "Levels of glycine betaine in growing cells and spores of *Bacillus* species and lack of effect of glycine betaine on dormant spore resistance". *Journal of Bacteriology*, 188(8), pp. 3153-3158.

Luo, Y., Asai, K., Sadaie, Y. y Helmann, J.D. (2010). "Transcriptomic and phenotypic characterization of a *Bacillus subtilis* strain without extracytoplasmic function σ factors". *Journal of Bacteriology*, 192(21), pp. 5736-5745.

Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F.E., Doona, C.J. y Setlow, P. (2015). "The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins". *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), pp. 2927-2938.

Marcén Terraza, M., Mañas Pérez, P. y Condón Usón, S. (2021). "Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos".

Minh, H.N.T., Perrier-Cornet, J. y Gervais, P. (2008). "Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), pp. 107.

Mokashi, S., Kanaan, J., Craft, D.L., Byrd, B., Zenick, B., Laue, M., Korza, G., Mok, W. y Setlow (2020). "Killing of bacterial spores by dodecylamine and its effects on spore inner membrane properties". *Journal of applied microbiology*, 129(6), pp. 1511-1522.

Mols, M. y Abbe, T. (2011). "Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*". *Environmental microbiology*, 13(6), pp. 1387-1394.

Mongkolthanaruk, W., Cooper, G.R., Mawer, J.S., Allan, R.N. y Moir, A. (2011). "Effect of amino acid substitutions in the GerAA protein on the function of the alanine-responsive germinant receptor of *Bacillus subtilis* spores". *Journal of Bacteriology*, 193(9), pp. 2268-2275.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S. y Pfaffer, M.A. (2020). *Medical microbiology E-book*. Elsevier Health Sciences.

Mutlu, A., Trauth, S., Ziesack, M., Nagler, K., Bergeest, J., Rohr, K., Becker, N., Höfer, T. y Bischofs, I.B. (2018). "Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff". *Nature Communications*, 9(1), pp. 69.

Nagler, K., Krawczyk, A.O., De Jong, A., Madela, K., Hoffmann, T., Laue, M., Kuipers, O.P., Bremer, E. y Moeller, R. (2016). "Identification of differentially expressed genes during *Bacillus subtilis* spore outgrowth in high-salinity environments using RNA sequencing". *Frontiers in microbiology*, 7, pp. 1564.

Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J. y Gervais, P. (2011). "Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, pp. 1409-1417.

Oomes, S.J.C.M. y Brul, S. (2004). "The effect of metal ions commonly present in food on gene expression of sporulating *Bacillus subtilis* cells in relation to spore wet heat resistance". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(3), pp. 307-316 DOI: 10.1016/j.ifset.2004.03.006.

Ordas, E.G. (2013). "Desarrollo de procesos combinados de higienización de alimentos basados en la aplicación de radiación ultravioleta y calor"

Pírez, M. y Mota, M. (2006). "Morfología y estructura bacteriana". *Temas de bacteriología y virología médica*, pp. 23-42.

Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V. y Carlin, F. (2011). "Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 C and 30 C display variations in their properties". *Food Microbiology*, 28(2), pp. 291-297.

Popham, D.L. y Bernhards, C.B. (2016). "Spore peptidoglycan". *The bacterial spore: from molecules to systems*, , pp. 157-177.

Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y. y Setlow, P. (2012). "Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores". *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), pp. 2689-2697.

Rath, H., Sappa, P.K., Hoffmann, T., Gesell Salazar, M., Reder, A., Steil, L., Hecker, M., Bremer, E., Mäder, U. y Völker, U. (2020). "Impact of high salinity and the compatible solute glycine betaine on gene expression of *Bacillus subtilis*". *Environmental microbiology*, 22(8), pp. 3266-3286.

Rose, R., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A. y Setlow (2007). "Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates". *Journal of applied microbiology*, 103(3), pp. 691-699.

Rowan-Nash Aislinn, D., Korry Benjamin, J., Eleftherios, M. y Peter, B. (2019). "Cross-Domain and Viral Interactions in the Microbiome". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(1), pp. 44 DOI: 10.1128/MMBR.00044-18.

Schumann, W. (2003). "The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon". *Cell stress & chaperones*, 8(3), pp. 207.

Setlow, B., Cowan, A.E. y Setlow (2003). "Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine". *Journal of applied microbiology*, 95(3), pp. 637-648.

Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C. y Setlow (2002). "Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol". *Journal of applied microbiology*, 92(2), pp. 362-375.

Setlow, B., Yu, J., Li, Y. y Setlow (2013). "Analysis of the germination kinetics of individual *Bacillus subtilis* spores treated with hydrogen peroxide or sodium hypochlorite". *Letters in applied microbiology*, 57(4), pp. 259-265.

Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K. y Setlow, P. (2006). "Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β -type small acid-soluble proteins". *Journal of Bacteriology*, 188(11), pp. 3740-3747.

Setlow, P. (2016). "Spore resistance properties". *The bacterial spore: from molecules to systems*, , pp. 201-215.

Setlow, P. (2014). "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know". *Journal of Bacteriology*, 196(7), pp. 1297-1305.

Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals". *Journal of applied microbiology*, 101(3), pp. 514-525.

Setlow, P., Wang, S. y Li, Y. (2017). "Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*". *Annual Review of Microbiology*, 71, pp. 459-477.

Setlow y Christie, G. (2021). "What's new and notable in bacterial spore killing!". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(8), pp. 144.

Stewart, K.V. y Setlow, P. (2013). "Numbers of individual nutrient germinant receptors and other germination proteins in spores of *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*, 195(16), pp. 3575-3582.

Sunde, E.P., Setlow, P., Hederstedt, L. y Halle, B. (2009). "The physical state of water in bacterial spores". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), pp. 19334-19339.

Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A., Postollec, F., Leguerinel, I., Couvert, O., Broussolle, V., Carlin, F. y Coroller, L. (2020). "Suboptimal *Bacillus licheniformis* and *Bacillus weihenstephanensis* spore incubation conditions increase heterogeneity of spore outgrowth time". *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6), pp. 2061.

Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H. y Hecker, M. (1994). "Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*". *Microbiology*, 140(4), pp. 741-752.

Vries, d.Y.P., Hornstra, L.M., Atmadja, R.D., Schaik, W.v., de Vos, W.M. y Abeel, T. (2005a). "Deletion of sigB in *Bacillus cereus* affects spore properties". *FEMS microbiology letters*, 252(1), pp. 169-173.

Weber, M.H., Klein, W., Müller, L., Niess, U.M. y Marahiel, M.A. (2001). "Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock". *Molecular microbiology*, 39(5), pp. 1321-1329.

Wells-Bennik, M.H., Eijlander, R.T., Den Besten, H.M., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H. y Kuipers, O.P. (2016). "Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth". *Annual review of food science and technology*, 7, pp. 457-482.

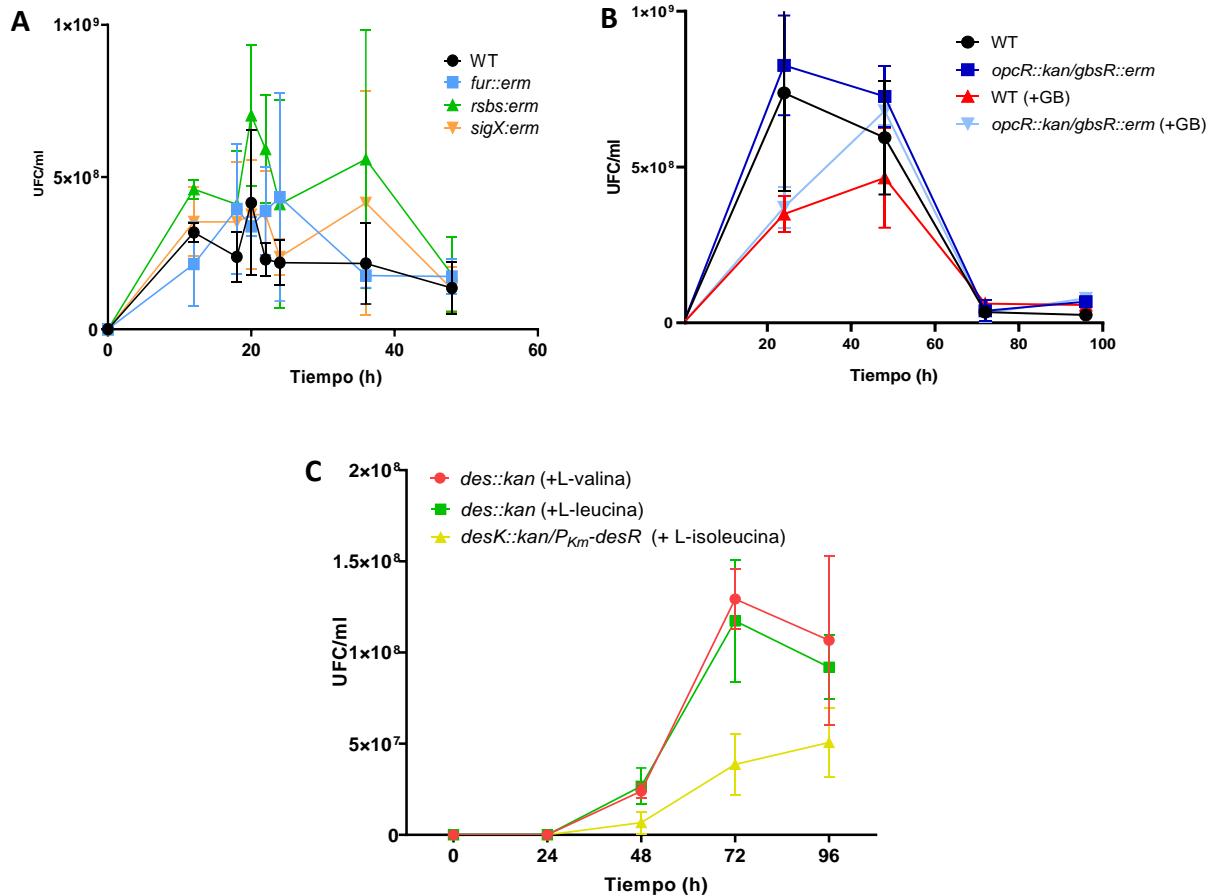
Wen, J., Pasman, R., Manders, E.M., Setlow, P. y Brul, S. (2019). "Visualization of Germinosomes and the Inner Membrane in *Bacillus subtilis* Spores". *Journal of Visualized Experiments: Jove*, (146).

Williams, N.D. y Russell, A.D. (1992). "Increased susceptibility of injured spores of *Bacillus subtilis* to cationic and other stressing agents". *Letters in applied microbiology*, 15(6), pp. 253-255.

Young, S.B. y Setlow (2003). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide". *Journal of applied microbiology*, 95(1), pp. 54-67.

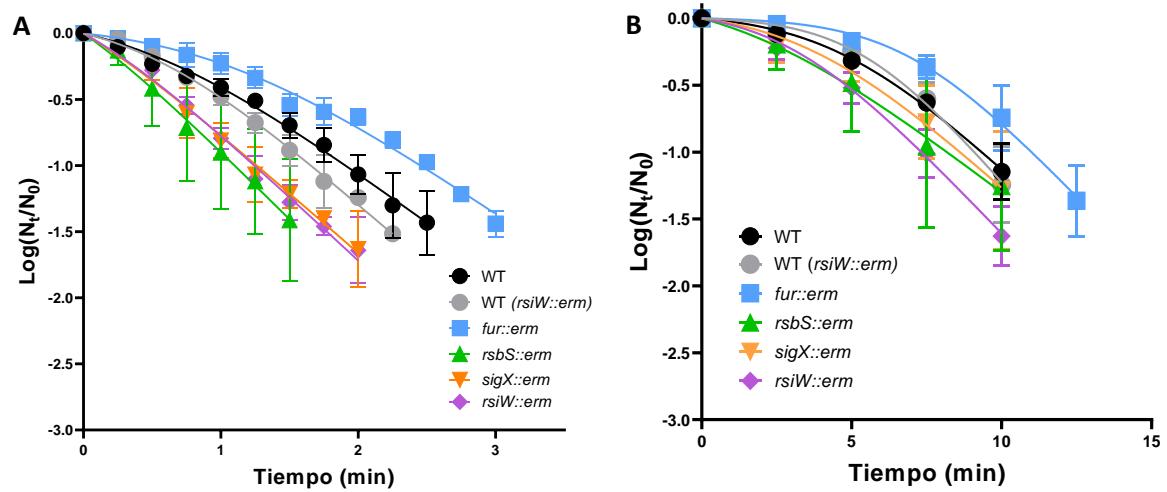
7. ANEXOS

ANEXO I:



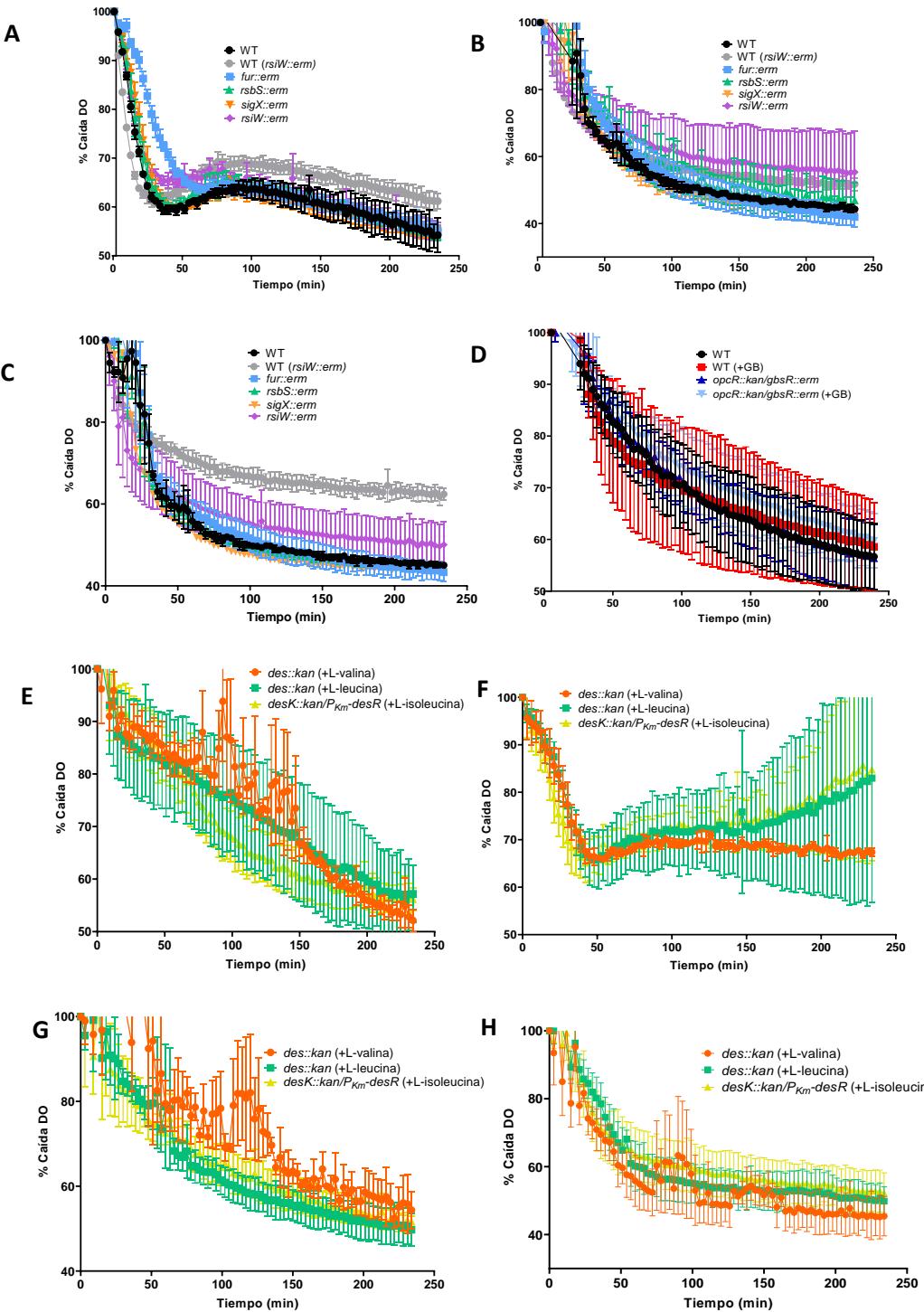
Anexo I: Recuentos de esporos en el microscopio de *B. subtilis* (WT) y los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm* y *sigX::erm* en el medio 2xSG a 37 °C (A), el mutante *opcR::kan/gbsR::erm* en el medio mínimo de Spizizen con y sin GB a 37 °C (B), y *des::kan* en el medio mínimo de Spizizen con L-valina o L-leucina y *desK::kan/P_{Km}-desR* en el medio mínimo de Spizizen con isoleucina a 30 °C (C). Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas.

ANEXO II:



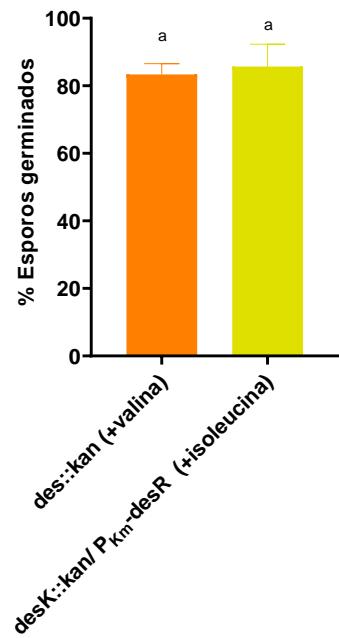
Anexo II: Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* (WT) y los mutantes *fur::erm*, *rsbS::erm*, *sigX::erm* y *rsiW::erm* a 102,5°C (A) y 97,5°C (B). Los datos muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 réplicas biológicas

ANEXO III:



Anexo III: Cinética de germinación de las cepas WT, fur::erm, rsbS::erm, sigX::erm y rsiW::erm esporuladas en 2xSG a 37 °C con CNYE (A), L- valina (B) y L-alanina (C); la cepa WT y el mutante opcR::kan/gbsR::erm esporuladas en el medio de Spizizen, con y sin GB a 37 °C en AGFK (D); y de la cepa des::kan, esporulada en el medio de Spizizen con L- valina o L-leucina a 30 °C y desK::kan/P_{Km}-desR esporulada en el medio de Spizizen con L-isoleucina a 30 °C frente a AGFK (E), CNYE (F), L-valina (G) y L-alanina (H), midiendo el descenso de absorbancia a 600nm en función del tiempo de germinación. Los datos muestran la tendencia promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error la desviación estándar de la media.

ANEXO VI:



Anexo IV: Porcentaje de esporos germinados observados en el microscopio de las cepas indicadas tras 240 min de incubación en CaDPA. Las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las cepas se indican con letras distintas.